

**Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*
(Willd. ex. A. Juss) Muell. Arg.**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
-Dr. rer. nat.-**

**des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Daniel Kadow
aus Hamburg**

Hamburg, im Juni 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. LIEBEREI
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. D. SELMAR
Tag der Disputation: 23. April 2010

Hamburg, den 08. April 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I. 1: <i>Hevea brasiliensis</i>	1
I. 2: Gliederung der Arbeit	2
I. 3: Hintergrund Teil 1, Cyanogenese	3
Die Blausäure-Freisetzung und ihre Funktion	3
Linamarase und Hydroxynitrillyase	3
Cyanogenes Potential und cyanogene Kapazität	3
Toxizität der Blausäure	4
Die Synthese der cyanogenen Vorstufe Linamarin	4
Blattentwicklung und Cyanogenität	5
Linamarin als Reservestoff	6
Resistenzbildungen gegenüber Blausäure	6
I. 4: Hintergrund Teil 2, Glycosidhydrolasen	8
Kohlenhydrate und kohlenhydrataktive Enzyme	8
Glycosidhydrolasen	8
I. 5: Hintergrund Teil 3, Reaktionen der Pflanze auf Gewebeverletzung	11
Systemin und Genexpression	11
Reaktionen der Pflanze auf Gewebeverletzung	11
<u>Kapitel 1: Eine durch Gewebeverletzung hervorgerufene Aktivierung von Linamarase und Hydroxynitrillyase beschleunigt die Blausäurefreisetzung</u>	14
Zusammenfassung	14

1.1 Einleitung	14
Einflussgrößen der pflanzlichen Cyanogenese	14
BGLU aus <i>H. brasiliensis</i>	16
Fragestellungen und Zielsetzungen	17
1.2 Material und Methoden	18
Pflanzenmaterial	18
Mechanische Gewebeverletzung und Probennahme	18
BGLU-Aktivität-Essays	19
HNL-Aktivität-Essay	20
Quantifizierung des aus Blättern freigesetzten HCN	20
Quantifizierung der im Gewebe gespeicherten, cyanogenen Vorstufen (HCNp)	21
Untersuchung von Pflanzenmaterial auf Cyanogenität	22
1.3 Ergebnisse	23
Aktivität von BGLU und HNL in verletztem Blattgewebe	23
Abhängigkeit der BGLU- und HNL-Aktivierung vom Grad der Gewebeverletzung	25
Zeitlicher Verlauf der BGLU- und HNL-Aktivierung	26
Die Aktivierung von BGLU und HNL ist lokal begrenzt	26
Blattstadienspezifische Aktivierung von BGLU und HNL	27
Aktivierung der Linamarase durch mechanische Gewebeverletzung	28
Die Aktivierung von LIN und HNL bedingt <i>in vitro</i> eine erhöhte HCN-Freisetzung	29
Erhöhung der HCN-Freisetzung <i>in vivo</i>	32
BGLU- und HNL-Aktivierung bei <i>Manihot esculenta</i>	35
BGLU-Aktivierung bei <i>Jatropha multifida</i> und <i>Euphorbia caracasana</i>	36
BGLU-Aktivierung bei <i>Phaseolus lunatus</i> und <i>Linum usitatissimum</i>	37
1.4 Diskussion	39
Die Bedeutung der HNL für die Cyanogenese	39
Die verletzungsbedingte LIN- / HNL-Aktivierung: eine neue Einflussgröße der pflanzlichen Cyanogenese	40
Warum sind LIN- und HNL-Aktivität nicht von vorneherein hoch?	41

BGLU-Aktivierung bei anderen Euphorbiaceae und cyanogenen Pflanzen	43
<u>Kapitel 2: Sequenz- und Strukturanalyse der Blatt-β-Glucosidasen</u>	44
Zusammenfassung	44
2.1 Einleitung	44
Glycosidhydrolasen und Glycosidhydrolase-Familie1	44
Linamarasen und Linamarase aus <i>H. brasiliensis</i>	46
Fragestellungen und Zielsetzungen	47
2.2 Material und Methoden	48
Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht	48
Isolierung von RNA	48
Synthese von ss cDNA	49
Synthese von ds cDNA	49
Long Distance (LD) PCR	50
Real Time (RT) PCR	50
Klonierung	53
Transformation von kompetenten Zellen	53
Kolonie-Screening	54
Über-Nacht-Kulturen (ÜNK)	54
Isolierung von Plasmid-DNA	54
Ansetzen von LB-Medium und Gießen von antibiotikahaltigen Platten	54
Heterologe Proteinexpression	55
Extraktion von heterolog exprimiertem Protein	55
Isolierung von genomischer DNA	56
RNase-Behandlung und Restriktionsverdau von DNA	57
Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde	57
Blotting der DNA	58
Detektion von <i>BGLU 1</i> - und <i>BGLU 1</i> -ähnlichen Genen	58
Identifikation offener Leseraster (ORF = Open Reading Frame)	59
Multiple Sequence Alignment und Erstellung von Dendrogrammen	59
Vorhersage potentieller Glycosilierungsstellen	59

Bestimmung von Signalpeptiden und N-Termini	59
Vorhersage der subzellulären Lokalisation	60
Berechnung von 3D-Strukturen	60
Vergleichende Analyse von 3D-Strukturen	60
Immunoaffinitätschromatographische Isolierung von β -Glucosidase aus Blättern von <i>H. brasiliensis</i>	60
Agarosegele	63
Polyacrylamidgele und Colloidal-Coomassie-Färbung (CC-Färbung)	63
Färbung glycosilierter Proteine im Polyacrylamidgel	63
Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität	64
Liste der verwendeten Antibiotika	64
2.3 Ergebnisse	65
Expression von Latex- und VSP-Linamarase in Blättern von <i>H. brasiliensis</i>	65
Sequenzierung der Blatt-Linamarase	66
<i>H. brasiliensis</i> verfügt über mindestens 5 β -Glucosidasen	67
Familienzugehörigkeit der 5 BGLUs aus <i>H. brasiliensis</i>	69
Funktion der 5 BGLUs aus <i>H. brasiliensis</i>	72
Lokalisation der 5 BGLUs aus <i>H. brasiliensis</i>	74
Posttranslationale Modifikation der 5 BGLUs aus <i>H. brasiliensis</i>	75
BGLU 1 könnte in zwei Glycosilierungsvarianten vorkommen	76
Stadienspezifische Expression von BGLU 1, 2 und 5 im Blattgewebe	79
<i>H. brasiliensis</i> verfügt über mindestens 10 Gene, die BGLU-1-ähnliche Enzyme kodieren	81
Erstellung von 3D-Strukturmodellen für BGLU 1 - 5	82
Struktureller Vergleich der katalytischen Zentren von BGLU 1 - 5	85
Heterologe Expression von BGLU 1 in <i>E. coli</i>	87
2.4 Diskussion	91
BGLU 1 - 4: Mitglieder einer Linamarase-Unterfamilie bei <i>H. brasiliensis</i> ?	91
BGLU 2: eine <i>H. brasiliensis</i> -di-Glucosidase?	92

<u>Kapitel 3: Lokalisierung von Linamarase und Hydroxynitrillyase im Blattgewebe</u>	94
Zusammenfassung	94
3.1 Einleitung	94
Die Synthese und Lokalisierung cyanogener Vorstufen	94
Die Lokalisierung von β -Glucosidase und Hydroxynitrillyase	95
Fragestellungen und Zielsetzungen	96
3.2 Material und Methoden	97
Fixierung und Einbettung der <i>H. brasiliensis</i> Blattproben	97
Schneiden der Blattproben	97
Toluidinfärbung	98
Immunfluoreszenzmarkierung von BGLU, HNL und <i>Hev b I</i>	99
Goldmarkierung von LIN	99
Oil-Red-O-Färbung hydrophober Substanzen	100
GFP-Markierung von HNL (Erstellung eines GFP-Vektors mit <i>Sfi</i> -Schnittstellen)	100
Probenauswertung und Dokumentation am Licht- am Fluoreszenz- und am Konfokal-Laser-Mikroskop	103
Verwendete Antikörper	103
Vorhersage der subzellulären Lokalisation	103
3.3 Ergebnisse	104
Vorhersage der subzellulären Lokalisation von LIN und HNL	104
Immunfluoreszenz- und Immunogoldmarkierung von LIN	105
Detektion von Latexgefäßen	108
Immunfluoreszenz- und GFP-Markierung von HNL	110
Immunfluoreszenzmarkierung von LIN und HNL in verletztem Blattgewebe	111
3.4 Diskussion	113
Vakuoläre Lokalisation von LIN und HNL	113
Lokalisation und Aktivierbarkeit	115

<u>Kapitel 4:</u> Die Aktivierung von Linamarase und Hydroxynitrillyase erfolgte durch sekundenschnelle Erhöhung der Löslichkeit	118
Zusammenfassung	118
4.1 Einleitung	118
Wichtigkeit von Enzymaktivitätsregulierung	118
Ebenen der Enzymaktivitätsregulierung	119
Oligomerbildung bei <i>H. brasiliensis</i> -LIN	120
Oligomerbildung bei <i>H. brasiliensis</i> -HNL	121
Posttranslationale Modifikation von Proteinen	121
LIN- und HNL-Aktivierung bei <i>H. brasiliensis</i>	122
Fragestellungen und Zielsetzungen	122
4.2 Material und Methoden	124
Pflanzenmaterial	124
Mechanische Gewebeverletzung und Probennahme	124
Test auf NO-Freisetzung in Zusammenhang mit Gewebeverletzung	124
Inkubationen mit NO-Donatoren	124
Inkubation mit Wasserstoffperoxid	125
Inkubation mit Inositolphosphaten	125
Inkubation mit GABA	126
Inkubation mit Methyljasmonat	126
Begasung von <i>H. brasiliensis</i> -Blättern mit Chloroform	126
Zellwandabdau nach Homogenisierung des Blattmaterials	126
Isolierung von BGLU aus Blattgewebe von <i>H. brasiliensis</i>	127
Probenvorbereitung für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	127
Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot	127
Proteinfärbung mittels Colloidal-Coomassie	129
Enzymaktivitätsfärbung	129
Bestimmung der Bandenintensitäten	129
Immunodetektion phosphorierter Proteine	130
Massenspektroskopische Analyse der Proteinbanden	131
Vorhersage potentieller Phosphorylierungsstellen	131

4.3 Ergebnisse	132
NO-Synthese in verletztem Blattgewebe von <i>H. brasiliensis</i>	132
LIN- und HNL-Aktivität nach NO-Behandlung	133
LIN-Aktivität nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid	136
Untersuchung von LIN und HNL auf verletzungsbedingte Phosphorylierung	138
BGLU-Aktivität nach Inkubation mit Inositolphosphaten	140
BGLU-Aktivität nach Behandlung der Blätter mit Methyljasmonat (MeJa)	141
BGLU-Aktivität nach Inkubation mit GABA	142
Oligomerbildung und Enzymaktivität bei LIN und HNL aus <i>H. brasiliensis</i>	143
Massenspektrometrische Identifikation der LIN- und HNL-Banden	150
Katalytische Aktivität der schwer- bzw. unlöslichen LIN- und HNL-Fraktion	152
Löslichkeit der inaktiven LIN- und HNL-Fraktion	153
Prüfung einer möglichen Zellwandassoziation von LIN	154
Der Aktivierungsprozess könnte an enzymatische Reaktionsabläufe geknüpft sein	156
Der Aktivierungsprozess könnte lebende Zellen erfordern	157
Ein Wundsignal könnte die Aktivierung einleiten	159
Die LIN- und HNL-Aktivierung scheint innerhalb der Zellen zu erfolgen	160
4.4 Diskussion	162
Der Aktivierungsmechanismus auf Molekülebene	162
Der Aktivierungsmechanismus auf Gewebeebene	163
II. Diskussion und Ausblick	165
II. 1: Verletzungsbedingte Aktivierung von LIN und HNL	165
II. 1: Gewebespezifische Expression unterschiedlicher Linamarasen	167
II. 1: Expression, Speicherung und Mobilisierung von BGLU 1 und 3	169

III. Anhang	172
III. 1: BGLU und HNL-Aktivitäten bei den <i>H. brasiliensis</i>-Pflanzen 1 - 5	172
III. 1: Accession-Nummern der in dieser Arbeit aufgeführten AS-Sequenzen	173
III. 1: Verwendete Primer	174
IV. Abkürzungsverzeichnis	175
V. Literatur	179
VI. Danksagung	191

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

(I.) Einleitung

I. 1: *Hevea brasiliensis*

Der Parakautschukbaum *Hevea brasiliensis* ist im Amazonasbecken beheimatet. Er wird zur Gewinnung von Naturkautschuk angebaut. Zwar werden zwei Drittel des Weltbedarfs heute aus Synthetikautschuk gedeckt, doch dieser weist nicht dieselben Qualitäten auf, die Naturkautschuk hat. Für eine Vielzahl von Produkten, wie z.B. hochwertige Auto- oder aber Flugzeugreifen, ist ein hoher Anteil an Naturkautschuk unabdingbar (LIEBEREI und REISDORFF 2007). Bis 1876 war die Kautschukproduktion ein Monopol Brasiliens. Heute wird ein Großteil der Weltgesamtproduktion in Thailand, Indonesien und Malaysia erzeugt (FAO 2006, siehe auch LIEBEREI und REISDORFF 2007). Brasilien selbst produziert nur sehr wenig Kautschuk, was darauf zurückzuführen ist, dass eine Kultivierung in Plantagen dort nicht möglich ist. Grund hierfür ist der Schadpilz *Microcyclus ulei*, der Erreger der südamerikanischen Blattfallkrankheit (SALB), die in Brasilien zur Vernichtung aller *H. brasiliensis*-Plantagen führte, die sich im Verbreitungsgebiet des Pilzes befanden (LIEBEREI und REISDORFF 2007). Ein wesentlicher Grund für die Anfälligkeit des Kautschukbaumes gegenüber *M. ulei* ist offenbar seine Befähigung zur Cyanogenese (LIEBEREI 1984; LIEBEREI et al. 1986). Diese bedingt im Falle von *H. brasiliensis* eine Autoinhibition der Abwehrreaktionen gegen Pilzpathogene (LIEBEREI et al. 1989). *M. ulei* kann daher Kautschukbaum-Blätter problemlos kolonisieren (LIEBEREI 1988 und 2007). Der Befall führt letztendlich zur Entlaubung der Bäume und damit zu ihrem Absterben. Der Grund weshalb der Anbau von *H. brasiliensis* in Südostasien möglich ist liegt lediglich darin, dass *M. ulei* in diesen Anbaugebieten nicht vorkommt. Eine Resistenz gegenüber dem Schadpilz ist nicht gegeben. Mit der enormen Zunahme direkter Flugverbindungen zwischen Südamerika und Asien, ist auch die Gefahr einer Kontamination der dortigen Anbaugebiete gestiegen. Eine Vernichtung der Plantagen in Thailand, Indonesien und Malaysia würde zu einem Zusammenbruch der Versorgung mit Naturkautschuk führen und hätte verheerende Folgen für die Weltwirtschaft.

Ein detailliertes Verständnis der Cyanogenese bei *H. brasiliensis* erscheint aus diesen Gründen von zentraler Bedeutung. Daher befasst sich diese Arbeit mit dem cyanogenen Syndrom bei *Hevea brasiliensis*.

I. 2: Gliederung der Arbeit

Um dem Anspruch einer detaillierten Untersuchung des cyanogenen Syndroms bei *H. brasiliensis* gerecht zu werden, wurden 4 unterschiedliche Betrachtungsweisen gewählt: eine biochemische, eine molekulare, eine histologische und eine mechanistische. Die Arbeit gliedert sich daher auch in 4 Kapitel, in denen die Ergebnisse jeweils einer experimentellen Linie dargestellt sind.

Das **erste Kapitel** befasst sich mit biochemischen Aspekten. Von β -Glucosidase aus *H. brasiliensis*-Blättern ist bekannt, dass sie eine gewebeverletzungsabhängige Aktivitätsregulierung erfährt (VOß 2001). Da die Aktivität der β -Glucosidase der der Linamarase entspricht, sollte auch die Linamarindegradation beschleunigt sein. In diesem Fall hätte die Aktivierung des Enzyms zentrale Bedeutung für die *H. brasiliensis*-*M. ulei*- Interaktion. Das erste Kapitel befasst sich daher mit der Aktivitätsregulierung der Linamarase und den Auswirkungen auf die Blausäure-Freisetzung.

Das **zweite Kapitel** geht auf molekulare Aspekte ein. Pflanzen verfügen im Allgemeinen über eine Vielzahl an Glycosidhydrolasen (DAVIES und HENRISSAT 2002). Bei *Arabidopsis thaliana* sind alleine 6 Myrosinasen beschrieben (XU et al. 2004). *H. brasiliensis* scheint hingegen nur eine Linamarase aufzuweisen (SELMAR et al. 1987). Das Vorhandensein mehrere Linamarasen würde eine flexible Expression und damit eine erweiterte Modulation der cyanogenen Antwort auf Gen-Ebene ermöglichen. Das zweite Kapitel befasst sich daher mit der Fragestellung, ob *H. brasiliensis* wirklich nur über ein Linamarase-Gen verfügt und wie dessen Expression im Blattgewebe variiert.

Kapitel drei beleuchtet histologische Aspekte. Für an der Cyanogenese beteiligte β -Glucosidasen sind unterschiedlichste Lokalisierungen beschrieben. So findet sich Linamarase aus *Manihot esculenta* im Apoplasten der Blätter (McMAHON et al. 1995), Dhurrinase aus *Sorghum bicolor* hingegen ausschließlich in den Chloroplasten (THAYER und CONN 1981). Bei *Prunus serotina* schließlich wurde Prunasinhydrolase in den Vakuolen gefunden (SWAIN und POULTON 1994). Von Linamarase aus *H. brasiliensis* ist hingegen nur bekannt, dass sie offenbar in Teilen apoplastisch vorkommt (SELMAR 1986). Eine genauere Kenntnis der Lokalisierung des Enzyms ist nicht nur für den Ablauf der Cyanogenese sondern insbesondere auch im Zusammenhang mit der Aktivitätsregulierung von großer Wichtigkeit. Im Rahmen der Ergebnisse des dritten Kapitels wird daher die subzelluläre Lokalisation der Linamarase beschrieben.

Im **vierten Kapitel** geht es schließlich um mechanistische Aspekte. Gemeint ist der Mechanismus, der hinter der β -Glucosidase-Aktivierung steht. Enzymaktivitäten können z.B. durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung oder Nitrosylierung, moduliert werden. Der Ergebnis-Teil des vierten Kapitels geht der Frage nach, ob solche Modifikationen auch an der Aktivitätsregulierung der Linamarase beteiligt sind oder ob andere Mechanismen eine Rolle spielen.

I. 3: Hintergrund Teil 1, Cyanogenese

Die Blausäurefreisetzung und ihre Funktion

Cyanogene Pflanzen sind in der Lage bei Gewebeverletzung, hervorgerufen beispielsweise durch Insektenfraß, Blausäure (HCN) freizusetzen. Das als Cyanogenese bezeichnete Phänomen ist im Pflanzenreich weit verbreitet (MØLLER und SEIGLER 1999). Mehr als 2500 cyanogene Pflanzenarten wurden bisher beschrieben (SEIGLER und BRINKER 1993). Blausäure ist in hohem Maße toxisch (SOLOMONSON 1981). Der Cyanogenese kann eine daher wichtige Abwehrfunktion insbesondere in Bezug auf Herbivore zukommen (NAHRSTEDT 1985, SCHAPPERT and SHORE 1999; GLEADOW und WOODROW 2002; BALLHORN et al. 2005).

Linamarase und Hydroxynitrillyase

Freigesetzt wird die Blausäure aus sogenannten cyanogenen Vorstufen. An dem Prozess sind, im Falle von *H. brasiliensis*, zwei Enzyme beteiligt: erstens eine β -Glucosidase (BGLU) bzw. Linamarase (LIN), die die cyanogenen Vorstufen spaltet (HÖSEL 1981). Die Spaltung führt zur Bildung von Acetoncyanhydrin. Acetoncyanhydrin ist instabil und zerfällt daher in Abhängigkeit vom pH-Wert mehr oder weniger schnell, wobei HCN freigesetzt wird (siehe Abbildung I. 1). Die Degradation von Acetoncyanhydrin und damit auch die HCN-Freisetzung kann durch Hydroxynitrillyase (HNL) beschleunigt werden (HÖSEL 1981; SELMAR et al. 1989).

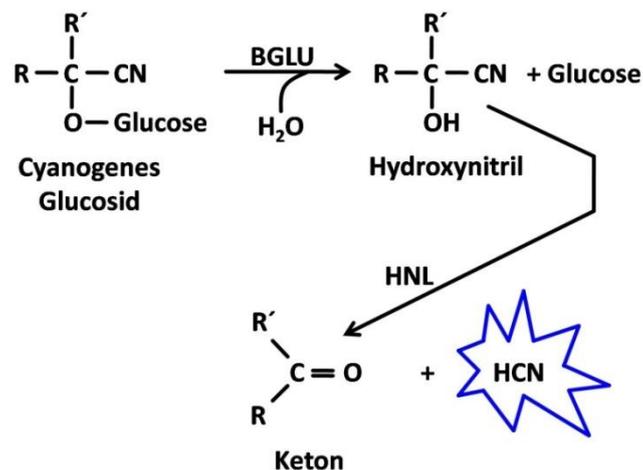


Abbildung I. 1: Reaktionsabfolge der Cyanogenese (nach HÖSEL 1981)

BGLU: β -Glucosidase; HNL: Hydroxynitrillyase; HCN: Blausäure

Cyanogenes Potential und cyanogene Kapazität

Die Kinetik der HCN-Freisetzung kann sich von Pflanze zu Pflanze stark unterscheiden (BALLHORN et al. 2005) und stellt ein wichtiges Charakteristikum zur Klassifizierung cyanogener Pflanzen da. Die pro

Zeiteinheit aus einem Gewebe freigesetzte Menge an Blausäure wird als cyanogene Kapazität (HCNc) bezeichnet (LIEBEREI 1988). Die HCNc wiederum hängt wesentlich von zwei Komponenten ab. Zum einen von der Aktivität von LIN und HNL. Zum anderen von der Verfügbaren Substratmenge, der Menge an cyanogenen Vorstufen also, die in einem Gewebe gespeichert ist. Diese Größe wird als cyanogenes Potential (HCNp) bezeichnet (LOYD und GRAY 1970). Das HCNp stellt ein weiteres wichtiges Charakteristikum zur Klassifizierung cyanogener Pflanzen da. Anhand von HCNc und HCNp können Pflanzen bzw. Genotypen in die Gruppierungen hochcyanogen (HC: high cyanogenic) und niedrigcyanogen (LC: low cyanogenic) unterteilt werden (BALLHORN et al. 2005).

Toxizität der Blausäure

Blausäure ist aufgrund ihrer Affinität zur Cytochromoxidase und der hierdurch bedingten Hemmung der Atmung für die meisten Lebewesen schon in geringen Mengen tödlich (SOLOMONSON 1981). So beträgt die letale Dosis beim Menschen 0,5 – 3,5 mg pro kg Körpergewicht (ERMANS et al. 1972; SOLOMONSON 1981). Gewebe von beispielsweise *Manihot esculenta* und von Bambussprossen (*Bambusa spec.*), die als Nahrungsmittel Verwendung finden, können 100 – 300 mg Blausäure pro 100 g Pflanzenmaterial enthalten (MONTGOMERY 1969; SOLOMONSON 1981). Sie sind daher erst nach entsprechender Vorbehandlung zum Verzehr geeignet. Aber HCN ist nicht nur für Menschen und Tiere bzw. für Herbivoren toxisch sondern auch für die Pflanze selbst. Neben der Atmung (SOLOMONSON 1981) wird auch die Photosynthese (WISHNIK und LANE 1969; MARSHO und KUNG 1976; LIEBEREI et al. 1996) durch HCN inhibiert, was zu einem Zusammenbruch des Energiehaushaltes der betroffenen Zellen führt und damit meist zum Zelltod. HCN hemmt außerdem Peroxidasen (POD; SOLOMONSON 1981). Eine Lignifizierung, wie sie als Reaktion auf Pathogenbefall erfolgen kann (TAIZ und ZEIGER 2006), ist somit bei HCN-Freisetzung nicht mehr oder nur begrenzt möglich. Darüber hinaus hemmt HCN Phenylalaninammoniumlyase (PAL) irreversibel (HODGINS 1971; KHAN et al. 1989). Da PAL das Schlüsselenzym der Synthese phenolischer Substanzen ist (CONN und STUMPF 2009), wird auch deren Bildung durch HCN inhibiert. Zu den phenolischen Substanzen zählen nicht nur einige Phytoalexine, die in der Abwehr von Pilz-Pathogenen eine zentrale Rolle spielen können, sondern auch die Ligninvorstufen. Die Cyanogenese kann also auf der einen Seite einen effektiven Schutzmechanismus gegenüber Herbivoren darstellen, schädigt aber auf der anderen Seite auch die Pflanze selbst in erheblichem Maße.

Die Synthese der cyanogenen Vorstufe Linamarin

Eine Vielzahl cyanogener Vorstufen leitet sich von den proteinogenen Aminosäuren Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin ab (CONN 1981). Bei vielen Pflanzen, wie zum Beispiel bei Maniok (*Manihot esculenta*), Lima Bohne (*Phaseolus lunatus*) und Lein (*Linum usitatissimum*), wurde die

cyanogene Vorstufe Linamarin nachgewiesen (BUTLER und CONN 1964; FREHNER und CONN 1987; VETTER 2000). Linamarin leitet sich von Valin ab. In einer mehrschrittigen Reaktionsabfolge, die unter anderem Dihydroxyvalin und Methylpropanaloxim beinhaltet, wird Valin zunächst zu Acetoncyanhydrin umgewandelt. Die Synthese wird von zwei multifunktionalen Cytochromen-P450 katalysiert und verbraucht 2 Moleküle reduziertes NADPH (Nicotinamidadenindinucleotidphosphat). Acetoncyanhydrin ist relativ instabil, insbesondere in alkalischen Milieus und zerfällt spontan unter Freisetzung von HCN. Zur Stabilisierung des Moleküls erfolgt eine Glucosilierung. Das Glucosemolekül stammt von Uridindiphosphatglucose (UDPG) und wird durch UDPG-Glucosyltransferase übertragen (McMAHON et al. 1995; SIRITUNGA 2002). Allgemein werden cyanogene Vorstufen dieser Art daher auch als cyanogene Glucoside (CG) bezeichnet. Neben Linamarin, welches ca. 90 - 95% der CG bei *H. brasiliensis* ausmacht, synthetisiert der Kautschukbaum außerdem Lotaustralin. Dieses leitet sich von Isoleucin ab.

Blattentwicklung und Cyanogenität

H. brasiliensis wächst, wie viele tropische Pflanzen, in Schüben (HALLÉ und MARTIN 1968). Die Blätter eines auf diese Weise neu gebildeten Sprossabschnittes entwickeln sich alle mit gleicher Geschwindigkeit, wobei die einzelnen Entwicklungsphasen klar unterschieden werden können. Die jeweiligen Blattstadien werden mit A, B, C und D bezeichnet (siehe Abbildung I. 2). Dabei handelt es sich bei A, B und C um Juvenilstadien, während sich D auf adulte Blätter bezieht (LIEBEREI 1984). Erst D-Stadien weisen eine Lignifizierung auf (LIEBEREI 1984; Voß 2001).

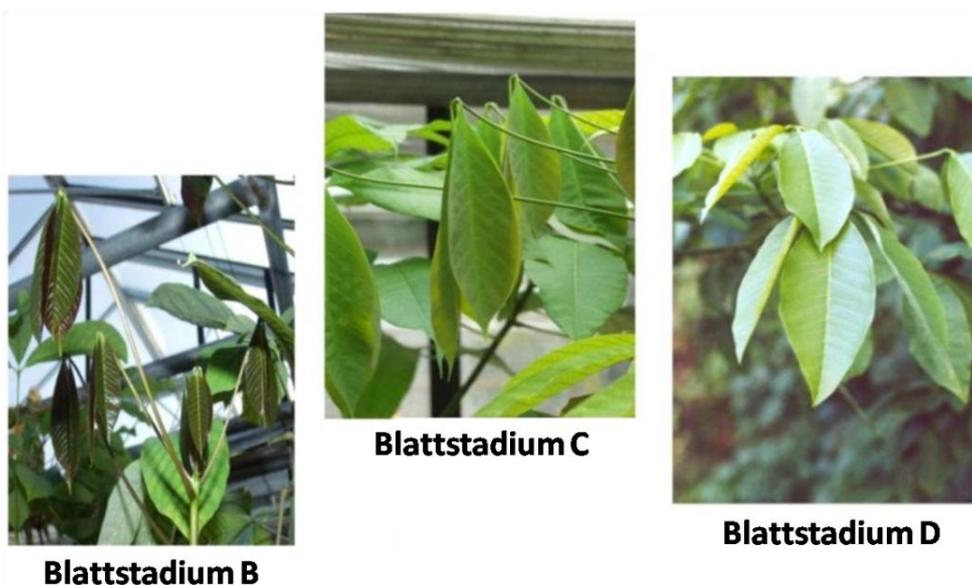


Abbildung I. 2: Stadien der Blattentwicklung bei *H. brasiliensis* (LIEBEREI 1984)

Bei den Blattstadien B und C handelt es sich um Juvenilstadien. Bei im D-Stadium befindlichen Blättern ist die Entwicklung abgeschlossen (Alle Bilder wurden von V. Nölting aufgenommen). A-Stadien (nicht dargestellt) sind nur wenige Millimeter groß.

Im Laufe der Blattentwicklung von Stadium A zu C nimmt der Linamarin-Gehalt pro Blatt zu. Im Rahmen der Entwicklungsabläufe, die den Übergang vom C- zum D-Stadium bedingen, verringert sich dieser, so dass die Linamarinkonzentration in adulten Blättern niedriger ist (LIEBEREI 1984, LIEBEREI et al. 1985). B- und C-Stadien weisen häufig eine hohe verletzungsbedingte Blausäure-Freisetzung auf (z.B. KADOW 2006), während diese bei D-Stadien deutlich geringer ausfällt. Dies dürfte allerdings nicht ausschließlich in Zusammenhang mit der Abnahme der Linamarinkonzentration stehen, sondern müsste auch auf die verringerte HNL-Aktivität (SELMAR et al. 1989) und die höhere Festigkeit der adulten Blätter zurückzuführen sein.

Linamarin als Reservestoff

H. brasiliensis speichert Linamarin nicht nur in juvenilen Blättern sondern auch im Endosperm der Samen. Es fungiert in diesem Fall nicht in erster Linie als präformierter Abwehrstoff sondern dient der Stickstoffspeicherung (SELMAR et al. 1988). Im Rahmen der Samenkeimung wird das Linamarin in Linustatin umgewandelt und in die sich entwickelnden Gewebe transportiert. Hier wird der Stickstoff auf Cystein übertragen, wobei zunächst β -Cyanoalanin und letztendlich die Aminosäure Asparagin entsteht (SELMAR et al. 1988). Damit steht der Stickstoff der *de novo* Synthese von Proteinen und weiteren Prozessen zur Verfügung. Während bei vielen Samen die Reservestoffe durch zusätzliche Komponenten vor Fraßfeinden geschützt werden - bei *Theobroma cacao* Samen zum Beispiel durch einen hohen Gehalt an Polyphenolen - ist bei *H. brasiliensis* bereits der Speicherstoff selber toxisch.

Resistenzbildungen gegenüber Blausäure

Einige Organismen weisen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Resistenz gegenüber HCN auf. Sie beruht z.T. auf der Metabolisierung der Blausäure. Diese kann beispielsweise mit Hilfe des Enzyms Rhodanase erfolgen, welches eine Umwandlung in weniger giftige Thiocyanate ermöglicht und die Resistenz einiger Arthropoden gegenüber HCN bedingt (BLUM 1981). Rhodanase ist von ubiquitärem Vorkommen (WESTLEY 1973; VOLINI und ALEXANDER 1981), findet sich bei Säugetieren hauptsächlich in der Leber, was möglicher Weise der Grund ist, weshalb eine effiziente Entgiftung des gesamten Organismus nicht möglich ist. Darüber hinaus wurde bei einigen Insekten β -Cyanoalaninsynthase-Aktivität (BCAS) nachgewiesen (DUFFEY 1981). BCAS ermöglicht, wie auch bei der Mobilisierung des Linamarins, die Umwandlung von HCN in Aminosäuren. Andere Insekten synthetisieren einen Überschuss an Cytochromoxidase oder verfügen über eine cyanidresistente, terminale Oxidase (ATO: Alternative Terminale Oxidase; HALL et al. 1971; DUFFEY 1981). Resistenz gegenüber Blausäure ist auch für Pilze beschrieben (FRY und MYERS 1981; LIEBEREI et al. 1988). Von zentraler Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das Enzym Formamidhydrolase (FHL), welches die Umwandlung der Blausäure in Formamid ermöglicht (FRY und EVANS 1977). Die Mehrheit der

Pilzpathogene, die erfolgreich cyanogene Pflanzen befallen, verfügen über dieses Enzym (OSBOURN 1996). Es wird mittlerweile als Cyanidhydratase (CHT) bezeichnet (OSBOURN 1996). Besonders detailliert wurde CHT bei dem *Sorghum*-Pathogen *Gloeocercospora sorghi* untersucht (FRY und MYERS 1981). CHT ist kein konstitutiv hoch exprimiertes Protein sondern wird erst durch die Anwesenheit von Blausäure induziert. Insbesondere bei *Stemphylium loti* ist die konstitutive CHT-Aktivität sehr niedrig, weshalb das Myzel ohne Induktion genauso sensitiv auf Blausäure reagiert wie nicht adaptierte *Stemphylium*-Spezies (FRY und MYERS 1981). Ein Befall des entsprechenden Pflanzengewebes ist daher nur möglich, wenn die anfänglich freigesetzte Blausäuremenge, die ohne CHT-Induktion tolerierbare Menge nicht überschreitet. Die Autoren verweisen darauf, dass CHT alleine nicht zwangsläufig eine erfolgreiche Besiedelung von cyanogenem Wirtsgewebe ermöglicht. Hierfür könnten weitere Faktoren, wie z.B. eine ATO, von Bedeutung sein. ATO könnte insbesondere zu Beginn des Befalls und somit vor Induktion der CHT die HCN-Toleranz von *S. loti* steigern (FRY und MYERS 1981). Für diese Vermutung sprechen auch die Ergebnisse von WANG et al. (1992), die zeigen konnten, dass auch Pilzpathogene die acyanogene Pflanze befallen, über CHT verfügen. VAN ETEN et al. (1995) berichten, dass auch CHT-defiziente Mutanten von *G. sorghi* befähigt sind cyanogene *Sorghum*-Pflanzen zu befallen.

Neben Tieren könnten auch Pflanzen über Rhodanase-Aktivität in ihren Geweben verfügen (WESTLEY 1973; VOLINI und ALEXANDER 1981). Der Rhodanase-Aktivitätsnachweis ist aber sehr umstritten, da eine präzise Messung der Enzymaktivität aus technischen Gründen nicht möglich ist (LIEBEREI und SELMAR 1990). HATZFELD und SAITO (2000) konnten allerdings zwei rhodanaseähnliche cDNAs aus *Arabidopsis thaliana* isolieren, deren Expression in *Pichia pastoris* eine höhere Rhodanase-Aktivität in den Zellextrakten zur Folge hatte. In jedem Fall ist die Rhodanase-Aktivität im Pflanzengewebe offensichtlich aber zu gering, um einen effektiven Schutz vor den Mengen an HCN, die hochcyanogene Pflanzen freisetzen, zu gewährleisten. Selbiges scheint auch für die bei Pflanzen vorkommende BCAS (AKOPYAN et al. 1975; DUNNILL und FOWDEN, 1965; FRY und MYERS 1981) zu gelten, da die den Ort der HCN-Freisetzung umgebenden Zelllagen absterben.

I. 4: Hintergrund Teil 2, Glycosidhydrolasen

Kohlenhydrate und kohlenhydrataktive Enzyme

Kohlenhydrate machen den Großteil der organischen Verbindungen im Pflanzengewebe aus und haben eine Vielzahl wichtiger physiologischer Funktionen. So z.B. als Kohlenstoff- und Energiequelle, bei der Abwehr von Pathogenen und in der Signaltransduktion (MINIC 2008). Die Synthese, die Modifikation und der Abbau von Kohlenhydraten gehören zu den fundamentalsten und wichtigsten Reaktionen (HENRISSAT et al. 2001). Die strukturelle und funktionale Diversität der Glycoside spiegelt sich auch in der Vielzahl der an ihrer Synthese (Glycosyltransferasen), Modifikation (Kohlenhydratesterasen) und ihrem Abbau (Glycosidhydrolasen und Polysaccharidlyasen) beteiligten Enzyme wieder (HENRISSAT et al. 2001). Diese werden allgemein als kohlenhydrataktive Enzyme (CAZYS: Carbohydrate-Active Enzymes) bezeichnet. Bei *Arabidopsis thaliana* wurden 730 offene Leseraster gefunden die CAZYS entsprechen (HENRISSAT et al. 2001). Diese gehören zwei der zuvor genannten Klassen von Enzymen an: den Glycosidhydrolasen (GH) und den Glycosyltransferasen (GT). 379 der 730 offenen Leseraster entsprechen GHs (HENRISSAT et al. 2001). Die Vielzahl an CAZYS dürfte auf die Notwendigkeit zurückzuführen sein, immer neue Glycoside umzusetzen zu müssen und könnte vor allem durch Genduplikation, die im Falle von GHs oft beobachtet wurde, erreicht worden sein (HENRISSAT et al. 2001). In diesem Fall wäre eine Kopie weiterhin für die Umsetzung des ursprünglichen Substrates zuständig, während die andere Anpassungen an ein neues, stereochemisch ähnliches Substrat erfahren könnte (HENRISSAT 1991). Um die Vielfalt unterschiedlicher CAZYS besser verstehen und ihre evolutionäre Entwicklung besser nachvollziehen zu können hatte HENRISSAT bereits 1991 vorgeschlagen, diese nicht einfach nach ihrer Substratspezifität zu ordnen, sondern vor allem Aminosäure-(AS)-Sequenzdaten zu nutzen. Zu Beginn wurden nur GHs berücksichtigt, die sich auf diese Weise in 35 verschiedene Familien einteilen ließen (HENRISSAT 1991). Mittlerweile werden auch GTs anhand ihrer AS-Sequenzen in Proteinfamilien eingeteilt. Zurzeit sind 87 GH-Familien, von denen für 41 eine repräsentative Enzym-3D-Struktur zur Verfügung steht, bekannt. GTs werden momentan in 56 Familien eingeteilt. Für 9 von diesen ist eine repräsentative 3D-Struktur bekannt.

Die aktuelle Familieneinteilung kann auf dem CAZY-Server unter <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/> eingesehen werden. Darüber hinaus finden sich Links zu den Sequenzinformationen und zu 3D-Strukturen. Außerdem sind die an der Katalyse beteiligten AS für jede Familie aufgeführt. Alle Informationen werden regelmäßig aktualisiert.

Glycosidhydrolasen

GHs sind Schlüsselenzyme des Kohlenhydratmetabolismus und kommen sowohl bei den Archaeobacteria als auch bei Eubacteria und Eukaryaota vor (HENRISSAT 1991). Das Fehlen bestimmter GHs führt beispielweise beim Menschen zur Lactoseunverträglichkeit (AURICCHIO et al. 1963). Der IUB-Nomenklatur entsprechend werden viele GHs unter der Bezeichnung EC 3.2.1.x geführt. Die ersten 3 Ziffern besagen, dass O-Glycoside gespalten werden. Die letzte Ziffer gibt Auskunft über das Substrat und zum Teil auch über den Katalysemechanismus. GHs mit ein und derselben Bezeichnung können sich aber in Bezug auf die AS-Sequenz und damit auch was die 3D-Struktur anbelangt, stark unterscheiden. Dies ist z.B. bei den Cellulasen der Fall, die auf mindestens 8 GH-Familien verteilt sind (DAVIES and HENRISSAT 2002). Auf der anderen Seite finden sich allerdings auch GHs, die sich bezüglich der Sequenz und der Struktur stark ähneln, aber unterschiedliche Reaktionen katalysieren. Dies gilt beispielsweise für die Mannanasen, Cellulasen, Glucanasen und Xylanasen der GH-Familie 5 (DAVIES and HENRISSAT 2002). Es gibt somit polyspezifische Familien, deren Mitglieder unterschiedliche EC-Nummern aufweisen.

In Pflanzen sind β -Glycosidasen der GH-Familie1 (GH1-BGLY) von zentraler Bedeutung. Sie spalten Substrate des Typs G-O-X und G-S-X, wobei G einen β -glycosidisch gebundenen Glucosyl-, Galactosyl-, Mannosyl-, Fucosyl-, 6-Phospho-Glucosyl-, 6-Phospho-Galactosyl- oder Glucuronid-Rest repräsentiert. X steht für einen weiteren Glycosyl-Rest oder für ein Aglycon (XU et al 2004). GH1-BGLY haben wichtige Funktionen in der Abwehr von Fraßfeinden (POULTON 1990; RASK et al. 2000; Ballhorn et al. 2005), in der Lignifizierung (DHARMAWARDHANA et al. 1995; VOß 2001), bei der Hydrolyse von Oligosacchariden aus der Zellwand im Rahmen der Keimung (LEAH et al. 1995) und in der Regulation der Aktivität von Phytohormonen (FALK und RASK 1995; DIETZ et al. 2000). Von mehr als zehn Enzymen der GH-Familie1 ist mittlerweile die dreidimensionale Struktur bekannt. Es handelt sich in allen Fällen um Proteine mit einer $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Faltung (XU et al. 2004). Am Katalysemechanismus sind zwei Glutaminsäurereste beteiligt, die jeweils in eine hochkonservierte Struktur eingebettet sind:

1. TF/LNEP (hier ermöglicht der Glutaminsäurerest [E] eine Säure-Base-Katalyse)
2. I/VT/SENG (hier ermöglicht der Glutaminsäurerest [E] eine nucleophile Katalyse).

Im ersten Schritt der Reaktion (Glycosylierung; siehe Abbildung I. 3) wird das Sauerstoffatom der glycosidischen Bindung protoniert (I. Säure-Katalyse). Der zweite an der Katalyse beteiligte Glutaminsäurerest greift das anomere Kohlenstoffatom nucleophil an (II.). Das Aglycon wird abgespalten (III.). Als Übergangszustand entsteht so eine glycosilierte Form des Enzyms (III.). Im zweiten Schritt (Deglycosylierung) aktiviert die zum Glutaminsäurerest des TFNEP-Motivs gehörende Carboxylgruppe ein Wassermolekül (IV. Base-Katalyse), das das C1-Atom des glycosilierten Enzyms

angreift (V). Dies führt zur Abspaltung des Zuckers und zur Regenerierung (VI.) des Enzyms (nach BURMEISTER et al. 2000).

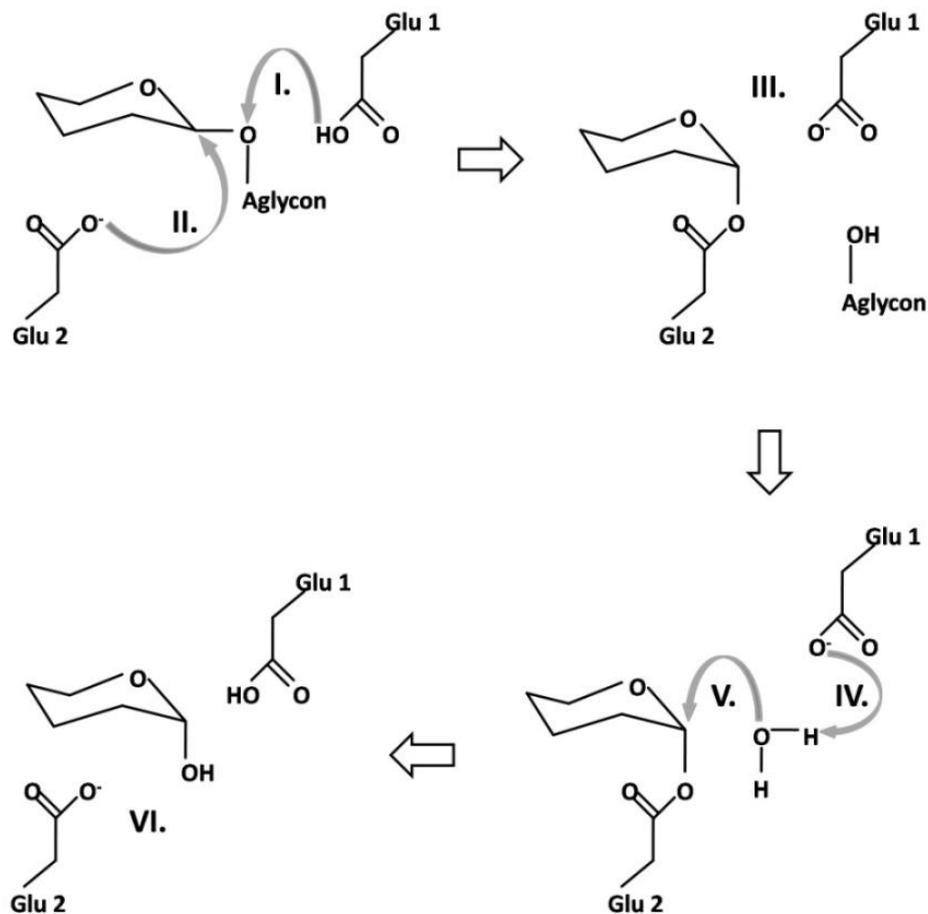


Abbildung I. 3: Katalysiemechanismus von GHs der Familie 1 (β-Glycosidasen mit TFNEP-Motiv)

Glu 1: Glutaminsäurerest des TF/LNEP-Motivs; Glu 2: Glutaminsäurerest des I/VT/SENG-Motivs; I.: Protonierung der O-glycosidischen Bindung; II.: nucleophiler Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom des Zuckers; III.: Spaltung des Glycosids; IV.: Deprotonierung des Wassermoleküls; V.: nucleophiler Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom des Zuckers; VI.: Regenerierung des Enzyms; (nach BURMEISTER et al. 2000)

Myrosinasen unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der GH1-BGLY durch das Fehlen des TF/LNEP-Motivs. Stattdessen weisen sie ein TINQL-Motiv auf, in dem Glutaminsäure durch Glutamin ersetzt ist. Eine Säure-Base-Katalyse wie bei den übrigen GH1-BGLY ist daher nicht möglich. Vermutlich benötigen Myrosinasen den Säure-Base-Katalysiemechanismus nicht, da die Aglyca der Glucosinolate hervorragende Abgangsgruppen sind (BURMEISTER et al. 1997).

Neben dem TF/LNEP- bzw. TINQL-Motiv und dem I/VT/SENG-Motiv sind GH-Familie 1 Enzyme noch durch eine Reihe weiterer konservierter Sequenzmotive charakterisiert. Sie sind in Tabelle I. 1 zusammengefasst.

Tabelle I. 1: Konservierte Sequenzmotive von GH-Familie1-Enzymen (Xu et al. 2004)

Die Einteilung von GH in Familien erfolgt anhand der AS-Sequenz. Konservierte Sequenzmotive, die sich bei allen Familienmitgliedern finden, sind dabei von zentraler Bedeutung. Im Falle von GH-Familie 1 gibt es insgesamt 6 konservierte Sequenzmotive.

Abfolge im Protein	Sequenzmotiv
1	S/AAY/FQV/WEG
2	RFSIWSRIFP
3	TF/LNEP bzw. TINQL
4	APGRCS
5	I/VT/SENG
6	GYFAWSLXDNFEW

I. 5: Hintergrund Teil 3, Reaktionen der Pflanze auf Gewebeverletzung

Systemin und Genexpression

1991 konnten PEARCE et al. erstmalig zeigen, dass Blätter der Tomate *Lycopersicon esculentum* als Reaktion auf Gewebeverletzung ein 18 Aminosäuren (AS) großes Peptid produzieren, das Systemin. Es handelte sich um das erste bei Pflanzen beschriebene Peptidhormon. Systemin induziert die Bildung von Methyljasmonat (MeJa) (TAIZ und ZEIGER 2000). MeJa wiederum ist an der Induktion verschiedener abwehrrelevanter Gene, wie beispielsweise dem der PAL (Phenylalaninammoniumlyase) und dem der POD (Peroxidase) beteiligt. Eine Akkumulation erfahren auch die PR-Proteine (PR: Pathogenesis Related) 1, 2 und 8 (REPKA et al. 2004). Bei PR 2 handelt es sich um eine Glucanase, bei PR 8 um eine Chitinase.

Reaktionen der Pflanze auf Gewebeverletzung

Gewebeverletzung durch Herbivorie sowie mechanischer Art löst neben der Bildung von Systemin und MeJa eine Vielzahl weitere Reaktionen seitens der Pflanze aus. So findet eine Akkumulation von IP₃ statt (MOSBLECH et al. 2008), die ihrerseits zu einer erhöhten Calciumkonzentration im Cytosol führen kann (TAIZ und ZEIGER 2000). Calcium bewirkt die Aktivierung unterschiedlicher Kinasen, wodurch Proteinfunktionen und die Expression moduliert werden (LODISH 1995; TAIZ und ZEIGER 2000; VOET et al. 2002). Für *L. esculentum* ist fernerhin eine verletzungsbedingte NO-Synthese beschrieben (HUANG et al. 2004). NO selbst ist aufgrund der hohen Reaktivität des Moleküls in größeren Mengen toxisch. Außerdem ist es an der Induktion abwehrrelevanter Gene wie der PAL und PR 1 beteiligt. Die Induktion von PR 1 erfolgt über Salicylsäure (SA), deren Biosyntheserate in Gegenwart von NO erhöht

ist. SA ist außerdem von zentraler Bedeutung für die Induktion der systemischen erworbenen Resistenz (SER; HUANG et al. 2004). Des Weiteren kann NO mit Glutathion zu S-Nitroso-Glutathion (GSNO) verknüpft werden. GSNO ist relativ stabil, weshalb angenommen wird, dass es als NO-Speicher dienen könnte. Darüber hinaus wird vermutet, dass GSNO auch in andere Gewebe transportiert wird und so an der Induktion der SER beteiligt ist (ROMERO-PUERTAS et al. 2004; LAMOTTE et al. 2005). In Gegenwart von NO erhöht sich außerdem die Calciumkonzentration im Cytosol. Wie im Falle von IP_3 bedingt diese die Aktivierung verschiedener Kinasen und letztlich eine Modulation von Proteinfunktionen und Expression (ROMERO-PUERTAS et al. 2004; LAMOTTE et al. 2005). Von zentraler Bedeutung ist die Nitrosilierung der Cysteinreste von Proteinen, die dazu führen kann, dass Enzymaktivitäten sekundenschnell erhöht oder verringert werden (MURAD 1986; WANG et al. 2006; ARASIMOVICZ und FLORYSZAK-WIECZOREK 2007). Gewebeverletzung führt auch zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie O_2^- . Das toxische Superoxid-Anion wird mittels Superoxiddismutase (SOD) u.a. in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. O_2^- reagiert außerdem mit NO zu $OONO^-$. $OONO^-$ kann die Nitrierung der Tyrosinreste von Proteinen bewirken. Im Gegensatz zur Nitrosilierung ist die Nitrierung allerdings irreversibel und führt meistens zu einem Funktionsverlust der betroffenen Proteine. Sowohl H_2O_2 als auch NO modulieren die Aktivität von MAP-Kinasen. Beide Moleküle greifen also auf diesem Wege in die Steuerung der Genexpression ein. H_2O_2 bewirkt außerdem die Oxidation von Cysteinresten. Auch auf diese Weise können Proteinfunktionen und Enzymaktivitäten moduliert werden. Nicht zuletzt könnten ROS bzw. H_2O_2 auch an der SA-Induktion beteiligt sein (ROMERO-PUERTAS et al. 2004; LAMOTTE et al. 2005) (siehe Abbildung I. 4).

γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde lange Zeit ausschließlich als Metabolit des Zellstoffwechsels betrachtet. Wie sich in den letzten Jahren zeigte handelt es sich bei GABA jedoch auch um einen Botenstoff. So ist GABA beispielsweise an der Lenkung des Pollenschlauchwachstums beteiligt (BOUCHÉ et al. 2003). Möglicher Weise spielt GABA darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Anpassung an niedrige Temperaturen (MAZZUCOTELLI et al. 2006). GABA wird auf eine Vielzahl von Stimuli hin akkumuliert. Beispielsweise als Reaktion auf Hitze- und Kälteschocks, aber auch bei Gewebeverletzung. Die Akkumulation erfolgt innerhalb von wenigen Minuten und führt zu 20 bis 40 fach höheren GABA-Konzentrationen im Gewebe (WALLACE 1984; BOWN und SHELP 1997; BOWN et al. 2006). Glutamat-Decarboxylase, auf deren Aktivität die GABA-Akkumulation zurückgeht, wird auf dem Calcium-Calmodulin-Weg aktiviert (YEVTUSHENKO et al. 2003).

GABA kann das Wachstum von Insektenlarven stark beeinträchtigen. In Binary-Choice-Experimenten zeigte *Heliothis virescens* eine Präferenz für *Nicotiana tabacum*-Blätter mit niedrigerem GABA-Gehalt. Die Befunde belegen, dass GABA eine Repellent-Funktion in Bezug auf Herbivore haben kann (BOWN et al. 2006) (siehe Abbildung I. 4).

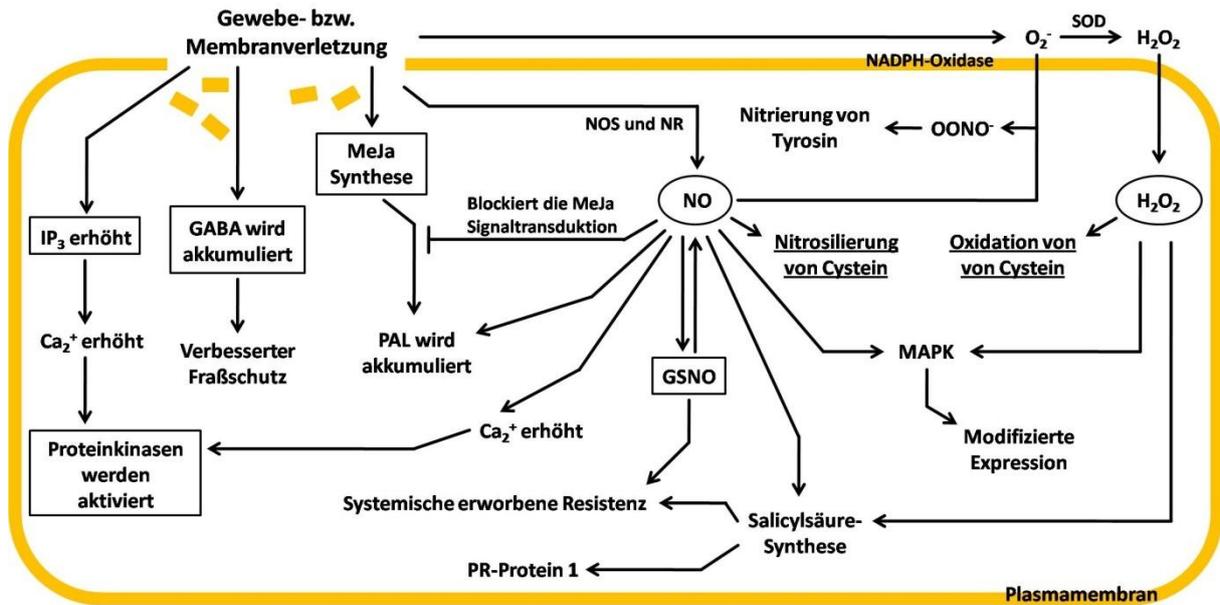


Abbildung I. 4: Reaktionen der Pflanze auf Gewebeverletzung (ROMERO-PUERTAS et al. 2004; HUANG et al. 2004; LAMOTTE et al. 2005; BOWN et al. 2006)

Pflanzen reagieren auf Gewebeverletzung mit der Synthese und Akkumulation einer Vielzahl von Verbindungen. Das Schema fasst einige dieser Verbindungen zusammen und gibt eine Übersicht über deren Funktion.

GABA: γ -Aminobuttersäure; GSNO: S-Nitroso-Glutathion; IP_3 : Inositoltriphosphat; MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase; MeJa: Methyljasmonat; NOS: NO-Synthase; NR: Nitritreduktase; PAL: Phenylalaninammoniumlyase; PR-Protein 1: Pathogenesis Related Protein 1; SOD: Superoxiddismutase

Interessanter Weise reichte bereits die Verletzung, die die Larven bei der Bewegung über die Blätter erzeugten aus, um eine lokale Freisetzung von O_2^- hervorzurufen und die Akkumulation von GABA einzuleiten (BOWN et al. 2006).

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

Kapitel 1: Eine durch Gewebeverletzung hervorgerufene Aktivierung von Linamarase und Hydroxynitrillyase beschleunigt die Blausäurefreisetzung

Zusammenfassung

Die aus verletztem Pflanzengewebe freigesetzte Blausäure (HCN) kann als Repellent gegen Herbivoren fungieren und spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die pflanzliche Interaktion mit Mikroorganismen. Entscheidend für die Abwehr von Fraßfeinden ist die Menge an HCN, die pro Zeiteinheit freigesetzt wird - die cyanogene Kapazität (HCNc). Bezüglich der HCNc wurden große Unterschiede zwischen Individuen ein und derselben Art gefunden. Diese sind durch den Genotyp bedingt. Hier nun kann gezeigt werden, dass in *Hevea brasiliensis*-Blättern eine Modulation der Cyanogenese durch posttranslationale Regulation der Aktivitäten der beteiligten Enzyme erfolgt. Linamarase (LIN) und Hydroxynitrillyase (HNL) weisen bei Gewebeverletzung beide eine 3 - 10 fach erhöhte Aktivität auf. Die Aktivierung erfolgt innerhalb von Sekunden und muss somit unabhängig von *de novo* Proteinsynthese sein. Sie ist auf das verletzte Gewebe beschränkt und führt zu einer beschleunigten HCN-Freisetzung. Die posttranslationale Aktivierung von LIN und HNL könnte somit eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Fraßfeinden spielen. Darüber hinaus könnte sie die Interaktion des Kautschukbaumes mit Pilzpathogenen beeinflussen.

1.1 Einleitung

Einflussgrößen der pflanzlichen Cyanogenese

Eine Repellent-Wirkung der Cyanogenese ist nur dann gegeben, wenn die Blausäure-Freisetzung schnell genug erfolgt (z.B. BALLHORN et al. 2005), die Cyanogenität einer Pflanze also ausreichend hoch ist. Letztere kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden (siehe Abbildung 1.1.1). Verändert wird dabei meistens der Gehalt bzw. die Aktivität des Gewebes an:

1. β -Glucosidase (BGLU)
2. Hydroxynitrillyase (HNL) und
3. cyanogenen Glucosiden (CG).

So nimmt bei *H. brasiliensis* im Zuge der Blattentwicklung vom C- zum D-Stadium sowohl die CG-Konzentration als auch die HNL-Aktivität im Gewebe ab (siehe Seite 5). Auch bei anderen Pflanzen spielt das Entwicklungsstadium eines Gewebes oder Organs in Bezug auf die Cyanogenität eine entscheidende Rolle. So speichern im Falle der Lima-Bohne nur junge Blätter größere Mengen an CGs. Ist die Entwicklung zum adulten Blatt abgeschlossen können nur noch äußerst geringe Gehalte nachgewiesen werden (BALLHORN et al. 2005). Ähnliches gilt für *Sorghum bicolor*. Lediglich bis zu 20 Tage alte Keimlinge verfügen über größere Mengen des CGs Dhurrin. Im Rahmen der weiteren Entwicklung sinkt der Gehalt in den Geweben der Pflanzen drastisch (HALKIER und MØLLER 1989).

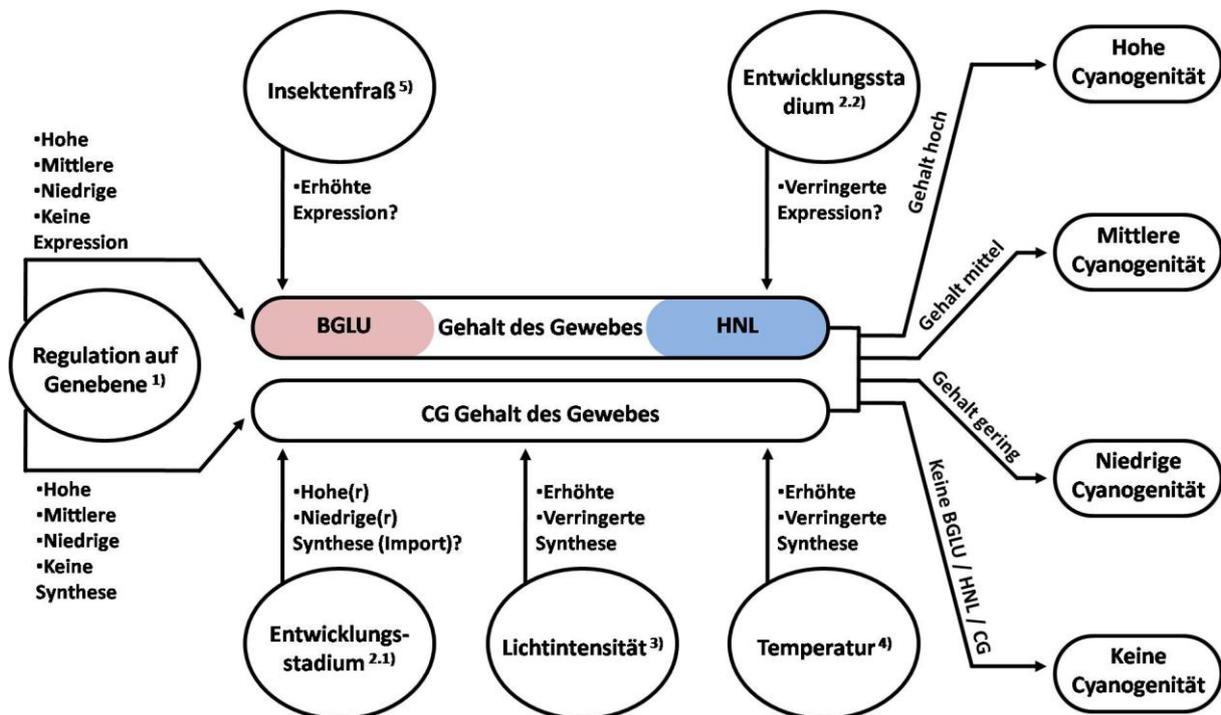


Abbildung 1.1.1: Einflussgrößen der pflanzlichen Cyanogenese

Die pflanzliche Cyanogenese wird durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren beeinflusst. Das Schema gibt einen Überblick zu einigen der bisher beschriebenen Einflussgrößen. Faktoren wie im InsektenSpeichel enthaltene β -Glycosidasen, β -Glycosidase-Inhibitoren oder Proteasen wurden bewusst nicht berücksichtigt.

1: *Trifolium repens* (HUGHES 1981); 2.1: *H. brasiliensis* (LIEBEREI et al. 1985); *Phaseolus lunatus* (BALLHORN et al. 2005); 2.2: *H. brasiliensis* (SELMAR et al. 1989); *Sorghum bicolor* (HALKIER und MØLLER 1989); 3: *Linum* (TRIONE 1960); 4: *Trifolium repens* (HUGHES 1981); 5: *Phaseolus lunatus* (BALLHORN et al. 2006); BGLU: β -Glucosidase; HNL: Hydroxynitrillyase; CG: cyanogene Glucoside

Bei *Trifolium repens* ist eine Regulation der Faktoren der Cyanogenese auf Genebene gut beschrieben. Ob ein Individuum hochcyanogen, niedrigcyanogen oder acyanogen ist hängt von zwei Genen ab, die als Li (Linamarase) und Ac (cyanogene Glucoside) bezeichnet werden. Pflanzen die über ein funktionales Allel von sowohl Li als auch Ac verfügen sind durch niedrige Cyanogenität

gekennzeichnet. Ist von einem der beiden Gene kein funktionales Allel vorhanden, so ist die entsprechende Pflanze acyanogen. Sind von beiden Genen ausschließlich funktionale Allele vorhanden ist das Individuum hochcyanogen (HUGHES 1981). Weitere Variabilität ergibt sich durch Unterschiede bezüglich der funktionalen Ac-Allele. So können diese offenbar entweder einen hohen Gehalt an CG, oder einen niedrigen Gehalt bedingen (HUGHES 1981). Entsprechend können Individuen durch eine besonders hohe, besonders niedrige oder aber mittlere Cyanogenität gekennzeichnet sein.

Eine Erhöhung der BGLU-Aktivität und damit verbunden eine erhöhte HCNC als Reaktion auf Insektenfraß konnte bei der Lima-Bohne nachgewiesen werden (BALLHORN et al. 2006). Da die Veränderung der Enzymaktivität erst nach 72 Stunden zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass sie mittels verstärkter Expression der BGLU erreicht wird, also durch eine Erhöhung der Enzymmenge bedingt ist. Eine Modifikation von bereits vorhandener BGLU, wie sie z.B. für PYK 10 aus *Arabidopsis thaliana*-Wurzeln beschrieben wurde (NAGANO et al. 2005), ist aufgrund der Zeitspanne von 72 Stunden unwahrscheinlich.

Nachgewiesen ist fernerhin der Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Gehalt an cyanogenen Vorstufen und damit auf die Cyanogenität. Weißklee der bei niedrigeren Temperaturen angezogen wurde als die Kontrollpflanzen, wies einen um 50 % erhöhten Gehalt an CG auf (HUGHES 1981). Ein weiterer bedeutsamer Umweltfaktor ist das Licht. Bei erhöhter Lichtintensität enthielten *Linum*-Pflanzen doppelt so viel CG wie die Kontrollpflanzen (TRIONE 1960; HUGHES 1981).

BGLU aus *H. brasiliensis*

Von BGLU aus Blättern des Kautschukbaumes ist bekannt, dass sie in Zusammenhang mit mechanischer Verletzung eine Aktivierung erfährt (VOß 2001). Bisher ist weder beschrieben, wie diese Aktivitätserhöhung realisiert wird, noch welcher Funktion sie dient. Anzunehmen ist, dass sie mit einer Erhöhung der Linamarase-Aktivität (LIN) einhergeht, da BGLU- und LIN-Aktivität beim Kautschukbaum auf ein und dasselbe Enzym zurückzuführen sind. In diesem Fall könnte die Enzymaktivierung eine beschleunigte Blausäure-Freisetzung ermöglichen. Der Aktivierungsprozess wäre dann von zentraler Bedeutung sowohl für die Abwehr von Herbivoren als auch für die Interaktion mit Pilzpathogenen. Die Linamarase-Aktivierung würde eine kurzfristige Modulation der cyanogenen Antwort ermöglichen und damit eine völlig neue Einflussgröße der pflanzlichen Cyanogenese darstellen. Aus diesen Gründen soll der Frage nachgegangen werden, ob die verletzungsbedingte Aktivierung der BGLU aus *H. brasiliensis*-Blättern auch eine beschleunigte Degradation von Linamarin zur Folge hat und ob sich diese auf die cyanogene Kapazität auswirkt.

Somit ergeben sich für dieses Kapitel folgende Fragestellungen und Zielsetzungen:

1. Beschreibung der verletzungsbedingten BGLU-Aktivierung in den Blattstadien B - D
2. Erfolgt die Aktivierung der BGLU schnell genug, um sofort für die Interaktion mit Herbivoren relevant zu sein?
3. Ist auch die Degradation von Linamarin verletzungsbedingt beschleunigt?
4. Wenn ja, wird auch HNL verletzungsbedingt aktiviert?
5. Wenn ja, wie wirkt sich eine Aktivierung beider Enzyme auf die Kinetik der HCN-Freisetzung aus?

1.2 Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Die im Rahmen der Experimente verwendeten *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta*, *Jatropha multifida* und *Euphorbia caracasana* Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert. Die Temperatur in den Kammern betrug 24 - 28 °C tagsüber und 22 °C bei Nacht. Die Luftfeuchtigkeit betrug 60 - 80 %. Die Pflanzen wurden unter Verwendung von Halogenlampen (IP 55 Philips®) 12 Stunden pro Tag künstlich beleuchtet (Photonen Flux: $1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Bewässerung war computergesteuert und erfolgte automatisch in kurzen Abständen zur Ergänzung der verdunsteten Wassermengen.

Auch die Kultivierung von *Phaseolus lunatus* und *Linum usitatissimum* erfolgte im Gewächshaus. Die Temperatur in der Kammer betrug 22 - 24 °C tagsüber und 18 - 20 °C bei Nacht. Die Luftfeuchtigkeit betrug 30 - 40 %. Die Pflanzen wurden ebenfalls unter Verwendung von Halogenlampen (IP 55 Philips®) künstlich beleuchtet. Allerdings 14 Stunden pro Tag (Photonen Flux: $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Bewässerung war ebenso computergesteuert und erfolgte automatisch in kurzen Abständen zur Ergänzung der verdunsteten Wassermengen.

Mechanische Gewebeverletzung und Probennahme

Die mechanische Verletzung des jeweiligen Blattgewebes erfolgte mit Hilfe einer Präpariernadel. 20 - 150 Einstiche pro definierte Blattfläche ($0,32 \text{ cm}^2$) simulierten einen leichten (20 Einstiche), mittleren (80 Einstiche) und hohen (150 Einstiche) Grad an Verletzung. Das entsprechende Blattgewebe wurde anschließend mit Hilfe eines Korkbohrers ($\varnothing = 0,64 \text{ cm}$) ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden sofort in Eppendorf®-Tubes überführt, in denen 100 μl eiskalter Puffer (Phosphatpuffer, $67 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphat; pH 6,4) und eine Spatelspitze PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) vorgegeben waren. Die Blattscheiben wurden mittels Pistills auf Eis homogenisiert. Das Pistill wurde mit zusätzlichen 100 μl des Extraktionspuffers gewaschen. Die Homogenate wurden 20 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). 150 μl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf®-Tube transferiert und im Folgenden für die Bestimmung von β -Glucosidase- (BGLU) und Hydroxynitrillyase-(HNL)-Aktivität verwendet.

Um zu testen in wie fern das Ausstanzen der Blattscheiben die BGLU- und HNL-Aktivität beeinflusst wurden ganze Blätter homogenisiert. Dazu wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren, im Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen und anschließend in eiskaltem Extraktionspuffer (Phosphatpuffer, $67 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphat; pH 6,4) homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 Minuten bei 16.000g zentrifugiert. Der Überstand (Proteinrohextrakt) wurde für die Bestimmung der BGLU- und HNL-Aktivität verwendet.

BGLU-Aktivität-Essays

Die BGLU-Aktivitätsmessung erfolgte nach HÖSEL und NAHRSTEDT (1975) unter Verwendung von para-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (pNPG; Fluka®). Eine $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Stammlösung des artifiziellen Substrats in Citratpuffer ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Citrat und $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Phosphat; pH 5,6) wurde angesetzt. Die Aktivitätstest erfolgten in 10 ml Reagenzgläsern. 5 - 100 μl des Proteinrohextraktes (in Abhängigkeit von der BGLU-Aktivität) wurden mit Citratpuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. 1 ml der Substrat-Stammlösung wurde hinzugegeben. Die Ansätze wurden 5 - 10 Minuten bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert. Bei extrem niedriger BGLU-Aktivität (siehe *E. caracasana* und *J. multifida*) musste die Inkubationszeit verlängert werden. Die Reaktion wurde durch Überführen von 500 μl des jeweiligen Reaktionsansatzes in ein neues Reagenzglas, in dem 1 ml eiskalte Natriumcarbonatlösung ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vorgegeben war, abgebrochen. Anschließend wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 400 nm vermessen (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec® 3000).

Bei Verwendung von Linamarin als Substrat für die Quantifizierung der BGLU- bzw. Linamarase-Aktivität, wurden sowohl Reagenzgläser als auch luftdicht verschließbare Thunberggefäße verwendet, um einen HCN-Verlust ausschließen zu können. In den Thunberggefäßen wurden 2,5 - 10 μl Proteinrohextrakt vorgegeben und mit Citratpuffer (s.o.) auf 500 μl aufgefüllt. Anschließend wurden 500 μl einer $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Linamarin-Stammlösung hinzupipettiert. Die Reaktionsansätze wurden 5 - 10 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Natronlauge (NaOH; $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) aus der Seitenbirne des Gefäßes gestoppt. NaOH bewirkt außerdem den kompletten Zerfall von Acetoncyanhydrin (COOKE 1978) und die Bildung von im Gegensatz zu HCN nicht flüchtigem Natriumcyanid (NaCN). 100 μl der jeweiligen Reaktionsansätze wurden in 20ml-Reagenzgläser überführt, in denen 4,8 ml destilliertes Wasser sowie 100 μl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Salzsäure (HCl) vorgegeben waren. Die Cyanidkonzentration wurde mit Hilfe des Cyanidtests Spektroquant® (Merck) photometrisch bei einer Wellenlänge von 585 nm bestimmt. Der Test beruht auf der Umwandlung des Cyanids in Chlorcyan, das mit Pyridin zu Glutacondialdehyd reagiert. Durch Kondensation von 1,3-Dimethylbarbitursäure mit dem Glutacondialdehyd entsteht ein violetter Polymethinfarbstoff ($\epsilon = 131\,600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mit einer maximalen Absorption bei 585 nm. Aus der Konzentration des Farbstoffs kann auf den Gehalt cyanogener Vorstufen geschlossen werden, da ein Mol Polymethinfarbstoff einem Mol Cyanid entspricht (BALLHORN 2005).

Bei Nutzung von Reagenzgläsern für das Ansetzen der Reaktionen wurden ebenfalls 2,5 – 10 μl der bereits zuvor verwendeten Proteinrohextrakte vorgegeben und mit Citratpuffer (s.o.) auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 1 ml der $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Linamarin-Stammlösung hinzupipettiert. Die Reaktionsansätze wurden 5 - 10 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Durch Überführen von 500 μl des jeweiligen Reaktionsansatzes in eine neues Reagenzglas, in dem eine gleiche Menge an

NaOH ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vorgegeben war, wurde die Reaktion abgebrochen. Der Cyanidgehalt der Lösungen wurde wie zuvor beschrieben ermittelt.

Um darüber hinaus die Menge an gebildeter HCN bestimmen zu können, wurde die Reaktion durch Überführen von 50 μl des Inkubationsansatzes in ein 20ml-Reagenzglas, in dem 5 ml destilliertes Wasser sowie die erste Komponente des Spektroquant®-Kits vorgegeben waren, abgebrochen. Aufgrund des leicht sauren pH-Wertes dieser Lösung zerfällt das Acetoncyanhydrin nur sehr langsam, so dass lediglich die bereits während der Inkubation gebildete HCN erfasst wird. Da letztere aber noch dissoziiert, bleibt sie bis zur - sowie bei der Bestimmung - in Lösung (siehe auch Bestimmung der HNL-Aktivität nach SELMAR 1987b).

Den Regeln der IUPAC entsprechend sollte die Enzymaktivitätsbestimmung bei 25 °C erfolgen. In den hier vorgestellten Experimenten wurden die Reaktionsansätze den Angaben von HÖSEL und NAHRSTEDT (1975) entsprechend jedoch abweichend bei 30 °C inkubiert, was eine geringfügige Erhöhung der Substratumsatzraten zur Folge hat. Dies muss bei einem Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus anderen Arbeiten berücksichtigt werden. Selbiges gilt für die Bestimmung der HNL-Aktivität.

HNL-Aktivität-Essay

Die Bestimmung der HNL Aktivität erfolgte nach SELMAR (1987b) unter Verwendung von Acetoncyanhydrin (Merck®) als Substrat. Acetoncyanhydrin ist relativ instabil und zerfällt, vor allem im alkalischen pH-Bereich, spontan (siehe Einleitung und BGLU-Aktivität Essays). Die Stammlösung wurde daher immer wenige Minuten vor der Messung frisch angesetzt. Hierzu wurde das Acetoncyanhydrin 1 zu 10 in Citronensäurelösung ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) verdünnt. 20 - 100 μl des jeweiligen Proteinrohextraktes wurden in 10ml-Reagenzgläsern mit Citratpuffer (s.o.) auf 1,98 ml aufgefüllt. 20 μl der Stammlösung wurden hinzugegeben und die Ansätze bei 30 °C im Wasserbad 5 Minuten inkubiert. Von jedem der Essays wurden 20 μl in 20ml-Reagenzgläser überführt, in denen 5 ml destilliertes Wasser sowie die erste Komponente des Spektroquant®-Kits vorgegeben waren. Die Quantifizierung des Cyanidgehaltes erfolgte wie zuvor beschrieben.

Quantifizierung des aus Blättern freigesetzten HCN

Die Bestimmung der HCN-Freisetzung pro Zeiteinheit (HCNc) erfolgte mit Hilfe einer Durchstromapparatur (Abbildung 1.2.1) wie von BALLHORN et al. (2005) beschrieben. Eine Aquariumpumpe (1) generierte einen kontinuierlichen Luftstrom (schwarze Pfeile symbolisieren die Richtung des Luftstrom) durch ein System bestehend aus einem Luftbefeuchter (2), einem Erlenmeyerkolben (3) in dem sich die Blattprobe befand und der mit Hilfe eines Wasserbades (4) auf

30 °C temperiert wurde sowie mit jeweils 10 ml $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH-Lösung gefüllten Reagenzgläsern (5) in denen HCN als NaCN zurückgehalten wurde.

Die HCN-Freisetzung wurde durch Zugabe von 500 µl Chloroform zum Blattgewebe initiiert, welches einen kompletten Verlust der Zellintegrität verursacht (zur Methode siehe auch BALLHORN et al. 2005). Die gebildete HCN wurde über einen Zeitraum von einer Stunde gesammelt, wobei die Reagenzgläser mit der NaOH-Lösung alle 10 Minuten gewechselt wurden. Die Quantifizierung der Cyanidmenge erfolgte wie zuvor beschrieben.

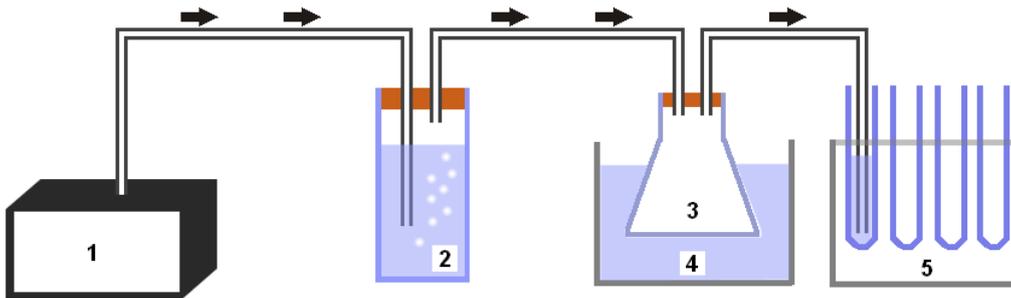


Abbildung 1.2.1: Durchstromapparatur zur HCN-Bestimmung (nach BALLHORN et al. 2005)

1: Aquariumpumpe; 2: Luftbefeuchter; 3: Erlenmeyerkolben mit Blattprobe; 4: Wasserbad; 5: Reagenzgläser mit NaOH-Lösung zum Auffangen der HCN; Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Richtung des Luftstroms.

Quantifizierung der im Gewebe gespeicherten, cyanogenen Vorstufen (HCNp)

Zur Bestimmung des HCNp wurden die Blätter zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter Zugabe von PVPP (Polyvinylpyrrolidon) zu einem feinen Pulver vermahlen. Das Pulver wurde in einer möglichst geringen Menge di-Natriumhydrogenphosphat ($67 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) aufgenommen. Das so erhaltene Homogenat wurde zunächst über einen Wattefilter gereinigt und anschließend mit 16.000 g und bei 3 °C 20 Minuten zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge® fresco). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf®-Tube überführt. Die di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung und die genutzten Geräte waren auf 3 °C vorgekühlt. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

Aliquots des Blatthomogenats wurden mit BGLU aus *H. brasiliensis* inkubiert. Für die Inkubation wurden gasdicht abschließende Thunberggefäße verwendet. Die Inkubationsansätze bestanden aus 50 µl Blatthomogenat, 450 µl Citratpuffer (s.o.), 100 µl BGLU-Lösung und 600 µl $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH-Lösung, die in die separate Seitenbirne der Thunberggefäße pipettiert wurde. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe der NaOH-Lösung aus der Seitenbirne der Gefäße abgebrochen. Durch die Alkalisierung der Lösung wurde außerdem die Blausäure aus den Hydroxynitrilen freigesetzt und in Form ihres Natriumsalzes gebunden. Die Quantifizierung der Cyanidmenge erfolgte wie zuvor beschrieben.

Untersuchung von Pflanzenmaterial auf Cyanogenität

E. caracasana und *J. multifida* wurden mittels Feigl-Anger-Papier auf Cyanogenität getestet, wobei *H. brasiliensis* und *M. esculenta* als Positiv-Kontrollen dienen. Für die Herstellung des Feigl-Anger-Papiers wurden zunächst 5,2 g Acetoaceticacidethylester (Sigma) und 6,38 g Kupfer(II)-Sulfat (Merck) unter ständigem Rühren, für einen Zeitraum von 8 Stunden, in 100 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wurde im Verhältnis 1 zu 1 mit 10 %igem 4-, 4-Tetramethyldiaminodiphenylmethan (in Chloroform) gemischt. Unter ständigem Rühren wurde Filterpapier in diese Lösung getaucht und anschließend unter dem Abzug getrocknet und in Streifen geschnitten. Die Filterpapierstreifen konnten dann für die Blausäuredetektion verwendet werden. Die Detektion beruht auf der Komplexbildung des Cyanids durch das Kupfer. Der Komplex ist von dunkelblauer Farbe.

Für die Untersuchung auf HCN-Freisetzung wurden ganze Blätter von *H. brasiliensis*, *M. esculenta*, *E. caracasana* und *J. multifida* in verschließbare Reagenzgläser eingebracht. Oberhalb der jeweiligen Blattprobe wurde ein Streifen Feigl-Anger-Papier fixiert. Die Zerstörung der Zellintegrität wurde durch die Zugabe von 1 ml Chloroform erreicht. Anschließend wurden die Reagenzgläser mit Deckeln luftdicht verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

1.3 Ergebnisse

Aktivität von BGLU und HNL in verletztem Blattgewebe

Blattgewebe von 5 unterschiedlichen *Hevea brasiliensis* Pflanzen, die im Folgenden als Pflanze 1, 2, 3, 4, und 5 bezeichnet werden sollen, wurde auf die jeweilige β -Glucosidase (BGLU) und Hydroxynitrillyase (HNL) Aktivität hin untersucht. Die fünf Pflanzen waren durch eine BGLU-Aktivität von $0,29 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 5) bis $1,15 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2) (Abbildung 1.3.1) und eine HNL-Aktivität von $1,4 \pm 0,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 3) bis $3,0 \pm 1,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2) charakterisiert (Abbildung 1.3.1). Mechanische Verletzung des Blattgewebes führte zu einer Erhöhung von BGLU- und HNL-Aktivität. In zerstörtem Blattgewebe wurden BGLU-Aktivitäten von $3,9 \pm 0,9 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 5) bis $11,0 \pm 1,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2) gemessen. Die BGLU-Aktivität ist somit gegenüber den in intaktem Blattgewebe festgestellten Werten um bis zu 14-fach erhöht (Abbildung 1.3.1). Bezüglich der HNL wurden Aktivitäten von $7,1 \pm 0,8 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 3) und $30,4 \pm 7,7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2) gemessen. Die HNL-Aktivität ist somit, verglichen mit den Werten für die intakten Blätter, bis zu 10-mal so hoch (Abbildung 1.3.1). Diese Veränderung bezüglich der Aktivität der beiden Enzyme soll im Folgenden als Aktivierung von BGLU und HNL bezeichnet werden, der Quotient aus der in verletztem Gewebe gemessenen Aktivität und der in intaktem Gewebe festgestellten als Aktivierungsfaktor. In Tabelle III. 1.1 im Anhang (Seite 172) sind die BGLU- und HNL-Aktivitäten aller untersuchten Pflanzen zusammengefasst.

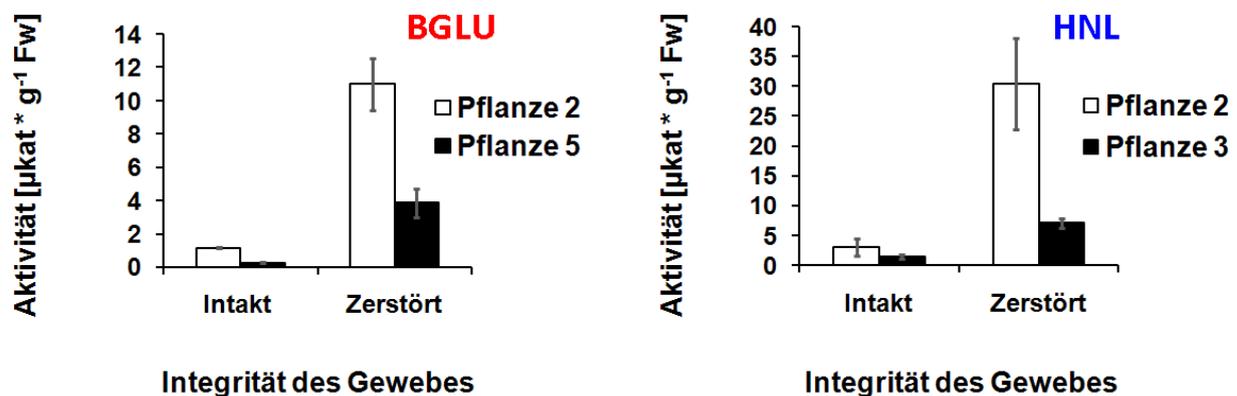


Abbildung 1.3.1: BGLU- und HNL-Aktivität in intaktem und verletztem Blattgewebe von *H. brasiliensis*

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel verletzt. Anschließend wurden sowohl die verletzten, als auch intakte Blattbereiche ausgestanzt und die BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Da auch das Ausstanzen der Blattscheiben im Rahmen der Beprobung eine Verletzung darstellt, sollte zunächst überprüft werden inwieweit diese Verletzung zur Aktivierung von BGLU und HNL beiträgt.

Hierzu wurde, neben der üblichen Beprobung mittels Korkbohrer, ein Teil der Spreite schockgefroren und anschließend homogenisiert (tatsächlicher Nullwert der Enzymaktivität). Der Vergleich der Enzymaktivitäten in den Überständen aus den beiden Aufarbeitungsmethoden ermöglicht die Abschätzung einer durch die Standardaufarbeitung bedingten Veränderung hinsichtlich BGLU und HNL. Die Standardaufarbeitung ergab bezüglich der BGLU-Aktivität einen Wert von $0,50 \pm 0,00 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Im Gewebe, welches vor der Proteinextraktion schockgefroren wurde, konnte ein Wert von $0,34 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen werden (Abbildung 1.3.2). Die im Zuge der Aufarbeitung erfolgende Verletzung führt somit, was die BGLU-Aktivität anbelangt, zu einer Abweichung von 32 %. Es ergibt sich also ein Aktivierungsfaktor (AF) von knapp 1,5. Da bei starker Verletzung AFs von bis zu 14 gemessen wurden, soll die Abweichung, die aus der Aufarbeitung resultiert, im Folgenden vernachlässigt werden.

Die Standardaufarbeitung ergab, was die Aktivität der HNL anbelangt, einen Wert von $2,4 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Im Gewebe, welches vor der Proteinextraktion schockgefroren wurde, betrug sie $1,9 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Abbildung 1.3.2). Die Abweichung liegt hier somit bei 22 %, der AF bei knapp 1,3. Da bezüglich der HNL verletzungsbedingte AFs von bis zu 10 festgestellt wurden, soll auch hier die Abweichung vom tatsächlichen Nullwert künftig vernachlässigt werden.

Festgehalten werden soll noch, dass die Veränderung der BGLU- und HNL-Aktivität somit in erster Linie auf die mechanische Verletzung mittels Präpariernadel zurückzuführen ist. Eine Berücksichtigung der Abweichungen von den tatsächlichen Nullwerten würde daher zu einer Erhöhung der AFs und somit zu noch deutlicheren Unterschieden zwischen intaktem und verletztem Blattgewebe führen.

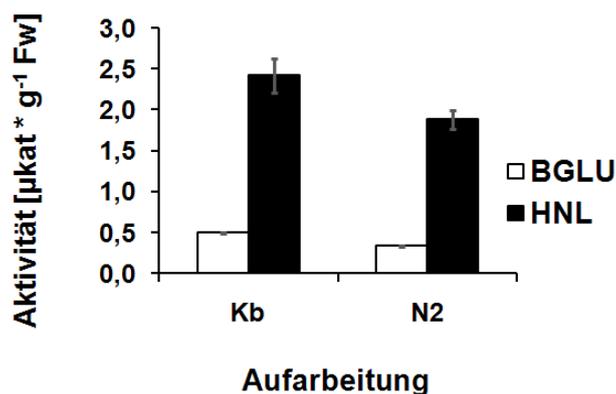


Abbildung 1.3.2: Einfluss der Verletzung bei der Probennahme mittels Korkbohrer auf die BGLU- und HNL-Aktivierung

Kb: Ausstanzung der Blattprobe mittels Korkbohrer (Standardmethode); **N₂:** Intakte Blätter wurden, zur Vermeidung jedweder verletzungsbedingten Enzymaktivierung, vor dem Homogenisieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Tatsächlicher Nullwert). Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität in den Proteinrohextrakten bestimmt. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Proteinrohextrakte aus intaktem Gewebe enthalten, im Gegensatz zu denen aus verletztem Gewebe, noch Linamarin. Dieses könnte mit pNPG um die Substratbindungsstellen konkurrieren und so zu den gemessenen Aktivitätsunterschieden führen, was aber aufgrund der starken Verdünnung (Faktor 5000) im Inkubationsansatz unwahrscheinlich ist. Um eine Beeinflussung der Messungen durch Linamarin mit Sicherheit ausschließen zu können wurden Proteinrohextrakte für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bis kein Linamarin mehr in den Ansätzen vorhanden war. Dies änderte nichts an dem Aktivitätsunterschied zwischen Proteinrohextrakten aus intaktem und verletztem Gewebe (Daten nicht gezeigt).

Abhängigkeit der BGLU- und HNL-Aktivierung vom Grad der Gewebeverletzung

Der Grad der Enzymaktivierung hängt vom Grad der Gewebeverletzung ab, wobei letzterer durch die Anzahl der Einstiche repräsentiert wird. Eine geringfügige Gewebeverletzung (entspricht 20 Einstichen) hatte eine BGLU-Aktivität von $1,2 \pm 0,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 1) zur Folge. Die HNL-Aktivität betrug $2,6 \pm 0,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2). Mit AFs von 1,3 (BGLU) und 1,5 (HNL) sind die Aktivitäten somit nur geringfügig erhöht (intaktes Gewebe: BGLU $0,96 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ und HNL $1,8 \pm 0,5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$). Ein mittlerer Grad der Gewebeverletzung (entspricht 80 Verletzungen) bedingte eine 2,8-fach (AF) erhöhte BGLU-Aktivität und eine 2,2-mal (AF) höhere HNL-Aktivität (80 Einstiche: BGLU $2,7 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ und HNL $3,9 \pm 0,7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$). Im Falle von starker Gewebeverletzung (entspricht 150 Einstichen) betrug der AF für BGLU 8,3 und für HNL 4,3 (150 Einstiche: BGLU $7,9 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ und HNL $7,6 \pm 1,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$) (siehe Abbildung 1.3.3).

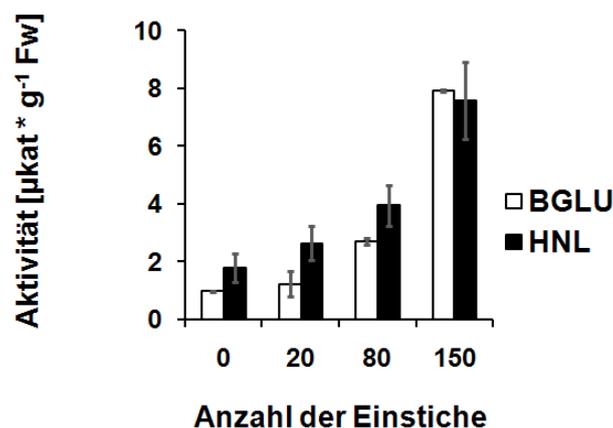


Abbildung 1.3.3: Abhängigkeit der Stärke der BGLU- und HNL-Aktivierung vom Grad der Gewebeverletzung

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel verletzt. Die Anzahl der Einstiche repräsentiert den unterschiedlichen Grad der Gewebeverletzung. Anschließend wurden sowohl die verletzten, als auch intakte Blattbereiche ausgestanzt und die BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. BGLU: β -Glucosidase; HNL: Hydroxynitrilase; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Zeitlicher Verlauf der BGLU- und HNL-Aktivierung

Die Aktivierung erfolgt innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes. 30 Sekunden nach der Gewebeverletzung weist sowohl BGLU als auch HNL mit Messwerten von $6,6 \pm 1,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ und $10,9 \pm 1,8 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ maximale Aktivität auf (siehe Abbildung 1.3.4). Die Nullwerte lagen bei $1,4 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (BGLU) und $1,3 \pm 0,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (HNL). Innerhalb der folgenden 10 Minuten nach Gewebeverletzung konnte keine weitere Erhöhung der Enzymaktivitäten festgestellt werden. Was BGLU angeht lag der Substratumsatz bei $6,2 \pm 0,5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (nach 5 Minuten) und $6,7 \pm 1,0 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (nach 10 Minuten). Im Falle der HNL betrug die Enzymaktivität $11,0 \pm 1,7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (nach 5 Minuten) und $10,2 \pm 2,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (nach 10 Minuten) (siehe Abbildung 1.3.4).

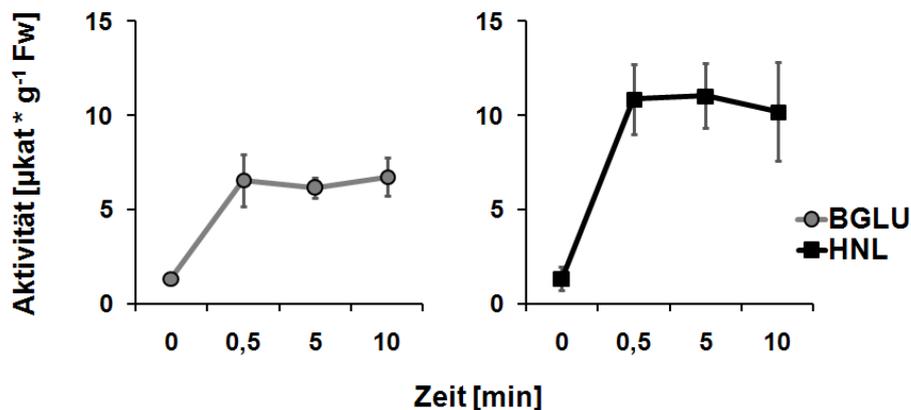


Abbildung 1.3.4: Zeitverlauf der Aktivierung von BGLU und HNL

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem mittleren Grad der Gewebezerstörung (80 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen nach 30 Sekunden, 5 und 10 Minuten beprobt. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Die Aktivierung von BGLU und HNL ist lokal begrenzt

Wie die Abhängigkeit vom Grad der Gewebeverletzung vermuten lässt, ist der Aktivierungsprozess auf die beschädigten Blattbereiche beschränkt. Gewebe, das die verletzten Bereiche umgibt (zur Probennahme siehe Abbildung 1.3.5 A), weist keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Aktivität von BGLU und HNL auf. Intaktes Blattgewebe der Pflanze 3 war durch eine BGLU-Aktivität von $0,41 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ charakterisiert. In verletztem Gewebe wurde eine Aktivität von $4,2 \pm 0,9 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Gewebe aus den umliegenden Bereichen der Verletzung wies eine BGLU-Aktivität von $0,51 \pm 0,14 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ („Nahe 1“) und $0,46 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ („Nahe 2“) auf (siehe Abbildung 1.3.5 B). In verletztem Gewebe ist die BGLU-Aktivität also 10-fach (AF) höher als in intaktem Gewebe. In verletzungsnahen Blattbereichen ist sie hingegen lediglich 1,2- (AF „Nahe 1“) bzw. 1,1-mal (AF „Nahe 2“) so hoch.

Blätter der Pflanze 2 hatten eine HNL-Aktivität von $1,8 \pm 0,5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. In verletztem Gewebe hingegen wurden $8,3 \pm 2,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ festgestellt. Gewebe aus den Bereichen um die Verletzung herum wiesen eine HNL-Aktivität von $2,2 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ („Nahe 1“) und $2,2 \pm 1,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ („Nahe 2“) auf (siehe Abbildung 1.3.5 B). Im Falle des verletzten Gewebes beträgt der AF somit 4,6. Bei Gewebe aus den umliegenden Bereichen der Verletzung beträgt er hingegen nur 1,2 („Nahe 1“ und „Nahe 2“).

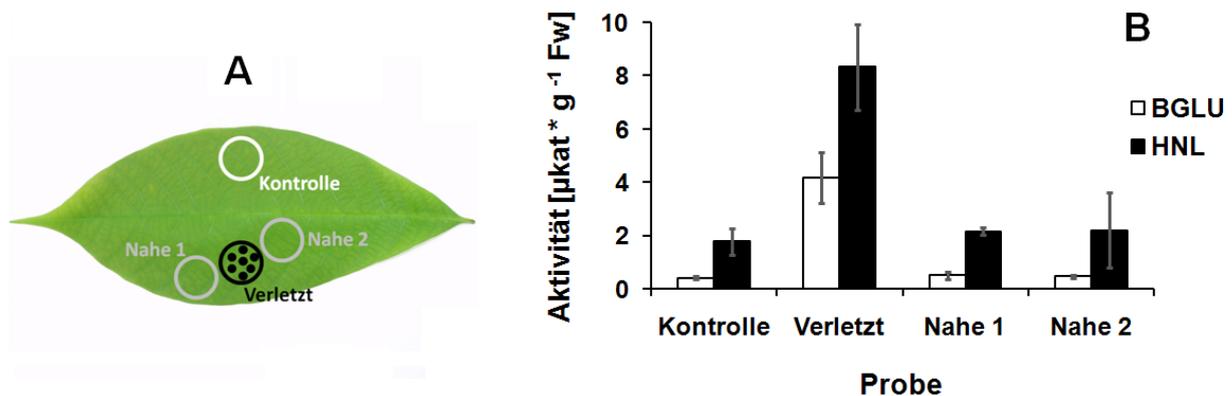


Abbildung 1.3.5: Beschränkung der Aktivierung von BGLU und HNL auf den Bereich der Gewebeverletzung

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die Blattflächen der Darstellung (A) entsprechend beprobt. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt.

A: Darstellung der Probenahme; **B:** Enzymaktivitäten; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Blattstadienspezifische Aktivierung von BGLU und HNL

Die Aktivierung von BGLU und HNL konnte in allen Blattstadien festgestellt werden (zu den Blattstadien siehe Seite 5). Bezüglich BGLU wurden in intaktem Gewebe der Stadien B, C und D $0,29 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$, $0,34 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ und $0,57 \pm 0,09 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen (Pflanze 5). Nach Gewebeverletzung erhöhte sich die Aktivität auf $3,9 \pm 0,9 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (B), $3,4 \pm 0,8 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (C) und $3,7 \pm 0,7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (D) (siehe Abbildung 1.3.6). Bezüglich des B-Stadiums beträgt der AF somit 14, im Falle des C-Stadiums 10 und bei Stadium D 6.

In D-Stadien nimmt, auch was HNL anbelangt, der Substratumsatz als Folge der mechanischen Gewebeverletzung um das 5 - 10 fache zu (siehe Abbildung 1.3.1). Intaktes Blattgewebe der Pflanze 3 wies eine HNL-Aktivität von $1,4 \pm 0,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ auf. In verletztem Blattgewebe war sie auf $7,1 \pm 0,8 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ erhöht (siehe Abbildung 1.3.6), was einem AF von 5,1 entspricht.

In B- und C-Stadien hingegen kann der Aktivitätsunterschied bzw. die Aktivierung geringer ausfallen. Intakte Blätter der Pflanzen 3 und 4 waren durch eine HNL-Aktivität von $9,0 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$

(Stadium B; Pflanze 4) und $6,0 \pm 0,8 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Stadium C; Pflanze 3) charakterisiert. Bei Verletzung erhöhte sich die Aktivität auf $12,8 \pm 0,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (B) bzw. $9,1 \pm 0,6 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (C) (siehe Abbildung 1.3.6). Der AF beträgt in diesen Fällen somit lediglich 1,4 bezüglich des B-Stadiums und 1,5 bezüglich des C-Stadiums. Der Befund lässt sich mit der hohen HNL-Grundaktivität in diesen Blattstadien erklären. Während sich die Werte, was das verletzte Gewebe anbelangt, zwischen C- und D-Stadium nur um den Faktor 1,3 unterscheiden, beträgt letzterer bei einem Vergleich der im intakten Gewebe gemessenen Aktivitäten 4,3.

Im Falle von Pflanze 1 wurde im intakten Blattgewebe von B-Stadien eine HNL-Aktivität von $2,5 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Im C-Stadium betrug sie $2,4 \pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ womit sie nur knapp doppelt so hoch ist wie bei intakten D-Stadien, bei denen sie $1,3 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ betrug. Bei Gewebeverletzung stieg die HNL-Aktivität auf $9,7 \pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ in den B-Stadien und auf $6,5 \pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ in den C-Stadien (siehe Abbildung 1.3.6; Messwerte sind mit einem Stern gekennzeichnet). Der AF beträgt somit 3,8 bezüglich des B-Stadiums und 2,8 was das C-Stadium anbelangt, was noch einmal unterstreicht, dass die marginale Aktivierung von HNL im Falle einiger B- und C-Stadien auf die hohe Grundaktivität des Enzyms zurückzuführen ist.

Blätter des Stadiums A wurden aufgrund ihrer geringen Größe nicht mit in die Untersuchungen einbezogen.

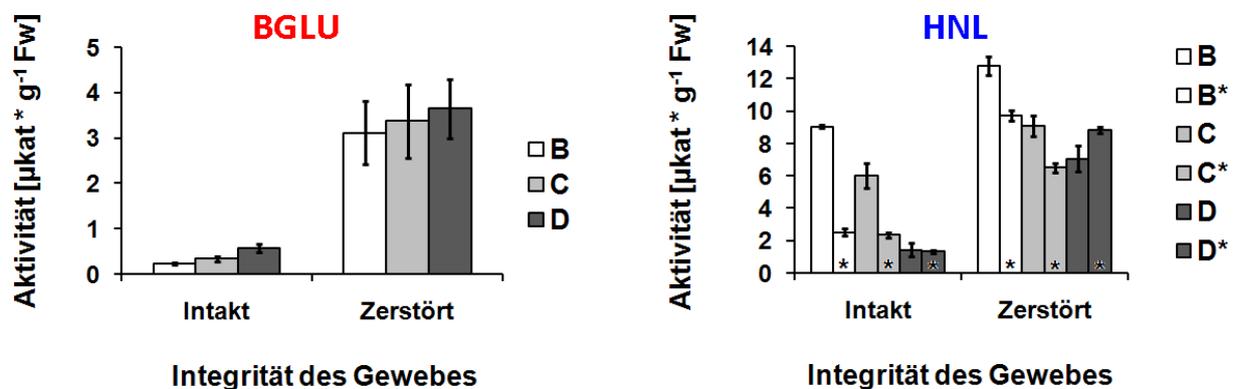


Abbildung 1.3.6: Blattstadienspezifische Aktivierung von BGLU und HNL

Blätter der Stadien B, C und D wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt.

*: Proben von Pflanze 1; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Aktivierung der Linamarase durch mechanische Gewebeerletzung

Die BGLU-Aktivität wurde nach HÖSEL und NAHRSTEDT (1975) mit Hilfe des artifiziellen Substrates pNPG bestimmt. Um zu prüfen ob auch die Linamarase (LIN) eine verletzungsbedingte Aktivierung erfährt wurden die Inkubationen mit Linamarin wiederholt. In unverletztem Blattgewebe wurde eine

LIN-Aktivität von $1,9 \pm 0,5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Verletzung des Gewebes hatte eine Erhöhung auf $11,7 \pm 1,8 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ zur Folge (siehe Abbildung 1.3.7), was einem Aktivierungsfaktor von 6 entspricht. Somit ist, genau wie auch im Falle von pNPG, bei Verwendung von Proteinrohextrakten aus verletztem Gewebe ein stark beschleunigter Linamarinumsatz festzustellen.

Mechanische Gewebeverletzung führt bei *H. brasiliensis* also zu einer sekundenschnellen Aktivierung von LIN, was eine beschleunigte Degradation von Linamarin ermöglicht. Der Versuch zeigt außerdem, dass pNPG wie erwartet als Substrat genutzt werden kann, um Veränderungen bezüglich der LIN-Aktivität zu dokumentieren.

Alle Messungen zur HNL-Aktivität wurden mit deren natürlichem Substrat Acetoncyanhydrin durchgeführt. Es bleibt also festzuhalten, dass mechanische Gewebeverletzung bei *H. brasiliensis*, blattstadien- und individuen-spezifisch, auch zu einer sekundenschnellen Erhöhung der HNL-Aktivität führt, die eine beschleunigte Degradation von Acetoncyanhydrin ermöglicht.

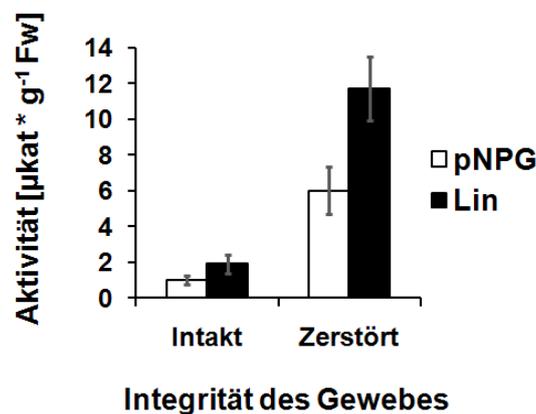


Abbildung 1.3.7: Beschleunigung des Linamarinumsatzes durch Aktivierung der LIN

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurde die BGLU bzw. LIN-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Dabei wurde sowohl pNPG als auch Linamarin als Substrat verwendet.

pNPG: para-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid; **Lin:** Linamarin; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Die Aktivierung von LIN und HNL bedingt *in vitro* eine erhöhte HCN-Freisetzung

Die Aktivierung von LIN und HNL sollte, da diese beiden Enzyme die für die Blausäurebildung erforderlichen Umsetzungen tätigen, zu einer beschleunigten HCN-Freisetzung führen. Um dies zu prüfen wurde die Freisetzung aus Linamarin durch Proteinrohextrakt (PRE) aus intakten und verletzten Blättern verglichen. PRE unverletzter Blätter der Pflanzen 1 und 5 setzten $34 \pm 9 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ bzw. $53 \pm 3 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ frei. Die Verletzung des Blattgewebes führte zu

einer Erhöhung der Freisetzung pro Zeiteinheit auf $216 \pm 33 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 1) bzw. $224 \pm 25 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 5) (siehe Abbildung 1.3.8), die HCN-Freisetzung aus Linamarin ist somit - bedingt durch mechanische Blattgewebeverletzung - bei Pflanze 5 um das 4 fache erhöht, im Falle der Pflanze 1 sogar um das 6 fache. Die bei *H. brasiliensis* als Reaktion auf mechanische Verletzung auftretende sekundenschnelle Aktivierung von LIN und HNL ermöglicht somit eine beschleunigte Freisetzung von HCN.

Eine Alkalisierung von Teilen der Inkubationsansätze ermöglichte, im Gegensatz zur vorherigen Bestimmung der reinen HCN-Menge, auch die Erfassung des gebildeten Acetoncyanhydrins. Für die Analyse wurden die bereits zuvor verwendeten PRE genutzt. Es zeigte sich, dass durch die Alkalisierung eine Gesamtmenge von $99 \pm 27 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 1) bzw. $178 \pm 23 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 5) (siehe Abbildung 1.3.8) in den Inkubationsansätzen, in denen PRE aus unverletzten Blättern verwendet wurden, nachgewiesen werden konnte. Da nur $34 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ bzw. $53 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ hiervon tatsächlich freigesetzter Blausäure entsprechen, muss es sich bei den verbleibenden $65 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ bzw. $125 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ um Acetoncyanhydrin handeln. Die HNL hat somit nur 34 % (Pflanze 1) bzw. 30 % (Pflanze 5) des insgesamt durch LIN-Aktivität gebildeten Acetoncyanhydrins zu HCN und Aceton umgesetzt.

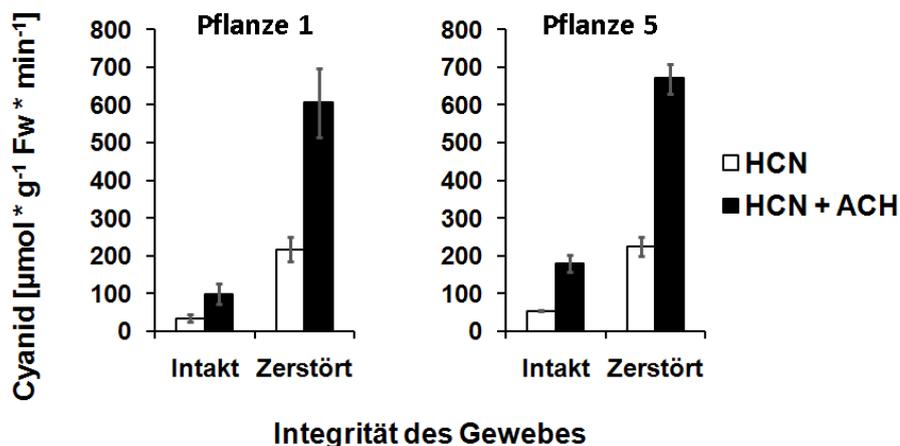


Abbildung 1.3.8: Erhöhung der HCN-Freisetzung durch verletzungsbedingte Aktivierung von BGLU und HNL

Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurde die von den Proteinrohextrakten katalysierte HCN-Freisetzung aus einer Linamarin-Lösung gemessen.

HCN: Bestimmung der freigesetzten Blausäure; **HCN + ACH:** Bestimmung der freigesetzten Blausäure und des Acetoncyanhydrins; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Bei Verwendung der PRE aus verletztem Blattgewebe wurden nach Alkalisierung $606 \pm 92 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 1) bzw. $670 \pm 39 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 5) (siehe Abbildung 1.3.8) in den Inkubationsansätzen gemessen. Von diesen entsprachen $216 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$

bzw. $224 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ tatsächlich freigesetzter HCN. Es wurden also, auch bei Aktivierung beider Enzyme, lediglich 36 % (Pflanze 1) bzw. 33 % (Pflanze 5) des insgesamt gebildeten Acetoncyanhydrins in HCN und Aceton umgewandelt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Blausäure-Freisetzung ist bei *H. brasiliensis* somit nicht die Umsetzung des Linamarins, sondern die Degradation des eigentlich instabilen Acetoncyanhydrins.

Die zuvor beschriebenen Inkubationen wurden in Reagenzgläsern angesetzt. Um einen Verlust gebildeter HCN durch Ausgasung ausschließen zu können, wurden die PRE von Pflanze 5 zusätzlich in luftdicht verschließbaren Thunberggefäßen vermessen. Nach Alkalisierung wurden $159 \pm 2 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (intaktes Blattgewebe) bzw. $621 \pm 42 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (verletztes Blattgewebe) detektiert (siehe Abbildung 1.3.9). Der Quotient aus den unter Verwendung der Thunberggefäße ermittelten Werte und der bei Inkubation im Reagenzglas erhaltenen beträgt somit 0,89 (intaktes Blattgewebe) bzw. 0,93 (verletztes Blattgewebe). Die im Reagenzglas nachgewiesene HCN-Menge liegt somit in beiden Fällen sogar leicht über der in den Thunberggefäßen gemessenen. Ein Blausäureverlust durch Ausgasung kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

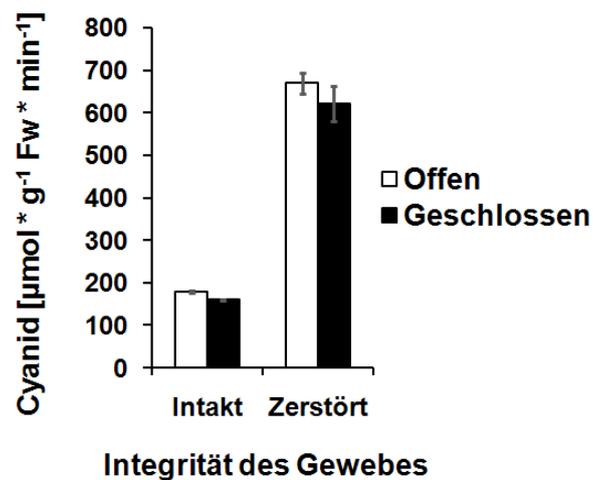


Abbildung 1.3.9: Vergleich der HCNc bei Verwendung von Reagenzgläsern und Thunberggefäßen

Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurde die von den Proteinrohextrakten katalysierte HCN-Freisetzung aus einer Linamarin-Lösung gemessen. Dabei wurden sowohl Reagenzgläser als auch luftdicht schließende Thunberggefäße für die Inkubationen verwendet. Offen: Inkubationen im Reagenzglas; Geschlossen: Inkubationen im Thunberggefäß; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Erhöhung der HCN-Freisetzung *in vivo*

Im Vergleich zur Situation im Blattgewebe sind LIN und HNL im Inkubationsansatz um den Faktor 2000 verdünnt. Dies bedingt, dass die den Enzymen zur Verfügung stehende Substratgesamtmenge im Inkubationsansatz wesentlich höher ist. *In vivo* könnte die Hydrolyse des gesamten Linamarins so schnell erfolgen, dass die Aktivierung der Enzyme keine weitere Beschleunigung ermöglicht. Untersuchungen zur Blausäure-Freisetzung aus Blattgewebe von *H. brasiliensis* ergaben aber, dass mechanische Verletzung offenbar einen Einfluss auf die Kinetik dieses Prozesses hat. Für die Messungen wurden ganze Blätter in eine Durchstromapparatur eingebracht und die Zellintegrität mittels Chloroform zerstört. Die daraufhin gebildete HCN wurde mit dem durch eine Aquariumpumpe erzeugten Luftstrom durch die Apparatur transportiert und schließlich in NaOH-Lösung aufgefangen. Die HCN-Freisetzung wurde über den Zeitraum von einer Stunde verfolgt, wobei die Reagenzgläser mit der NaOH-Lösung alle 10 Minuten gewechselt wurden. In der Messreihe wurden ausschließlich Blätter ein und desselben Austriebs verwendet, die sich in ähnlicher Entfernung zum Sprosspol befanden und in Bezug auf das Frischgewicht kaum voneinander abwichen. Im Gegensatz zur Kontrolle wurden die übrigen Blätter 30 Sekunden vor Einbringen in die Durchstromapparatur mit Hilfe eines Nadelkissens leicht verletzt, so dass sie, nach Chloroformbehandlung, eine nahezu doppelt so hohe BGLU-Aktivität wie die Kontrollblätter aufwiesen (siehe Abbildung 1.3.10). Im Falle der Kontrollen betrug sie im Mittel $0,19 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Eine Verringerung der Aktivität im Verlauf der 60 Minuten Inkubationszeit in der Durchstromapparatur konnte nicht festgestellt werden. Bei leichter Gewebeverletzung mittels Nadelkissen lag die BGLU-Aktivität im Mittel bei $0,37 \pm 0,14 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Das der Fehlerwert deutlich höher ist als bei der Kontrolle, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass das Nadelkissen ein ungleichmäßiges Verletzungsmuster erzeugte.

Interessanter Weise wurde bei den zuvor verletzten Blättern eine beschleunigte HCN-Freisetzung gemessen. Innerhalb des ersten 10-Minuten-Intervalls ist sie mit $7,0 \pm 0,3 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ nahezu doppelt so hoch wie bei der Kontrolle. Hier betrug die Freisetzung $3,8 \pm 0,3 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.10). Die HCN-Freisetzung innerhalb dieses Zeitraumes ist entscheidend dafür, ob eine Abschreckung von Herbivoren erfolgt oder nicht (BALLHORN et al. 2005). Innerhalb des zweiten 10-Minuten-Intervalls betrug die Freisetzung bei den Kontrollblättern $13,5 \pm 0,6 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bei den verletzten Blättern lag sie bei $14,3 \pm 1,2 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ und war damit nicht mehr signifikant höher. Im dritten 10-Minuten-Intervall war dann die HCN-Freisetzung aus den Kontrollblättern geringfügig höher. Sie lag bei $9,7 \pm 0,3 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Im Falle der verletzten Blätter betrug sie $8,3 \pm 2,1 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. In den letzten drei 10-Minuten-Intervallen setzte sich diese Tendenz fort. Innerhalb des vierten Intervalls wurden bezüglich der Kontrollblätter $6,2 \pm 0,3 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen, bei den verletzten Blättern hingegen lediglich noch $3,7 \pm 0,9 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe

Abbildung 1.3.10). Die HCN-Freisetzung war hier damit bei den Kontrollen 1,7-mal höher, was darauf zurückzuführen sein dürfte, dass die Substratverfügbarkeit im Falle der verletzten Blätter bereits geringer war. Dies verdeutlicht noch einmal die Beschleunigung der Freisetzung.

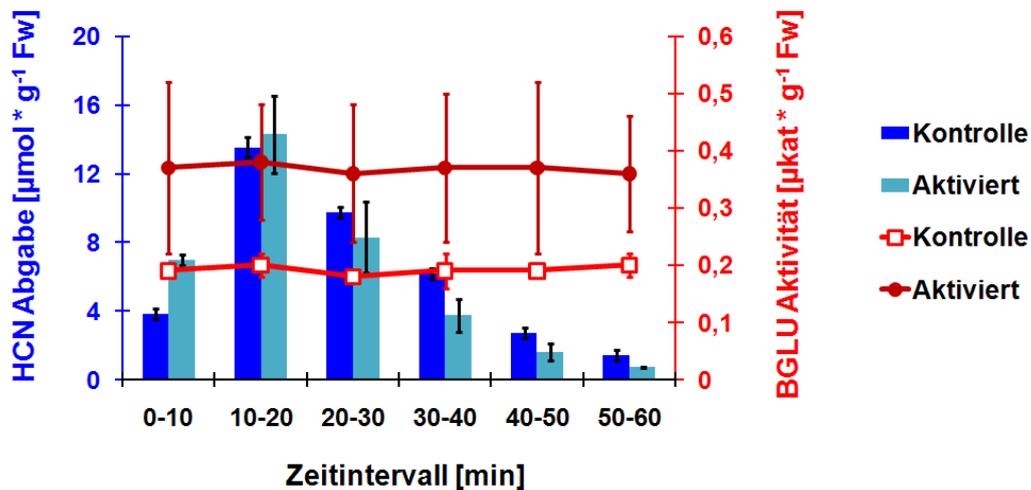


Abbildung 1.3.10: Einfluss von mechanischer Verletzung auf die HCN-Freisetzung bei *H. brasiliensis*

Blätter wurden mittels Nadelkissen leicht verletzt und anschließend in eine Durchstromapparatur zur Quantifizierung des freigesetzten HCNs eingebracht. Die Blausäuremenge wurde in Zeitintervallen von 10 Minuten bestimmt. Die Freisetzung wurde durch Zugabe von Chloroform eingeleitet. Als Kontrollen dienen Blätter, die nicht mittels Nadelkissen verletzt wurden. In parallelen Ansätzen erfolgte die Bestimmung der BGLU-Aktivität in identisch behandeltem Blattgewebe. Die blauen Balken geben die HCN-Freisetzung an. Die roten Linien stellen die Messwerte zur BGLU-Aktivität da.

Kontrolle: unverletztes Blattgewebe; Aktiviert: leicht verletztes Blattgewebe: Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Problematisch an der Messung ist allerdings, dass im Falle der verletzten Blätter die Zellintegrität, wenn auch nur in Teilen, bereits 30 Sekunden früher aufgehoben wurde als bei der Kontrolle. Sollte der für die Durchmischung von Enzym und Substrat erforderliche Zeitraum einen entscheidenden Einfluss auf die Freisetzungskinetik haben, so könnte dies der Grund für die scheinbare Beschleunigung sein. Um auf andere Weise zu prüfen, inwieweit unterschiedliche BGLU- bzw. LIN-Aktivitäten bei *H. brasiliensis* zu Unterschieden in der HCN-Freisetzungskinetik beitragen, wurden daher zwei Pflanzen (Pflanze 1 und Pflanze 3) mit unterschiedlichem HCNp bezüglich der HCNc verglichen. Das HCNp von Pflanze 1 betrug $87,3 \pm 7,1 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$, das von Pflanze 3 lag bei $44,4 \pm 1,3 \mu\text{mol HCN} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.11), was einem Unterschied von Faktor 2 entspricht.

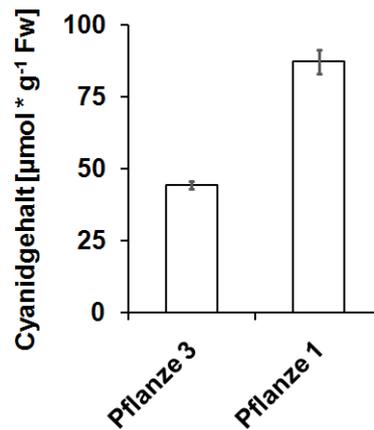


Abbildung 1.3.11: Cyanogenes Potential der *H. brasiliensis*-Pflanzen 1 und 3

Ganze Blätter wurden schockgefroren und zu einem Pulver vermahlen. Die Extraktion der cyanogenen Glucoside (CG) erfolgte durch Homogenisierung in Na-Phosphat-Lösung. Durch Zugabe von *H. brasiliensis*-BGLU wurden die CG gespalten. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Cyanidmenge. Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Sollten BGLU- und HNL-Aktivität nicht limitierend für die HCN-Freisetzung sein, so müsste sich auch die HCNc um Faktor 2 unterscheiden. Vergleicht man diese stellt man aber fest, dass dies nicht der Fall ist. Innerhalb des ersten 10-Minuten-Zeitintervalls werden aus Blättern der Pflanze 3 gut $0,2 \pm 0,0 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ freigesetzt. Bei Pflanze 1 beträgt die Freisetzung hingegen $1,0 \pm 0,4 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.12 A) und ist damit 5-mal so hoch. Bei Pflanze 3 betrug die HCN-Freisetzung im zweiten 10-Minuten-Zeitintervall $0,8 \pm 0,1 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Für Pflanze 1 hingegen wurde ein 7-mal so hoher Wert gemessen. Er lag bei $5,6 \pm 0,3 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Innerhalb der verbleibenden Zeitintervalle wurden bei Pflanze 3 Freisetzungsraten von $0,6 \pm 0,2 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (3. Intervall), $0,4 \pm 0,3 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (4. Intervall), $0,3 \pm 0,1 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (5. Intervall) und $0,2 \pm 0,0 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (6. Intervall) gemessen. Bei Pflanze 1 hingegen betrugen die Werte $3,4 \pm 0,7 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (3. Intervall), $2,8 \pm 0,4 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (4. Intervall), $1,6 \pm 0,7 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (5. Intervall) und $1,0 \pm 0,5 \mu\text{mol HCN} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (6. Intervall). Sie sind damit 6 (3. Intervall), 7 (4. Intervall), 6 (5. Intervall) und 6-fach (6. Intervall) höher als bei Pflanze 1. Die Unterschiede können nicht alleine auf die Differenz im HCNp zurückgeführt werden, da sich diese lediglich um Faktor 2 unterschieden.

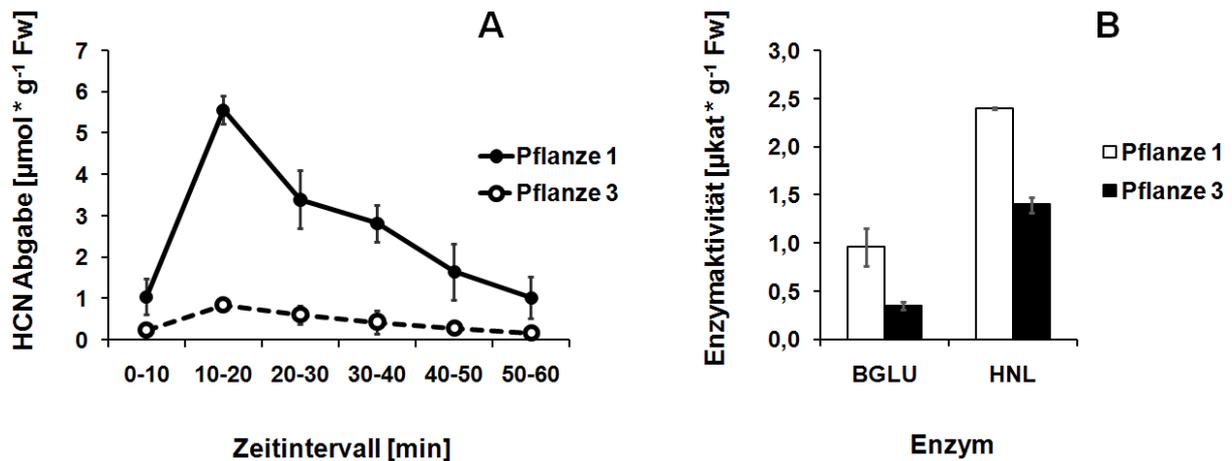


Abbildung 1.3.12: Einfluss des HCNp sowie der BGLU- und HNL-Aktivität auf die HCNc bei *H. brasiliensis*

Blattgewebe der Pflanzen 1 und 3 wurde sowohl für die Bestimmung der BGLU- und HNL-Aktivität, als auch für die Quantifizierung der bei Gewebeverletzung freigesetzten HCN-Menge genutzt.

A: Verlauf der HCN-Freisetzung nach Aufhebung der Zellintegrität durch Chloroform. Die Blausäuremenge wurde in Zeitintervallen von 10 Minuten bestimmt. **B:** BGLU- und HNL-Aktivität im unverletzten Gewebe. Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Die BGLU-Aktivität von Pflanze 1 im nicht mechanisch verletzten Gewebe betrug $0,96 \pm 0,01 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bei Pflanze 3 wurde ein Wert von $0,35 \pm 0,08 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen (siehe Abbildung 1.3.12 B). Die BGLU-Aktivität in den beiden Geweben unterscheidet sich also um Faktor 2,7. Bezüglich der HNL-Aktivität wurde bei Pflanze 1 ein Wert von $2,4 \pm 0,2 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen. Bei Pflanze 3 betrug die Aktivität $1,4 \pm 0,4 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.12 B), was einer Abweichung um Faktor 1,7 entspricht. Berücksichtigt man in Bezug auf die HCNc zunächst den Unterschied der HNL-Aktivitäten, so ist für Pflanze 1 eine um Faktor 3,4 höhere HCN-Freisetzung anzunehmen, was der tatsächlich gemessenen Differenz um Faktor 6 (Mittelwert der obigen Abweichungen) bereits näher kommt. Die Verbleibende Abweichung muss hingegen in der unterschiedlichen BGLU-Aktivität begründet sein. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Aktivierung von LIN und HNL auch *in vivo* zu einer Erhöhung der HCN-Freisetzungsgeschwindigkeit führt.

BGLU- und HNL-Aktivierung bei *Manihot esculenta*

Neben *H. brasiliensis* finden sich in der Familie der Euphorbiaceae noch weitere cyanogene Arten. So z.B. der als Nahrungspflanze sehr wichtige Maniok - *Manihot esculenta*. Die Untersuchungen an Blattgewebe von Maniok zeigten, dass auch bei diesem eine verletzungsbedingte Aktivierung von BGLU und HNL stattfindet. In unverletztem Blattgewebe wurde eine BGLU-Aktivität von $0,68 \pm 0,04 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen. Mechanische Verletzung bewirkte einen Anstieg der Enzymaktivität auf $21,9 \pm 0,5 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.13), was einem AF von 32 entspricht.

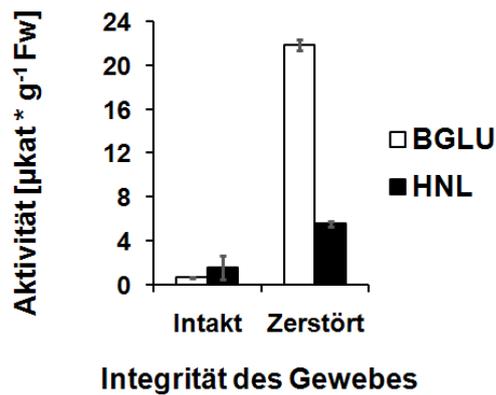


Abbildung 1.3.13: Verletzungsbedingte Aktivierung von BGLU und HNL bei *M. esculenta*

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Die HNL-Aktivität betrug in intaktem Blattgewebe $1,6 \pm 1,1 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bei mechanischer Gewebeerstörung stieg sie auf $5,6 \pm 0,3 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.13). Der AF für HNL beträgt somit 3,5.

BGLU-Aktivierung bei *Jatropha multifida* und *Euphorbia caracasana*

Mit in die Untersuchung einbezogen wurden außerdem die Euphorbiaceae *Jatropha multifida* und *Euphorbia caracasana*. Bei *J. multifida* wurde in unverletztem Blattgewebe eine BGLU-Aktivität von $0,0045 \pm 0,0037 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ festgestellt. Bei *E. caracasana* betrug die Aktivität $0,034 \pm 0,024 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.14 A). Auffällig ist zunächst wie niedrig die BGLU-Aktivität gegenüber den bei *H. brasiliensis* (Pflanze 2) und *M. esculenta* gemessenen ist. Bei letzteren ist sie 258-fach (*H. brasiliensis*) bzw. 151-fach (*M. esculenta*) höher als bei *J. multifida*. In Bezug auf *E. caracasana* ist die Aktivität bei *H. brasiliensis* 34-mal bei *M. esculenta* 20-mal so hoch. Auch zu Pflanze 5, die mit $0,29 \pm 0,04 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ den niedrigsten, bei *H. brasiliensis* gemessenen Wert aufweist, besteht ein Unterschied um Faktor 64 (*J. multifida*) bzw. 8 (*E. caracasana*).

Eine HNL-Aktivität konnte bei keiner der beiden Pflanzen festgestellt werden. Zwar beschleunigte die Zugabe der Proteinrohextrakte zum Inkubationsansatz den Acetoncyanhydrinzerfall geringfügig, doch diese Beschleunigung blieb auch nach 10-minütigem Erhitzen der Proteinrohextrakte auf 95 °C nicht nur erhalten, sondern war sogar leicht erhöht, was einen enzymatischen Hintergrund ausschließt (Daten nicht gezeigt).

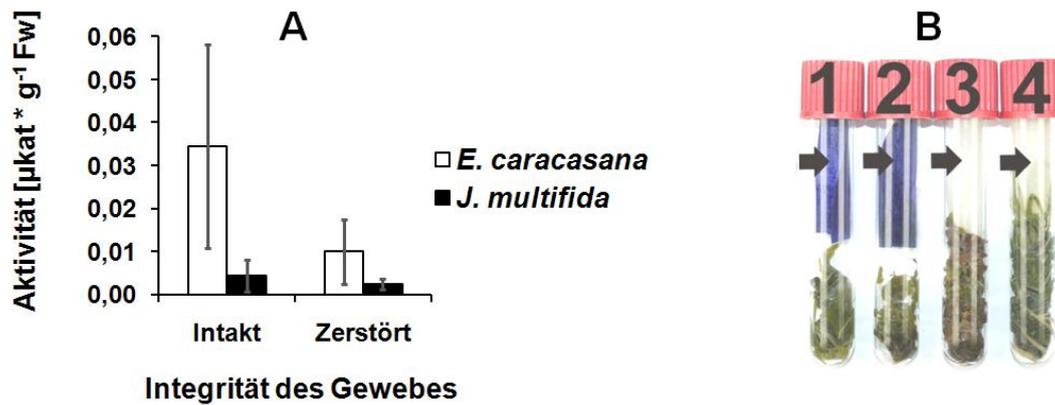


Abbildung 1.3.14: Verletzungsbedingte Veränderung der BGLU-Aktivität bei *J. multifida* und *E. caracasana* / Untersuchung beider Pflanzen auf Cyanogenität

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerzörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurde die BGLU-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Außerdem wurde Blattgewebe in verschließbare Reagenzgläser eingebracht und mit Chloroform inkubiert. Für die Detektion freierwirdender HCN wurde Feigl-Anger-Papier verwendet. Als Kontrolle dienten Blätter von *H. brasiliensis* und *M. esculenta*.

A: Bestimmung der BGLU-Aktivität; Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung. **B:** Test auf Cyanogenität; Die Blaufärbung des Feigl-Anger-Papiers zeigt die HCN-Freisetzung an: 1: *H. brasiliensis*, 2: *M. esculenta*; 3: *E. caracasana*; 4: *J. multifida*; schwarze Pfeile markieren die Position des Feigl-Anger-Papiers.

Nach Gewebeerletzung wurde im Falle von *J. multifida* eine BGLU-Aktivität von $0,0024 \pm 0,0012$ $\mu\text{kat} * \text{g}^{-1}$ Fw gemessen. Bei *E. caracasana* betrug die Aktivität $0,010 \pm 0,007$ $\mu\text{kat} * \text{g}^{-1}$ Fw (siehe Abbildung 1.3.14 A). Die AFs liegen somit bei 0,5 (*J. multifida*) und 0,3 (*E. caracasana*). Bei beiden Pflanzen verringert sich die BGLU-Aktivität somit bei Gewebeerletzung. Vergleicht man die Aktivitäten mit denen, die nach Gewebeerletzung bei *H. brasiliensis* (Pflanze 2) und *M. esculenta* gemessenen wurden, ist festzustellen, dass die Enzymaktivität bei diesen 4600-fach (*H. brasiliensis*) bzw. 9200-fach (*M. esculenta*) höher ist als bei *J. multifida*. In Bezug auf *E. caracasana* ist die BGLU-Aktivität 1100-mal (*H. brasiliensis*) bzw. 2200-mal (*M. esculenta*) höher.

Bei *J. multifida* und *E. caracasana* ist die BGLU-Aktivität somit nicht nur deutlich niedriger als bei *H. brasiliensis* und *M. esculenta*, sondern es findet auch keine Aktivierung des Enzyms als Reaktion auf mechanische Verletzung statt. Im Gegenteil, die Aktivität nimmt deutlich ab. Eine HNL-Aktivität konnte nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zu *H. brasiliensis* und *M. esculenta* sind *J. multifida* und *E. caracasana* nicht cyanogen, wie der Test mit Feigl-Anger-Papier zeigt (siehe Abbildung 1.3.14 B).

BGLU-Aktivierung bei *Phaseolus lunatus* und *Linum usitatissimum*

Die Lima-Bohne *Phaseolus lunatus* und der Lein *Linum usitatissimum* sind cyanogen, gehören aber nicht in die Familie der Euphorbiaceae. Auch bei *P. lunatus* und *L. usitatissimum* wurde die BGLU-

Aktivität vor und nach Blattgewebeverletzung bestimmt. Bei der Lima-Bohne wurde in unverletztem Gewebe eine Enzymaktivität von $2,3 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen (siehe Abbildung 1.3.15). Sie ist damit 2- (Pflanze 2) bis 8-mal (Pflanze 5) so hoch, wie im intakten Gewebe der untersuchten *H. brasiliensis* Pflanzen. Beim Lein ist sie mit $0,15 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ hingegen geringer (siehe Abbildung 1.3.15).

Die HNL-Aktivität war bei *P. lunatus*, falls überhaupt vorhanden, sehr niedrig. Beim Lein betrug sie $1,4 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.15). Somit ist sie geringfügig niedriger als beispielsweise bei Pflanze 2 (*H. brasiliensis*), bei der sie $2,4 \pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ betrug (s.o.), bzw. ähnlich hoch wie bei Maniok ($1,6 \pm 1,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$) (s.o.).

Nach Gewebeverletzung wurde bei *P. lunatus* eine BGLU-Aktivität von $2,5 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen (siehe Abbildung 1.3.15). Bei *L. usitatissimum* betrug sie $0,20 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 1.3.15). Dies entspricht AFs von 1,05 (Lima-Bohne) bzw. 1,31 (Lein). Eine Aktivierung der BGLU, ähnlich der, die bei *H. brasiliensis* und *M. esculenta* festzustellen war, findet bei *P. lunatus* und *L. usitatissimum* also nicht statt. Eine Verringerung der Aktivität, wie bei *J. multifida* und *E. caracasana* festgestellt, bleibt allerdings ebenfalls aus. Es ist festzuhalten, dass die BGLU-Aktivität, was die Lima-Bohne anbelangt, bereits im intakten Gewebe deutlich höher war als bei einigen der *H. brasiliensis* Pflanzen (s.o.). Nach erfolgter Aktivierung ist sie allerdings bei *H. brasiliensis* 1,5- (Pflanze 5) bis 4,4-mal (Pflanze 2) höher.

Die HNL-Aktivität war bei *P. lunatus*, auch nach Gewebeverletzung, falls überhaupt vorhanden, sehr niedrig. Bei *L. usitatissimum* wurde eine Aktivität von $1,5 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen (siehe Abbildung 1.3.15), was einem AF von 1,1 entspricht. Somit erfährt auch die HNL beim Lein keine verletzungsbedingte Aktivierung. Eine Verringerung der Aktivität bleibt allerdings ebenfalls aus.

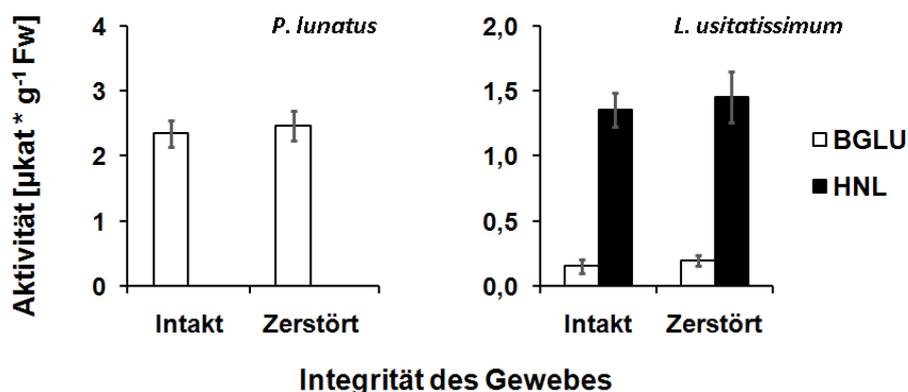


Abbildung 1.3.15: Verletzungsbedingte Veränderung der BGLU- und HNL-Aktivität bei *P. lunatus* und *L. usitatissimum*

Die Blätter wurden mittels Präpariernadel bis zu einem hohen Grad der Gewebeerstörung (150 Einstiche) verletzt und die entsprechenden Blattflächen mittels Korkbohrer beprobt. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität im Proteinrohextrakt bestimmt. Alle Messungen sind Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

1.4 Diskussion

Die Bedeutung der HNL für die Cyanogenese

Da Acetoncyanhydrin instabil ist und auch spontan zerfällt kann die Bedeutung der HNL für die Cyanogenese kontrovers diskutiert werden. Wie hier aber in Übereinstimmung mit den Befunden von SELMAR et al. (1989) gezeigt werden konnte ist es beim Kautschukbaum HNL, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Blausäurefreisetzung katalysiert (siehe Abbildung 1.3.8). Der Befund steht auch in Übereinstimmung mit den kinetischen Daten (K_m und V_{max}) von LIN und HNL. LIN weist gegenüber Linamarin einen K_m -Wert von $7,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf (SELMAR et al. 1987). Die Affinität von HNL für Acetoncyanhydrin ist dagegen fast 11-mal so groß. Der K_m -Wert beträgt $0,7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (SELMAR 1986). Die kinetischen Eigenschaften entsprechen den Anforderungen an die beiden Enzyme. Das Substrat der LIN ist zu Beginn der Cyanogenese in hoher Konzentration vorhanden. Diese kann bei bis zu $120 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ und damit um ein vielfaches über dem K_m -Wert liegen. Die relativ geringe Affinität der LIN zum Linamarin erlaubt einen sehr schnellen Umsatz des Substrates. V_{max} beträgt $191 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SELMAR et al. 1987). Da der HNL das Substrat erst durch die Aktivität der LIN zur Verfügung gestellt wird ist die Schnelligkeit dieser Reaktion von zentraler Bedeutung. HNL hingegen muss nach Möglichkeit schon sehr geringe Mengen an Substrat effektiv umsetzen. Dies spiegelt sich in der hohen Affinität zum Acetoncyanhydrin wieder. Diese geht allerdings auch mit einem langsameren Umsatz des Substrates einher. V_{max} liegt bei $21 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SELMAR 1986). Die Deglycosilierung des Linamarins erfolgt somit 9-mal schneller als die Degradation von Acetoncyanhydrin. Die Hydroxynitrillyase katalysiert also, in Abhängigkeit des Mengenverhältnisses von HNL zu LIN natürlich, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der HCN-Freisetzung. Bei *H. brasiliensis* kommt HNL somit eine Schlüsselfunktion in der Abschreckung potentieller Herbivore zu.

Das Mengenverhältnis HNL / LIN lag bei Pflanze 1, die für die in Abbildung 1.3.8 dargestellten Inkubationen verwendet wurde, bei 1,4 (intaktes Gewebe) bzw. 1,2 (verletztes Gewebe; siehe Tabelle 1.4.1). Dies erklärt warum in den Versuchen nach 5 Minuten Inkubationszeit nur 34 - 36 % des insgesamt gebildeten Acetoncyanhydrins (ACH) zu HCN umgesetzt wurden (siehe Abbildung 1.3.8). Auch SELMAR et al. (1989) beschreiben, dass bei einem HNL / LIN-Verhältnis von 1,2 nur etwa 50 % des ACH umgesetzt werden. Erst bei einem Mengenverhältnis von 4,8 konnten die Autoren einen Umsatz von 99 % messen. Dass die Umsatzrate in den hier gezeigten Versuchen um 14 bis 16 Prozentpunkte geringer ausfällt als bei den Untersuchungen von SELMAR et al. (1989) könnte damit zusammenhängen, dass die Autoren mit einer Linamarinkonzentration von $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ arbeiteten. In den hier gezeigten Inkubationen wurde diese auf $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingestellt.

Tabelle 1.4.1: Verhältnis von HNL zu LIN in Blättern der *H. brasiliensis*-Pflanze 1

Blattstadium	Gewebe intakt	Gewebe verletzt	
	Aktivität [$\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$]	Aktivität [$\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$]	
D	0,94 ± 0,09	7,3 ± 0,9	BGLU
D	1,3 ± 0,1	8,8 ± 0,2	HNL
	1,4	1,2	HNL / BGLU

Was die Blätter von Pflanze 5 anbelangt, die im Rahmen der Messreihe ebenfalls beprobt wurden, liegen leider keine Ergebnisse zur HNL-Aktivität in den C-Stadien vor (siehe Tabelle III. 1.1 auf Seite 172). Das auch bei Pflanze 5 lediglich 30 - 33 % des Acetoncyanhydrins umgesetzt wurden dürfte aber ebenso auf die für Pflanze 1 dargestellten Gründe zurückzuführen sein.

Die verletzungsbedingte LIN- / HNL-Aktivierung: eine neue Einflussgröße der pflanzlichen Cyanogenese

Die Cyanogenität einer Pflanze hängt von einer Vielzahl interner und externer Faktoren ab. Alle bisher beschriebenen Einflussgrößen der pflanzlichen Cyanogenese betreffen Gewebe bzw. Zellen, die selbst noch keine Fraßschäden aufweisen. Die von BALLHORN et al. (2006) beschriebene Veränderung der BGLU-Aktivität wird zwar direkt durch Befall induziert, beeinflusst aber nicht die anfängliche Interaktion mit dem Fraßfeind. Erst nach 72 Stunden tritt eine Veränderung der BGLU-Aktivität und damit verbunden eine beschleunigte Freisetzung von HCN auf, die so den Fraßschutz der verbleibenden Gewebe verbessert. Hier hingegen kann gezeigt werden, dass bei *H. brasiliensis* als Reaktion auf mechanische Verletzung eine sekundenschnelle Aktivierung der LIN (Linamarase) bzw. BGLU und auch der HNL (Hydroxynitrillyase) erfolgt. In den beschädigten Geweben war die BGLU-Aktivität, um das 4 bis 14 fache erhöht (siehe Abbildung 1.3.1). Die HNL-Aktivität war bis zu 10-mal so hoch wie in intakten Blättern (siehe Abbildung 1.3.1). Die Enzymaktivierung hat eine erhöhte HCN-Freisetzung zur Folge (siehe Abbildung 1.3.8). *H. brasiliensis* ist somit offenbar in der Lage, die cyanogene Antwort auf Gewebeerstörung im Moment der Schädigung zu modulieren. Ein solcher Regulationsmechanismus wurde bisher noch bei keiner cyanogenen Pflanze beschrieben. Das im Rahmen der Einleitung entworfene Schema zur Regulation der Cyanogenese wird daher hier, ergänzt um die Einflussgröße der mechanischen Verletzung, erneut dargestellt (siehe Abbildung 1.4.1). Berücksichtigt werden muss hierbei allerdings, dass mechanische Verletzung nicht zu einem veränderten Gehalt an LIN oder HNL in den betroffenen Geweben führen muss. Nachgewiesen ist ausschließlich die Aktivitätserhöhung, was im Übrigen auch für die Einflussgröße des Insektenfraßes gilt. Im Falle von *H. brasiliensis* könnte auch eine posttranslationale Modifikation der Enzyme den

beschleunigten Substratumsatz bedingen. Der Mechanismus der LIN- und HNL-Aktivierung soll im Rahmen des vierten Kapitels genauer untersucht werden.

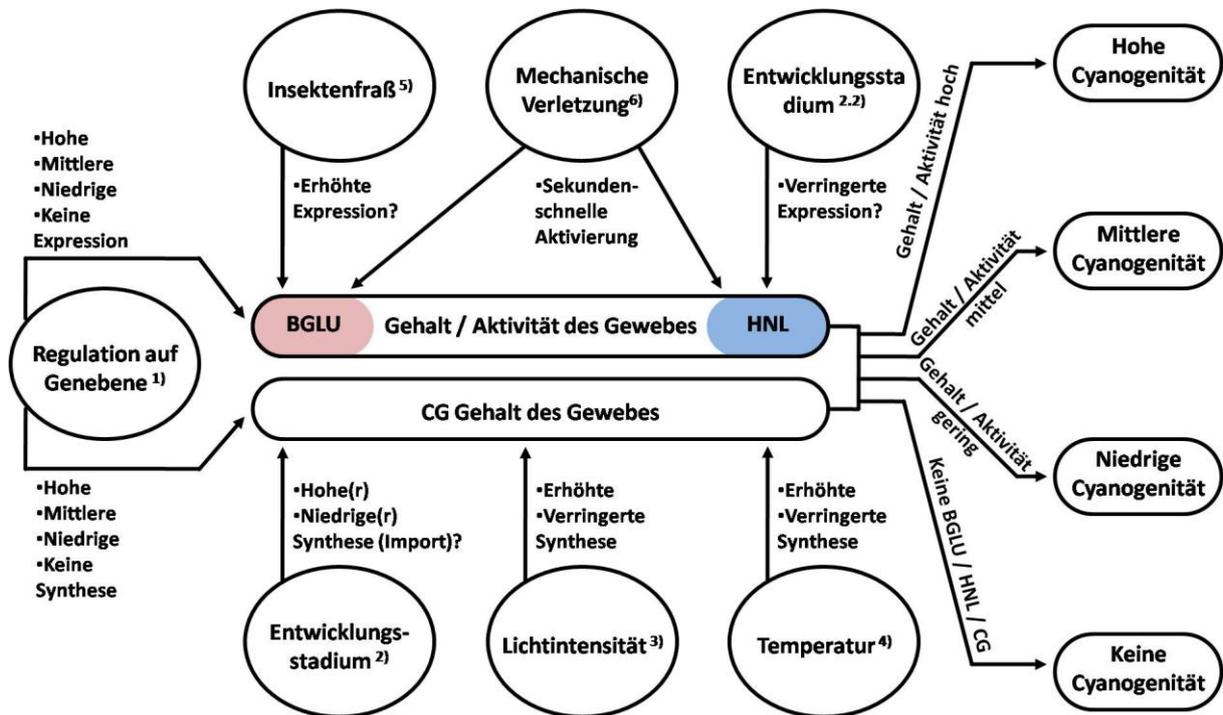


Abbildung 1.4.1: Einflussgrößen der pflanzlichen Cyanogenese (erweitert 1)

Die pflanzliche Cyanogenese wird durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren beeinflusst. Das Schema gibt einen Überblick zu einigen der bisher beschriebenen Einflussgrößen. Faktoren wie im InsektenSpeichel enthaltene β -Glycosidasen, β -Glycosidase-Inhibitoren oder Proteasen wurden bewusst nicht berücksichtigt.

1: *Trifolium repens* (HUGHES 1981); 2.1: *H. brasiliensis* (LIEBEREI et al. 1985); *Phaseolus lunatus* (BALLHORN et al. 2005); 2.2: *H. brasiliensis* (SELMAR et al. 1989); *Sorghum bicolor* (HALKIER und MØLLER 1989); 3: *Linum* (TRION E 1960); 4: *Trifolium repens* (HUGHES 1981); 5: *Phaseolus lunatus* (BALLHORN et al. 2006); 6: *H. brasiliensis* und *M. esculenta* (VOß 2001; KADOW 2010);

BGLU: β -Glucosidase; HNL: Hydroxynitrillyase; CG: Cyanogene Glucoside

Warum sind LIN und HNL-Aktivität nicht von vorneherein hoch?

Die Aktivierung von LIN und HNL erfolgt zwar sehr schnell (siehe Abbildung 1.3.4), sollte aber die HCN-Freisetzung in dem Moment, in dem ein Herbivore zum ersten Mal das Blatt beschädigt, nicht mehr beeinflussen, da das Linamarin in den betroffenen Bereichen innerhalb von Sekunden hydrolysiert wird. Erst beim zweiten „Biss“ dürfte die Enzymaktivierung zu einer beschleunigten Freisetzung führen. Im Zusammenhang mit Pflanze-Herbivore-Wechselwirkungen stellt sich daher die Frage, warum LIN- und HNL-Aktivität nicht von vorneherein hoch sind. Denkbar wäre, dass die Aktivierung eine Modulation der cyanogenen Antwort, je nach Art des Befalls ermöglicht. Bei extensiver Gewebeerstörung, wie z.B. durch kauende und beißende Insekten hervorgerufen, wäre die Enzymaktivität hoch und die Menge an freigesetzter HCN groß. Herbivoren würden abgeschreckt

werden. Bei geringerer Gewebeerstörung, wie beispielsweise bei anfänglichem Pilzbefall, könnte kaum oder keine Aktivierung stattfinden. Die Enzymaktivität wäre niedriger und es würden nur kleine Mengen an HCN frei. Diese würden zwar dem Pilz nicht schaden, im Gegenzug aber auch die umliegenden Pflanzenzellen nicht beeinträchtigen. So wären alternative Abwehrstrategien, wie eine Vernetzung der Zellwände und die Synthese von Phytoalexinen möglich. Wie problematisch die Cyanogenese im Zusammenhang mit Pilzbefall sein kann zeigt sich an der eingangs geschilderten Interaktion von *H. brasiliensis* mit *M. ulei*. Der Pilz ist resistent gegenüber Blausäure und wächst in HCN-haltiger Atmosphäre sogar besser (LIEBEREI et al. 1983). Zwar verfügt auch *H. brasiliensis* über Mechanismen der Cyanidentgiftung, überschreitet jedoch die freigesetzte Blausäuremenge deren Kapazität, werden u.a. Photosynthese, Atmung und Scopoletinsynthese inhibiert (LIEBEREI et al. 1989 und 1996). Scopoletin ist ein Phytoalexin und kann sowohl die Keimung der Pilzsporen als auch das Wachstum der Hyphen unterdrücken, wenn es in ausreichender Menge gebildet wird (GIESEMANN et al. 1986). Blätter des resistenten *Hevea*-Klons F 4542 akkumulierten in den Versuchen von LIEBEREI et al. (1989) bis zu 3,2 µg Scopoletin pro Gramm Blatttrockengewicht (Dw: dry weight) innerhalb von 48 Stunden nach Inokulation mit *M. ulei*. Die Blausäure-Freisetzung lag bei 2,3 µg * g⁻¹ Dw. Der anfällige Klon RRIM 600 hingegen, der eine HCN-Freisetzung von 38,6 µg * g⁻¹ Dw aufwies akkumulierte im selben Zeitraum lediglich 0,5 µg Scopoletin * g⁻¹ Dw (LIEBEREI et al. 1989). Um zu prüfen ob dieser Unterschied genetisch bedingt ist oder aber in Zusammenhang mit HCN steht, wiederholten die Autoren die Inokulationsversuche mit RRIM 600, entfernten diesmal aber die entstehende Blausäure aus den Inkubationsgefäßen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Blätter von RRIM 600 nun ähnlich viel Scopoletin akkumulierten, wie die des resistenten Klons F 4542. Parallel wurden außerdem inokulierte Blätter von F 4542 mit HCN begast, was dazu führte, dass diese nunmehr ähnlich geringe Mengen an Scopoletin enthielten, wie dies zuvor nur bei RRIM 600 der Fall war (LIEBEREI et al. 1989). Der HCN-Gehalt im Blattgewebe und damit letztendlich die cyanogene Kapazität, ist offenbar entscheidend dafür, ob ein Befall durch *M. ulei* abgewehrt werden kann oder nicht. Sollte die Blätterstörung durch den Pilz ebenfalls eine Aktivierung von LIN und HNL hervorrufen, so würde dies die Scopoletinakkumulation aufgrund der beschleunigten HCN-Freisetzung weiter mindern und die Anfälligkeit von *H. brasiliensis* gegenüber *M. ulei* noch vergrößern. Auf der anderen Seite könnte die Aktivierung aber auch eine Anpassung an eben diesen Schaderreger darstellen. Sollte der Pilzbefall nämlich keinerlei Aktivierung hervorrufen so könnte, bei ausreichend niedriger Grundaktivität beider Enzyme, die Freisetzung so gering sein, dass die Autoinhibition der Scopoletinsynthese unterbleibt. Die Resistenz gegenüber *M. ulei* wäre verbessert.

Denkbar wäre auch, dass insbesondere hohe Grundaktivitäten der LIN bzw. BGLU schädlich für *H. brasiliensis* sind. Die BGLU setzt neben Linamarin noch eine Vielzahl weitere Mono-Glycoside um. So z.B. β-Galactoside, Xyloside, und β-Mannoside (SELMAR et al. 1987). Das Enzym ist also nicht

monospezifisch und könnte auch *in vivo* neben Linamarin noch andere Substrate umsetzen. Phytohormone wie Abscisinsäure (ABA) werden häufig durch Glycosilierung inaktiviert. Bei Salzstress konnte in *Hordeum vulgare*-Blättern eine BGLU-Aktivitätserhöhung im Apoplasten festgestellt werden, die zu einer verstärkten Deglycosilierung von ABA-Glucosid und damit zur Verringerung der Öffnungsweite der Stomata führte (DIETZ et al. 2000). Sollte die BGLU aus *H. brasiliensis* ABA-Glucosid in geringem Maße umsetzen, so könnte eine hohe Grundaktivität des Enzyms die Regulation der Öffnungsweite der Stomata stören. Erste Messungen mit ABA-Glucosid zeigten allerdings keinerlei Substratumsatz (Daten nicht gezeigt). Auf der anderen Seite fand sich auch im Proteinrohextrakt keinerlei Enzymaktivität gegenüber dem Substrat. Die Messungen hierzu sind daher noch zu modifizieren.

Neben ABA werden noch weitere Phytohormone durch Glycosilierung inaktiviert. So z.B., die u.a. an der Regulation des Streckungswachstums beteiligte Indol-3-essigsäure (IAA; TAIZ und ZEIGER 2000). Sollte IAA-Glucosid durch BGLU deglycosiliert werden, so könnte eine hohe Grundaktivität des Enzyms zu Störungen IAA-regulierter Entwicklungen führen. Außer bei ABA und IAA wird auch bei Gibberellinen und Cytokinin durch Deglycosilierung eine Überführung in die jeweilige physiologisch aktive Form erreicht (TAIZ und ZEIGER 2000). Zu der Hypothese, dass hohe Grundaktivitäten der LIN schädlich für *H. brasiliensis* sein könnten passt, dass die HNL-Aktivität bei einigen Blättern des B- und C-Stadiums auch im intakten Gewebe bereits sehr hoch war (siehe Abbildung 1.3.6). Was BGLU anbelangt war dies hingegen bei keiner der untersuchten Pflanzen der Fall (siehe Tabelle III. 1.1 auf Seite 172).

BGLU-Aktivierung bei anderen Euphorbiaceae und cyanogenen Pflanzen

Eine Aktivierung von LIN bzw. BGLU und HNL findet auch bei *M. esculenta* statt (siehe Abbildung 1.3.13). Maniok ist cyanogen und gehört, wie der Kautschukbaum, zur Familie der Euphorbiaceae. Bei zwei acyanogenen Vertretern dieser Familie - *Jatropha multifida* und *Euphorbia caracasana* - konnte hingegen keine Enzymaktivierung festgestellt werden. Im Gegenteil, die Aktivität nahm nach Blattverletzung um bis zu 50 % ab (siehe Abbildung 1.3.14 A). Bei *Phaseolus lunatus* und *Linum usitatissimum*, die zwar beide cyanogen sind, aber nicht zu den Euphorbiaceae gehören, wurde ebenfalls keine verletzungsbedingt Enzymaktivitätssteigerung gemessen (siehe Abbildung 1.3.15). Die Befunde liefern zwar keinen Beweis, legen aber zumindest die Vermutung nahe, dass das Phänomen der BGLU- und HNL-Aktivierung auf cyanogene Euphorbiaceae beschränkt sein könnte.

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

Kapitel 2: Sequenz- und Strukturanalyse der Blatt- β -Glucosidasen

Zusammenfassung

β -Glucosidase aus Blättern von *Hevea brasiliensis* wird verletzungsbedingt aktiviert, was zu einer Beschleunigung der Blausäure-Freisetzung führt. Die AS-Sequenz und die hypothetische 3D-Struktur dieses Enzyms wird hier vorgestellt. Außerdem wird gezeigt, dass *H. brasiliensis* über mindestens 5 β -Glucosidasen - HbBGLU 1 bis 5 - verfügt. Es handelt sich bei allen 5 Proteinen um Glycosidhydrolase-Familie1-Enzyme. Vergleichende Analysen der Aminosäuresequenzen und der 3D-Strukturen ergaben, dass HbBGLU 5 für die Hydrolyse von β -Mannosiden zuständig sein könnte. HbBGLU 1 - 4 hingegen scheinen eine Linamarase-Unterfamilie zu bilden. Sie weisen offenbar eine organspezifische Verteilung auf. Während die cDNAs von BGLU 3 und 4 aus dem sekundären Phloem des Sprosses isoliert wurden (SOOKMARK et al. 2002 in NCBI; TIAN et al. 2006 in NCBI), stammen die cDNAs von BGLU 1 und 2 aus den Blättern.

Detaillierte Informationen zur Substratspezifität von HbBGLU 1 - 5, zu ihrer Funktion und zur gewebespezifischen Expression dürften künftig von großer Bedeutung für ein besseres Verständnis der Cyanogenese bei *H. brasiliensis* sein.

2.1 Einleitung

Glycosidhydrolasen und Glycosidhydrolase-Familie 1

Glycosidhydrolasen (GHs) sind Schlüsselenzyme des Kohlenhydratmetabolismus und kommen sowohl bei den Archaeobakterien als auch bei Eubakterien und Eukaryota vor (HENRISSAT 1991). Bei Pflanzen sind β -Glucosidasen der GH-Familie1 (GH1-BGLY) von zentraler Bedeutung. Sie haben wichtige Funktionen u. a. in der Abwehr von Fraßfeinden (POULTON 1990; RASK et al. 2000; BALLHORN et al. 2005). Im Falle von *Arabidopsis thaliana* ist GH-Familie1 eine Multigenfamilie mit 48 Mitgliedern. Die Sequenzierung weiterer Pflanzengenome lässt vermuten, dass das Vorhandensein von 40 - 50 GH1-BGLY in einem Genom eher die Regel als die Ausnahme ist. Arbeiten an Reis haben eine Anzahl von circa 50 GHs ergeben (XU et al. 2004). Eine so große Anzahl ähnlicher Enzyme könnte erforderlich sein, da Pflanzen eine Vielzahl an Glycosiden aufweisen. REICHELTE et al. (2002) dokumentierten alleine 36 verschiedene Glycosinolate bei *A. thaliana*. Bezüglich der GH1-Multigenfamilie aus *A. thaliana* ist

zunächst festzuhalten, dass es sich bei 8 Mitgliedern vermutlich um Pseudogene handelt. 47 der Gene haben einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und können in zehn Unterfamilien eingeteilt werden (Xu et al. 2004). Die Enzyme verschiedener Unterfamilien erfüllen vermutlich unterschiedliche Funktionen, während Enzyme einer Unterfamilie ähnliche, wenn nicht gleiche Funktionen haben (Xu et al. 2004). So kodiert z. B. Unterfamilie 7 (es handelt sich um sechs Gene) die einzigen bei *A. thaliana* bekannten Myrosinasen. β -Glycosidasen mit ein und derselben Funktion könnten zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bzw. oder in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Xu et al. 2004). Durch die Zuordnung von β -Glycosidasen mit bekannter Substratspezifität aus anderen Organismen war es den Autoren auch möglich, neben der Unterfamilie 7, weiteren Unterfamilien hypothetische Funktionen zuzuweisen, die im Falle von β -Glycosidase 44 (BGLU 44) auch am heterolog exprimierten Protein überprüft wurden. So handelt es sich bei den Enzymen der Unterfamilie 9, zu denen BGLU 44 gehört, wahrscheinlich um β -Mannosidasen (Xu et al. 2004). Die Enzyme der Unterfamilie 10 haben ihre Funktion vermutlich in der Lignifizierung. Unterfamilie 2 ist allgemein an Abwehrreaktionen beteiligt, was natürlich auch für die Myrosinasen gilt. BGLUs aus Unterfamilie 3 schließlich werden in Zusammenhang mit biotischem und abiotischem Stress exprimiert (Xu et al. 2004). Obwohl offensichtlich nicht jedes der Enzyme β -Glucoside spaltet, werden diese von den Autoren trotzdem unter der Abkürzung BGLU geführt. Diese soll, der Vergleichbarkeit wegen, im zweiten Kapitel generell beibehalten werden. Im Rahmen der übrigen Kapitel wird die Abkürzung jedoch ausschließlich für Enzyme verwendet, die auch nachweislich β -Glucoside spalten.

Alle bis auf drei der GH1-BGLY haben ein 19 - 38 Aminosäuren langes Signalpeptid (Xu et al. 2004). Die voraussichtlichen Zielorte der Enzyme umfassen den Apoplasten, die Vakuole, das ER-Lumen, die ER-Membran, die Plasmamembran, die Peroxisomen und die mitochondrielle Matrix. Mit 26 Enzymen wird aber der Großteil der BGLUs offenbar vornehmlich, oder vielleicht sogar ausschließlich, in den Zellwandbereich sekretiert (Xu et al. 2004).

Von mehr als zehn Enzymen der GH-Familie 1 ist mittlerweile die dreidimensionale Struktur bekannt. Es handelt sich, wie unter anderem von BARRETT et al. (1995) für Linamarase aus *Trifolium repens* und VERDOUCQ et al. (2004) für Dhurrinase 1 aus *Sorghum bicolor* beschrieben, um Proteine mit einer $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Faltung (Xu et al. 2004). Da Enzyme ein und derselben GH-Familie ähnliche AS-Sequenzen und damit auch ähnliche 3D-Strukturen aufweisen, erlaubt die Strukturanalyse dieser GHs, Rückschlüsse auf die 3D-Struktur der übrigen Familienmitglieder (DAVIES und HENRISSAT 2002).

GH1-BGLY sind durch eine Reihe konservierter Sequenzmotive charakterisiert (siehe Seite 11). Von zentraler Bedeutung sind 1. das TF/LNEP- (mit Ausnahme der Myrosinasen) und 2. das I/VT/SENG-Motiv. Sie beinhalten die beiden an der Spaltung der glycosidischen Bindung beteiligten Glutaminsäurereste. Während der Glutaminsäurerest aus dem TF/LNEP-Motiv eine Säure-Base-

Katalyse ermöglicht, kann der aus dem I/VT/SENG-Motiv das anomerische Kohlenstoffatom des Glycosids nucleophil angreifen, was letztendlich zur Abspaltung des Zuckers führt (BURMEISTER et al. 2000).

Linamarasen und Linamarase aus *H. brasiliensis*

Als Linamarasen werden GHs bezeichnet die das cyanogene Glucosid (CG) Linamarin spalten. Linamarasen finden sich u.a. bei *Phaseolus lunatus*, *Trifolium repens*, *Manihot esculenta*, *Linum usitatissimum* und *Hevea brasiliensis* (FREHNER und CONN 1987; HUGHES 1990; MKPONG et al. 1990; FIELDS und GERHARDT 2001; SELMAR et al. 1987). Im Blattgewebe des Manioks *M. esculenta*, der wie *H. brasiliensis* zu den Euphorbiaceae gehört, sind 3 Isoenzyme von Linamarase beschrieben worden. Die Enzyme spalten nicht nur Linamarin, sondern hydrolysieren darüber hinaus auch andere Glycoside, wie z.B. Prunasin, Cellobiose und das künstliche Substrat pNPGal (para-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid; MCMAHON et al. 1995). Es muss sich insofern nicht in allen 3 Fällen um Linamarase handeln. Von zwei der Enzyme ist die AS-Sequenz bekannt. Sie gehören, wie auch die Linamarase aus *T. repens*, zur GH-Familie1. Im Gegensatz zum Maniok ist bei *T. repens* nur eine Linamarase beschrieben (HUGHES 1990). Auch bei *H. brasiliensis* könnte es in den Blättern nur eine Linamarase (Blatt-Linamarase) geben. Da es sich offenbar außerdem um die einzige β -mono-Glycosidase des Blattgewebes handelt, ist das Enzym nicht ausschließlich für die Spaltung von Linamarin und Lotaustralin zuständig. Es scheint vielmehr die Hydrolyse sämtlicher, in der Pflanze vorkommenden, β -mono-Glucoside und β -mono-Galactoside zu katalysieren (SELMAR et al. 1987). Im Latex von *H. brasiliensis* wurde allerdings eine weitere β -Glucosidase bzw. Linamarase nachgewiesen, die dort als Teil des Latexallergens *Hev b 4* vorliegt (SUNDERASAN 2002). Da auch die Blätter Latex führen ist anzunehmen, dass das Enzym (Latex-Linamarase) auch hier exprimiert wird. Ob es zur teilweise apoplastisch lokalisierten Blatt-Linamarase identisch ist, ist nicht abschließend geklärt, erscheint aber schon aufgrund der Lokalisierung unwahrscheinlich. Darüber hinaus wird eine weitere β -Glucosidase bzw. Linamarase offenbar in spezialisierten Zellen des sekundären Phloems als vegetatives Speicherprotein (VSP) eingelagert (TIAN et al. 1998; TIAN et al. 2006 in NCBI). Da Blätter aber kein sekundäres Phloem aufweisen, schließen die Autoren ein Vorkommen des Proteins (VSP-Linamarase) in diesem Organ aus. Ob das Enzym trotzdem zur Blatt-Linamarase identisch ist, ist nicht bekannt. Außerdem wurde noch eine weitere β -Glucosidase aus dem sekundären Phloem von *H. brasiliensis* sequenziert (SOOKMARK et al. 2002 in NCBI). Der Größe von 66 kDa wegen wird das Protein als P66 bezeichnet. Aufgrund dieser Befunde stellt sich die Frage, ob in den Blättern von *H. brasiliensis* wirklich nur eine Linamarase bzw. β -Glucosidase vorkommt.

Somit ergeben sich für dieses Kapitel folgende Fragestellungen und Zielsetzungen:

1. Werden Latex-Linamarase und VSP-Linamarase in den Blättern von *H. brasiliensis* exprimiert?
2. Ist Latex-Linamarase mit der von SELMAR et al. (1987) beschriebenen Blatt-Linamarase identisch?
3. Ist VSP-Linamarase mit der von SELMAR et al. (1987) beschriebenen Blatt-Linamarase identisch?
4. Gehören Latex-Linamarase, VSP-Linamarase, P66 und Blatt-Linamarase zur GH-Familie1?
5. Wenn ja, lassen sich die Enzyme einer oder mehreren der von Xu et al. (2004) für *A. thaliana* beschriebenen GH1-Unterfamilien zuordnen und können so Rückschlüsse auf die Substratspezifität gezogen werden?
6. Wie viele Gene gibt es bei *H. brasiliensis*, die für Linamarase-ähnliche Enzyme kodieren?
7. Lässt sich die heterologe Expression der Blatt-Linamarase in *Escherichia coli* für künftige Substratspezifitätsmessungen und Strukturanalysen etablieren?

2.2 Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Pflanzenanzucht

In den hier dargestellten Versuchen wurde ausschließlich Blattmaterial von *Hevea brasiliensis*-Pflanzen aus den Beständen der Angewandten Botanik der Universität Hamburg verwendet. Die Bäume befinden sich seit circa 20 Jahren in Gewächshauskultur. Weitere Angaben, insbesondere zu den Anzuchtbedingungen, finden sich im Material und Methoden-Teil des ersten Kapitels.

Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte in Anlehnung an die Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987). Zunächst wurde frisches Blattmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen. Das Pulver wurde anschließend auf zwei, in flüssigem Stickstoff vorgekühlte, 2 ml Eppendorf®-Tubes verteilt. Anschließend wurden sofort 500 µl Extraktionspuffer (200 mmol * l⁻¹ NaCl; 5 mmol * l⁻¹ EDTA; 1 % SDS; 50 mmol * l⁻¹ Tris pH 8,9) hinzugegeben. Das Blattpulver wurde durch Vortexen für 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit gleichmäßig im Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend wurden 750 µl Mischungspuffer hinzupipettiert. Dieser setzte sich aus 500 µl Phenol (pH 4) und 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 Volumenanteile) zusammen. Der Mischungspuffer wurde immer direkt vor der Extraktion frisch angesetzt. Nach Zugabe des Puffers wurde für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 3 °C und mit 16.000 g für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). Der Überstand (knapp 500 µl) wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen auf eine RNA-bindende Säule (Plant Total RNA Mini Kit Avegene®) aufgetragen und diese für 30 Sekunden bei 3 °C und mit 16.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Nach abgeschlossener Reinigung wurde die Gesamt-RNA in 50 µl DEPC-behandelten MilliQ®-Wassers aufgenommen. Die Qualität der RNA wurde gelelektrophoretisch überprüft (siehe Seite 77) und die Konzentration der Proben photometrisch bestimmt (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec® 3000). Isolierte RNA wurde ausschließlich für die sofortige Weiterverarbeitung genutzt.

Da die Proben noch Spuren von DNA enthalten konnten wurde zunächst eine DNase-Behandlung. Hierzu wurden von jeder RNA-Isolierung 25 µl (dies entsprach etwa 10 µg RNA) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Inkubation erfolgten den Angaben des Herstellers (Fermentas) entsprechend. Die RNA wurde anschließend durch Zugabe von 125 µl reinen Ethanol sowie 17 µl Ammoniumacetat-Lösung (7,5 mol * l⁻¹) gefällt und mit 16.000 g bei 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). Das RNA-Pellet wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in 20 µl DEPEC-behandeltem MilliQ®-Wasser aufgenommen. 5 µl-Aliquots der RNA-Ansätze wurden elektrophoretisch analysiert (s.u.).

Synthese von ss cDNA

Je 10 µl (5 µg RNA) der gereinigten und DNase behandelten RNA wurden als Template für die Reverse Transkription eingesetzt. Als Primer wurden sowohl Randomnonamere (Sigma®) als auch ein Oligo-dT-Primer mit Anker (siehe Seite 78) verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war wie folgt: 10 µl der RNA-Lösung, 1 µl Randomnonamere bzw. 2 µl Oligo-dT-Primer (Konzentration im Ansatz 50 bzw. 100 µmol * l⁻¹), 4 µl Reaktionspuffer (Fermentas®), 1 µl dNTPs (Konzentration im Ansatz 2,5 mmol * l⁻¹; Fermentas®), 1 bzw. 2 µl DEPEC-behandeltes MilliQ®-Wasser und 2 µl H-Plus- bzw. H-Minus-Reverse-Transkriptase-Lösung (Fermentas®). Sollte die cDNA für Real Time PCR Experimente genutzt werden wurden ausschließlich Randomnonamere und H-Plus-Reverse-Transkriptase verwendet. War die cDNA hingegen für die Synthese doppelsträngiger (ds) cDNA gedacht, wurden Oligo-dT-Primer und H-Minus-Reverse-Transkriptase genutzt.

Zunächst wurden nur RNA und Primer gemischt und für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt. Nach anschließender, 5 minütiger Kühlung auf Eis, wurden die übrigen Komponenten hinzugegeben und die Ansätze für 1 Stunde bei 42 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Proben wurden entweder für Real-Time-PCR (siehe Seite 67) oder für die Synthese von ds cDNA verwendet.

Synthese von ds cDNA

Im Anschluss an die Synthese der cDNA wurden die Proben zunächst auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 8 µl DNA-Polymerase I Puffer (Fermentas®), 68 µl DEPC-behandeltes MilliQ®-Wasser, 0,8 µl dNTP-Mix (25 µmol * l⁻¹), 0,2 µl RNase H (Fermentas®) und 3 µl DNA-Polymerase I (Fermentas®) hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 15 °C im Thermoschüttler (Eppendorf®) inkubiert.

Nach Ablauf der 2 Stunden wurden sofort 2,5 µl T4-DNA-Polymerase hinzupipettiert und die Proben für weitere 30 Minuten bei 15 °C im Thermoschüttler (Eppendorf®) inkubiert, um eine Erzeugung von glatten Enden („Blunt Ends“) zu ermöglichen. Abschließend erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme durch 5 minütige Erwärmung auf 65 °C.

Zur Entfernung von Puffersalzen und Proteinen wurden die Proben 2-mal mit je 50 µl Chloroform extrahiert. Hierbei wurden die Mischungen für 1 Minute gevortext und anschließend für 15 Minuten mit 16.000 g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). Die Überstände wurden vorsichtig mittels Pipette abgenommen und in neue Eppendorf®-Tubes überführt. Anschließend wurde die ds cDNA durch Zugabe von 400 µl Ethanol (100 %) und 20 µl Natriumacetat (Konzentration 3 mol * l⁻¹) sowie Zentrifugieren für 20 Minuten mit 16.000 g bei 3 °C gefällt. Zur Verbesserung der Fällungseffizienz wurden die Proben für 1 Stunde bei -20 °C inkubiert

und anschließend erneut, diesmal für 30 Minuten, zentrifugiert. Das Pellet wurde 2-mal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, unter der Cleanbench kurz getrocknet und auf Eis gestellt.

Um eine Amplifikation der 5'- und 3'-Enden der ds cDNA zu ermöglichen wurden an diese Adapter mit bekannter Sequenz ligiert. Diese bestanden aus zwei Primern (siehe Seite 78) deren Sequenzen größtenteils komplementär waren. Sie lagerten sich so zusammen, das sich ein glattes Ende ergab, mit dem der Adapter an die ds cDNA ligiert werden konnte sowie einen Überhang, der eine beliebige Orientierung der Adapter unmöglich machte. Das ds cDNA Pellet wurde in 6 µl DEPEC-behandeltem MilliQ®-Wasser sowie 2 µl Adapterlösung ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) aufgenommen und zum Rehydratisieren für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1 µl T4-Ligase-Puffer und 1 T4-Ligase hinzugegeben (Fermentas®). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Thermoschüttler (Eppendorf®) inkubiert. Abschließend wurden 20 µl DEPEC-behandeltes MilliQ®-Wasser hinzugegeben. Die ds cDNA wurde sowohl für die Amplifikation einzelner Abschnitte als auch kompletter cDNA-Sequenzen genutzt.

Long Distance (LD) PCR

Für die Amplifikation längerer cDNA-Abschnitte wurde der LD-PCR-Mix der Firma ClonTech® verwendet. War das Amplifikat für eine Klonierung bzw. Sequenzierung vorgesehen wurde der Mix ebenfalls genutzt, da er eine Taq-Polymerase mit Proof-Reading-Funktion enthält. Bei allen PCR-Ansätzen wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Eine Liste aller verwendeten Primer und deren Annealingtemperatur findet sich im Anhang auf Seite 174.

Vor der Klonierung wurden Puffersalze und Primerdimere durch Fällung des Amplifikates mittels SureClean® (Bioline®) entfernt. Die Fällung wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch analysiert (s.u.) und die Konzentration photometrisch bestimmt (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec® 3000).

Real Time (RT) PCR

Für alle RT-PCR-Experimente wurde der RT-Master-Mix der Firma BioRad® verwendet. Um direkte Vergleiche zwischen den verschiedenen Blattstadien und den unterschiedlichen Proteinen (siehe Ergebnisteil) zu ermöglichen, war es sowohl erforderlich einen internen Standard auszuwählen, als auch die PCR-Effizienz der verwendeten Primer zu ermitteln. Die Effizienz sollte zwischen 95 und 100 % liegen. Für deren Prüfung erfolgte zunächst eine Amplifikation entsprechender Sequenzabschnitte aus ds cDNA (s.o.) mittels LD-PCR (s.o.), bei der die Primer genutzt wurden, die später auch im RT-Experiment Verwendung finden sollten. Die jeweiligen Amplifikate wurden unter Verwendung von SureClean® (Bioline®) gefällt, um Puffersalze und Primerdimere abzutrennen. Dabei wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische

Analyse (s.u.) der gereinigten Amplifikate sowie eine photometrische Bestimmung der Konzentrationen (Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec® 3000). Aliquots der Proben wurden auf Konzentrationen von 5, 10, 20 und 30 pg * μl^{-1} eingestellt und als Template für RT-PCR verwendet. Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1. 12,5 μl RT-PCR-Master-Mix
2. 1 μl Template
3. 0,5 μl Primermix
4. 11 μl MilliQ®-Wasser

Der PCR-Cycler wurde wie folgt programmiert:

1. 95 °C für 5 Minuten
2. 95 °C für 20 Sekunden
3. 58 °C für 30 Sekunden
4. 72 °C für 40 Sekunden
5. 72 °C für 10 Minuten

Schritt 2 - 4 wurden als Schleife 40-mal wiederholt. Die Fluoreszenz der Proben wurde zu Beginn der PCR, nach jedem Schleifendurchlauf und nach dem letzten Inkubationsschritt gemessen. Daraufhin wurde die relative Transkriptmenge nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = 2^{(1 + \text{CycleT Max} - \text{CycleT Mes})}$$

(CycleT Max = höchster gemessener Cycle-Threshold; CycleT Mes = jeweiliger gemessener Cycle-Threshold)

Die relative Transkriptmenge wurde gegen die tatsächliche Konzentration des Templates aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß gibt Auskunft über die Effizienz der PCR und damit über die Eignung der jeweiligen Primer. Wie die Vorversuche zeigten, lagen sämtliche Effizienzwerte für die gewählten Primer zwischen 96 und 99 % (siehe Tabelle 2.2.1). Die ausgewählten Primer konnten somit für die RT-PCR-Experimente verwendet werden.

Tabelle 2.2.1: Effizienz der RT-PCR bei Verwendung von β -Glucosidase-, Hydroxynitrillyase- und MTA (Microtubuliassoziertes Protein)-spezifischen Primern

Für die RT-PCR wurden definierte Mengen an Amplifikat aus dem Zielsequenzbereich der jeweiligen Primer verwendet. Anschließend wurde diese gemessene DNA-Menge gegen den tatsächlichen Gehalt der Proben aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß gibt die Effizienz der PCR Reaktion wieder.

Amplifizierte Sequenz	Effizienz der RT-PCR [%]	Primerbezeichnung
BGLU 1	99	RT BGLU 1
BGLU 2	96	RT BGLU 2
BGLU 5	99	RT BGLU 5
HNL	96	RT HNL
MTA	99	RT MTA

Die Bestimmung der PCR-Effizienz zeigte, dass eine Verwendung von identischen Templatemengen im RT-PCR-Ansatz nicht zu identischen Cycle-Threshold-Werten (CT-Werte) führte, was den Vergleich der verschiedenen cDNAs anbelangte. Diese Differenz muss berücksichtigt werden, um später einen Vergleich der relativen Transkriptmengen zu ermöglichen. Aus den gemessenen CT-Werten wurde daher der probenspezifische Korrekturfaktor (CT_{Korr}) nach folgender Formel berechnet:

$$CT_{\text{Korr}} = CT_{\text{Probe}} - CT_{\text{Ref}}$$

(CT_{Probe} = Messwert der jeweiligen Probe und CT_{Ref} = MTA-Referenzwert, bei allen Proben gleich)

Außerdem wurde die Eignung von MTA (microtubuliassoziertes Protein) als Referenzgen getestet. Hierzu wurden identische Mengen an Gesamt-RNA, die aus den Blattstadien B, C und D isoliert wurde, mittels Reverser Transkription (s.o.) in cDNA überführt. Diese wurde anschließend für RT-PCR verwendet. Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1. 12,5 μ l RT-PCR-Master-Mix
2. 2 μ l Template (cDNA)
3. 0,5 μ l Primermix
4. 10 μ l MilliQ[®]-Wasser

Der PCR-Cycler wurde wie bereits zuvor beschrieben programmiert. Die CT-Werte waren in allen Proben nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). MTA scheint sich somit als Referenzgen zu eignen. Die geringfügigen Abweichungen bezüglich der MTA-CT-Werte zwischen den einzelnen Blattstadien wurden in dem wie folgt berechneten Korrekturfaktor ($CT\text{-}MTA_{\text{Korr}}$) berücksichtigt:

$$CT\text{-}MTA_{\text{Korr}} = CT\text{-}MTA_{\text{max}} - CT\text{-}MTA_{\text{min}}$$

($CT\text{-}MTA_{\text{max}}$ = Maximaler gemessener CT-Wert; $CT\text{-}MTA_{\text{min}}$ = minimaler gemessener CT-Wert)

CT-MTA_{Korr} ist probenunspezifisch und daher für alle Proben gleich. Die relativen Transkriptmengen in den Versuchsansätzen schließlich wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Transkriptmenge} = 2^{1 + (CT_{\max} - CT_{\text{mes}} - CT_{\text{korr}} - CT\text{-MTA}_{\text{korr}})}$$

(CT_{max} = höchster gemessener CT-Wert; CT_{mes} = jeweiliger Messwert)

Klonierung

Zu sequenzierende PCR-Amplifikate wurden in den Vektor pCR4-TOPO® der Firma Invitrogen® kloniert. Für die heterologe Proteinexpression vorgesehene DNA wurde sowohl in den Vektor pTrcHis2-TOPO als auch in pET-SUMO® kloniert, die ebenfalls bei der Firma Invitrogen® erworben wurden. Alle Arbeitsschritte wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Transformation von kompetenten Zellen

Zur Transformation (nach SAMBROOK et al. 1989) wurden chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen XL1-Blue (-*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44*; Stratagene®) mit Kanamycin- oder Tetracyclinresistenz verwendet. Sie wurden kommerziell hergestellt (DNA-Cloning-Service®). Die bei -80 °C gelagerten *E. coli*-Zellen wurden erst direkt vor der Verwendung und auf Eis aufgetaut. Nach etwa 15 Minuten wurden je 2,5 µl des Ligationsansatzes bzw. 0,25 µl eines gereinigten Plasmids hinzupipettiert und die Ansätze für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 Sekunden in ein 42 °C heißes Wasserbad überführt („heatshock“) und danach wieder zurück auf Eis gestellt. Zu jedem Inkubationsansatz wurden 0,5 - 1 ml LB-Medium nach SAMBROOK et al. (1989; siehe Seite 71) gegeben und die Zellen in diesem bei 37 °C für 1 Stunde regeneriert. Anschließend wurden von jedem Ansatz 10 und 100 µl auf antibiotikahaltigem LB-Festmedium (siehe Seite 71) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. XL1-Blue-Zellen fanden immer dann Verwendung, wenn Ligationsansätze für die Transformation verwendet wurden oder wenn ein Plasmid für die Sequenzierung bzw. einen Plasmidtransfer vervielfältigt werden sollte.

Außerdem wurden BL21Star(DE3)®-Zellen der Firma Invitrogen® sowie Rosetta-Gami-2-DE3-Zellen von Novagen® zur Transformation genutzt. Beide Stämme sind ausschließlich für die heterologe Expression von Protein geeignet. Daher wurden nur isolierte Plasmide für die Transformation verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Sah das Manual allerdings die Verwendung eines anderen Nährmediums als LB-Medium vor, wurde abweichend trotzdem LB-Medium benutzt.

Kolonie Screening

Um zu überprüfen, bei welchen der Kolonien es sich um Bakterien mit Insert handelte, wurde ein PCR-basiertes Screening durchgeführt. Hierzu wurden einzelne Kolonien mit Zahnstochern von den Platten genommen und zum einen in Eppendorf®-Tubes (0,5 ml) übertragen, in denen 25 µl PCR-Master-Mix vorgegeben waren, zum anderen erneut ausplattiert. Der PCR-Master-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

PCR 1x

1. 10x Reaktionspuffer : 2,5 µl
2. dNTPs (25 mmol/l) : 0,25 µl
3. Taq : 0,3 µl
4. Milli Q : 19 µl
5. Insertspezifische Primer : 1 µl

Nach 30 PCR-Cyclen wurden je 5 µl der Ansätze gelelektrophoretisch analysiert (s.u.). Informationen zu den jeweiligen Primern und deren Annealingtemperatur finden sich unter dem Punkt „Verwendete Primer“.

Über-Nacht-Kulturen (ÜNK)

Von mittels PCR-Screening ausgewählten Kolonien wurden zunächst Übernachtskulturen (ÜNK) angesetzt. Mit einem Zahnstocher wurden hierzu *E. coli*-Zellen von der Platte genommen und der Zahnstocher in ein Tube, in dem sich 3 ml antibiotikahaltiges (siehe Liste der verwendeten Antibiotika) LB-Flüssigmedium befand, überführt. Die Ansätze wurden über Nacht in einem 37 °C warmen Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert und anschließend für die Isolierung der Plasmid-DNA (s.u.) verwendet.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mittels Plasmid Mini Kit der Firma Avegene®. Dabei wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Zur Kontrolle wurden die Plasmide gelelektrophoretisch analysiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec® 3000). Die Plasmide wurden sowohl für die Sequenzierung (DNA Cloning Service®) als auch für die Transformation verwendet.

Ansetzen von LB-Medium und Gießen von antibiotikahaltigen Platten

Das LB-Medium (nach SAMBROOK et al. 1989) wurde sowohl in fester Form für das Gießen von antibiotikahaltigen Platten, als auch in flüssiger Form für das Erstellen von Übernachtskulturen (ÜNK), angesetzt. Es bestand aus 5 g * l⁻¹ Hefeextrakt, 10 g * l⁻¹ Trypton und 10 g * l⁻¹ NaCl. Die Chemikalien wurden in eine Schottflasche (1 Liter) gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter

aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt. Das Medium wurde anschließend autoklaviert. War es für das Gießen von Agarplatten vorgesehen, wurden vor dem Autoklavieren noch 30 g Agar hinzugegeben. Nachdem das Festmedium abgekühlt war („handwarm“), wurden die jeweiligen Antibiotika (siehe Seite 64) hinzupipettiert. Anschließend wurde das Festmedium sofort zum Gießen von Platten verwendet, wobei pro Petrischale 15 ml Medium verwendet wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Platten in einen Kühlschrank (4 °C) gestellt, um eine Degradation der Antibiotika zu verhindern.

Heterologe Proteinexpression

Für die heterologe Expression wurden die Vektoren pTrcHis2-TOPO und pET-SUMO® und BL21Star(DE3)®-Zellen der Firma Invitrogen® sowie Rosetta-Gami-2-DE3-Zellen von Merck® genutzt. Alle Arbeitsschritte wurden den Angaben der Hersteller entsprechend durchgeführt.

Extraktion von heterolog exprimiertem Protein

Heterolog exprimiertes Protein wurde auf dreierlei Weise extrahiert. Durch Ultraschallbehandlung der Zellen, durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen, sowie durch Verwendung eines Lysispuffers.

Vor der Extraktion durch Ultraschallbehandlung wurden zunächst eine Pufferlösung und eine PMSF-Stammlösung (Phenylmethylsulfonylfluorid) angesetzt. Der Puffer bestand aus einer 50 mmol * l⁻¹ Tris-HCl-Lösung (pH 7,5) in der des weiteren 200 mmol * l⁻¹ NaCl, 5 mmol * l⁻¹ DTT (di-Thiothreitol) und 1mmol * l⁻¹ PMSF solubilisiert wurden. Zur Herstellung der PMSF-Stammlösung wurde PMSF in einer Konzentration von 10 mmol * l⁻¹ in Isopropanol aufgenommen. Aus den *E. coli*-Kulturen (siehe heterologe Expression) wurden je 5 ml entnommen und für 10 Minuten mit 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2,5 ml Pufferlösung resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden 25 µl der PMSF-Stammlösung hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Ultraschallbehandlung (Sonorex® Stufe 7) für 4-mal 10 Sekunden. Nach jeder der Wiederholungen erfolgte zunächst eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Auch während der Ultraschallbehandlung selbst wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Danach folgten zwei Zentrifugationsschritte von jeweils 10 Minuten Länge bei 3 °C und 16.000 g (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). Das Zelldebris und damit auch unlösliches Protein wurden in 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt (Eppendorf® Thermoschüttler). Anschließend wurden die Proben erneut für 10 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert. Die im Überstand der Extraktion befindlichen Proteine wurden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und für 30 Sekunden mit 16.000 g zentrifugiert. Dann wurden alle Proben gelelektrophoretisch analysiert (siehe Seite 77).

Für die Proteinextraktion durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen der Zellen wurden zunächst die folgenden Stamm-Lösungen angesetzt. Eine KH_2PO_4 - sowie eine K_2HPO_4 -Lösung die jeweils eine Konzentration von $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hatten. Zu 4,7 ml der K_2HPO_4 -Lösung wurden 0,3 ml der KH_2PO_4 -Lösung, 2,3 g NaCl, 0,7 g KCl, 10 ml Glycerol, 0,5 ml Triton X-100, 68 mg Imidazol und 50 ml MilliQ®-Wasser gegeben. Nach gleichmäßigem Durchmischen wurde der pH-Wert auf 7,8 eingestellt und die Pufferlösung wiederum mit MilliQ®-Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Aus den *E. coli*-Kulturen wurde je 1 ml entnommen. Die Proben wurden mit 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 μl Pufferlösung aufgenommen. Außerdem wurden 10 μl Lysozymlösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 42 °C im Wasserbad wieder aufgetaut. Der Vorgang wurde 4mal wiederholt. Die Zellaufschlüsse wurden für 10 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert und die Überstände vorsichtig in neue Eppendorf® Tubes überführt. Die Pellets sowie Aliquots der Überstände wurden wie zuvor beschrieben mit SDS-Ladepuffer vermischt und gelelektrophoretisch analysiert (siehe Seite 77).

Für die Proteinextraktion wurde außerdem der fertige Zellysispuffer BugBuster® der Firma Novagen® verwendet. Aus den *E. coli*-Kulturen (siehe heterologe Expression) wurde je 1 ml entnommen und für 10 Minuten mit 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 μl BugBuster® resuspendiert. Anschließend erfolgte unter ständigem Schütteln (Thermoschüttler Eppendorf®) eine 30 minütige Inkubation bei 25 °C und. Danach wurden die Proben für 10 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert und die Überstände vorsichtig in neue Eppendorf® Tubes überführt. Die Pellets sowie Aliquots der Überstände wurden wie zuvor beschrieben mit SDS-Ladepuffer vermischt und gelelektrophoretisch analysiert. Weitere Informationen zum BugBuster®-Lysispuffer finden sich im Manual von Novagen®.

Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von DNA aus Blättern des C-Stadiums von *H. brasiliensis* erfolgte nach der CTAB-Methode (MURRAY und THOMPSON 1980). Hierzu wurde zunächst ein 2fach konzentrierter CTAB-Puffer angesetzt. Dieser bestand 2 % CTAB ($w \cdot v^{-1}$), 100 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl, 1,4 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, 20 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Na-EDTA und 1 % PVP (Polyvinylpyrrolidon; $w \cdot v^{-1}$). Zunächst wurden nur Tris und NaCl in 200 ml MilliQ®-Wasser aufgenommen. Nachdem der pH-Wert auf 8 eingestellt worden war, wurden nacheinander Na-EDTA, CTAB und PVP hinzugegeben. Abschließend wurde die Lösung mit MilliQ®-Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

Dann wurden ganze *H. brasiliensis* Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen. Das Blattpulver wurde gleichmäßig auf 2 ml Eppendorf®-Tubes verteilt und in 800 μl des CTAB-Puffers sowie 2 μl Mercaptoethanol aufgenommen. Die Probe wurden für 1 Stunde bei 60 °C und 1400 Umdrehungen auf dem Schüttler (Thermoschüttler

Eppendorf®) inkubiert. Anschließend wurden 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Die Proben wurden gut geschüttelt, für 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend erneut geschüttelt. Daraufhin wurden sie bei 3 °C und mit 16.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Je 600 µl des wässrigen Überstandes wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 2 ml Eppendorf® Tube überführt. Zu den Überständen wurden jeweils 1,4 ml eiskaltes Ethanol gegeben und die Tubes anschließend mehrfach invertiert, um eine gleichmäßige Durchmischung zu erzielen. Daraufhin erfolgte eine 2stündige Inkubation bei -20 °C zur Fällung der DNA. Die Fällungsansätze wurden für 1 Stunde mit 16.000g bei 3 °C zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). Die Pellets wurden 2mal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, wobei vor jeder Zentrifugation eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte. Danach wurden die Pellets für 10 Minuten unter der Clean-Bench getrocknet und in TE-Puffer (Tris-EDTA; pH 8) aufgenommen.

RNase-Behandlung und Restriktionsverdau von DNA

Je 90 µl der wie zuvor beschrieben hergestellten DNA-Lösungen wurden mit 10 µl RNase A versetzt (Fermentas®) und bei 37 °C für 30 Minuten auf dem Schüttler (Thermoschüttler Eppendorf®) inkubiert. Von jedem dieser Ansätze wurden 79 µl mit *NcoI* und *Alw44I* (Fermentas®) verdaut. Dabei wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren.

Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde

Die Herstellung der Sonde erfolgte durch den Einbau DIG-markierten dUTPs (Roche®) im Rahmen der Amplifikation des als Sonde vorgesehenen Sequenzabschnittes.

Zunächst wurde der Sequenzabschnitt mittels PCR (siehe Seite 67) sowohl aus cDNA (siehe Seite 66) als auch aus genomischer DNA (siehe Seite 73) amplifiziert, um das Vorhandensein von Introns im Bereich der Zielsequenz ausschließen zu können. Nach der Entfernung von Puffersalzen und Primerdimeren mittels SureClean (Bioline®), bei der den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren wurde, erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse der Proben (siehe Seite 79). Es zeigte sich, dass die Zielsequenz keinerlei Introns aufwies. Das Amplifikat wurde daher als Template für die Sondenherstellung genutzt. Diese erfolgte mittels PCR. Zunächst wurde ein dNTP-Spezialmix angesetzt, der aus je 2,5 µl dATP, dCTP und dGTP sowie 1,7 µl dTTP und 30,8 µl MilliQ®-Wasser bestand. Von diesem wurden 1,5 µl zum PCR-Ansatz gegeben, der sich aus 2 µl Amplifikat, 2 µl Primern, 5 µl Taq-Polymerase-Puffer (DNA Cloning Service®), 1 µl Taq-Polymerase (DNA Cloning Service) und 35,5 µl MilliQ®-Wasser zusammensetzte. Außerdem wurden 3 µl DIG-11dUTP (1 mmol * l⁻¹; Roche®) hinzupipettiert. Der PCR-Cycler wurde wie folgt programmiert:

1. 95 °C für 4 Minuten
2. 95 °C für 20 Sekunden
3. 57 °C für 30 Sekunden
4. 72 °C für 40 Sekunden
5. 72 °C für 10 Minuten

Die Schritte 2 bis 4 wurden als Schleife 35mal wiederholt. Nach Abschluss des Programs wurde die Sonde gelelektrophoretisch analysiert um den DIG-11dUTP-Einbau zu überprüfen. Durch die DIG-Markierung erhöht sich das Molekulargewicht des Amplifikates. Als Kontrolle diente Amplifikat ohne DIG-Markierung. Die Ergebnisse zeigten, dass der Einbau gut funktioniert hatte. Außerdem wurde die Sondenkonzentration photometrisch bestimmt (Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec® 3000).

Blotting der DNA

Das Blotting von DNA erfolgte nach der Methode von SOUTHERN (1975). Zunächst wurden Aliquots der verdauten DNA (siehe Seite 74) auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei wurden sowohl 3 als auch 9 µg DNA pro Tasche aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese (siehe Seite 77) wurde das Gel zunächst 2-mal für je 15 Minuten in Denaturierungs-Lösung ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH und $1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl) auf dem Schüttler inkubiert. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte eine Inkubation in Neutralisations-Lösung ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris und $1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl; pH 7,4) für 2mal 15 Minuten auf dem Schüttler. Anschließend wurde die DNA durch kapillaren Transfer in 20x SSC-Lösung auf eine Hybond-Nylon-Membran (N-Membran) geblotted. Der Blot wurde dabei wie folgt zusammengesetzt: in eine Kunststoff-Schale wurde zunächst ein Stapel Papierhandtücher gelegt. Auf diesen wurden 4 Lagen Filterpapier platziert, von denen die oberste in SSC-Puffer angefeuchtet wurde. Auf das angefeuchtete Filterpapier wurde die N-Membran gelegt. Auf diese folgte das Agarosegel, das wiederum mit drei Lagen angefeuchtetem Filterpapier bedeckt wurde. Ein viertes Stück Filterpapier wurde so zurechtgeschnitten, dass es an den Seiten des Blots überstand und mit den Enden in das SSC-Pufferreservoir hing. Um einen gleichmäßigen kapillaren Transport der SSC-Lösung zu gewährleisten wurde der Aufbau noch mit einem Gewicht beschwert. Der Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die DNA zunächst durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert und diese kurz mit Wasser gewaschen sowie anschließend getrocknet.

Detektion von *BGLU 1*- und *BGLU 1*-ähnlichen Genen

Zunächst wurde die N-Membran (siehe Blotting der DNA) zwecks Prähybridisierung für 2 Stunden bei 42 °C in Hybridisierungslösung (5x SSC; 0,1 % N-Laurosylsarcosin $w \cdot v^{-1}$ (flüssig), 0,02 % SDS $w \cdot v^{-1}$, 1 % Blockierungs-Reagenz Boehringer®) ohne Sonde inkubiert. Die Sonde wurde kurz in kochendem Wasser erhitzt und in einer Verdünnung von 1 zu 1000 mit Hybridisierungslösung vermischt. In dieser wurde die N-Membran dann bei 42 °C über Nacht inkubiert. Anschließend folgten 2 Waschschr

von jeweils 15 Minuten Länge in 2x Waschlösung (2x SSC; 0,1% SDS w * v⁻¹). Danach wurde noch für 2-mal 15 Minuten in 0,1x Waschlösung (0,1x SSC, 0,1% SDS w * v⁻¹) und bei 68 °C unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Nach einer kurzen Äquilibrationsphase in 2x Waschlösung bei Raumtemperatur, wurde die Membran für 1 Stunde auf dem Schüttler in PBS-Puffer (80 g * l⁻¹ Natriumchlorid; 2 g * l⁻¹ Kaliumchlorid; 7,65 g * l⁻¹ di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat; 2 g * l⁻¹ Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7) der 5 % BSA enthielt blockiert. Anschließend wurde DIG-spezifischer Antikörper (Roche®) in einer Verdünnung von 1 zu 10.000 hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die DIG-Detektion abgebrochen und die Membran 2-mal für je 15 Minuten in PBS-Puffer (PBS plus 5 % BSA und 0,05% Tween) gewaschen. Vor der Detektion mittels CSPD (Roche®) wurde die Membran kurz in Detektionspuffer (5.1 g Na₂HPO₄ + 4.9 g KH₂PO₄ in 1 L dH₂O; pH 7) äquilibriert. Dann wurde sie auf eine Plastikfolie überführt, mit CSPD-Lösung (Verdünnung 1 zu 100 in Detektions-Puffer) benetzt und in der Folie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurde ein Streifen X-Ray-Film (Kodak BIOMAX MS) auf die Membran gelegt und, je nach Stärke des Signals für 5 - 120 Minuten belichtet. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe des Gerätes Compact 2 der Firma Protec.

Identifikation offener Leseraster (ORF = Open Reading Frame)

Die Identifikation offener Leseraster in den sequenzierten cDNAs und deren Übersetzung in eine Aminosäureabfolge erfolgte mit Hilfe des Online-Programms ORF-finder unter <http://www.ncbi.nih.gov/>.

Multiple Sequence Alignment und Erstellung von Dendrogrammen

Alle Alignments wurden mit Hilfe des Online-Programms ClustalW durchgeführt, das unter <http://align.genome.jp/> zu finden ist. Das Programm wurde auch für die Erstellung der auf den Alignments basierenden Dendrogramme verwendet.

Vorhersage potentieller Glycosilierungsstellen

Die Vorhersage potentieller Glycosilierungsstellen erfolgte auf Basis der Aminosäure-Sequenz unter Verwendung des Programmes Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

Bestimmung von Signalpeptiden und N-Termini

Die Identifikation von Signalpeptiden und N-Termini erfolgte unter Verwendung des Programmes Signalp (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

Vorhersage der subzellulären Lokalisation

Die Vorhersage der subzellulären Lokalisation erfolgte auf Basis der Aminosäure-Sequenz unter Verwendung des Programmes MultiLoc (www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/).

Berechnung von 3D-Strukturen

Die Berechnung der 3D-Strukturen der β -Glucosidasen erfolgte unter Verwendung des Programmes Swiss-Model des Schweizer Instituts für Bioinformatik und des Biozentrums der Universität Basel (<http://swissmodel.expasy.org>). Bei der gewählten automatischen Einstellung sucht das Programm zunächst nach einem Protein mit möglichst hoher Ähnlichkeit bezüglich der Aminosäureabfolge (AS-Abfolge), von dem die 3D-Struktur bereits aufgeklärt wurde. Anschließend berechnet das Programm inwieweit sich die AS-Abfolge des Proteins in die 3D-Struktur einpassen lässt. Die Struktur beider Proteine sollte sich daher in weiten Teilen ähneln. Abweichungen im Detail sind aber möglich, wenn die Struktur anderenfalls energetisch instabil wäre. Je weniger sich die Strukturen der beiden Proteine zur Deckung bringen lassen, desto schlechter ist die Qualität des Modells.

Vergleichende Analyse von 3D-Strukturen

Für die Vergleichende Analyse und Dokumentation der 3D-Strukturen wurde das kostenfreie Programm UCSF Chimera der Abteilung „Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics“ an der Universität von Kalifornien, San Francisco (unterstützt von NIH P41 RR-01081) verwendet. Chimera ermöglicht u.a. die Modifikation der 3D-Strukturen, was z.B. die Färbung bestimmter Sequenzabschnitte, die Detaildarstellung einzelner AS, die Drehung und Vergrößerung angeht. Außerdem können mehrere Strukturmodelle übereinandergelegt werden, wobei Teile einzelner Strukturen beliebig ein- und ausgeblendet werden können. Darüber hinaus ist es möglich, die Abstände zwischen einzelnen Atomen zu messen sowie die Oberflächenstruktur des jeweiligen Proteins und deren Ladung zu berechnen. Alle Analyseergebnisse können als Bild-Datei (z.B. im Tiff-Format) abgespeichert werden.

Immunoaffinitätschromatographische Isolierung von β -Glucosidase aus Blättern von *H. brasiliensis*

Die Reindarstellung der β -Glucosidase erfolgte mittels Antikörper-Affinitätschromatographie. Ein entsprechendes Antiserum, das durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt wurde und monospezifische, polyklonale Antikörper gegen eine β -Glucosidase aus *H. brasiliensis* enthielt, wurde vom Biozentrum Klein Flottbek (Universität Hamburg) und von Herrn Selmar von der Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde die Antikörperaktivität im Antiserum mittels Präzipitintests überprüft. Hierzu wurden verschiedene Mengen des Antiserums (0,001 - 10 μ l) mit konstanten Mengen von Blattproteinrohextrakt (50 μ l) vermischt und mit PBS-Puffer (80 g * l⁻¹

Natriumchlorid; $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Kaliumchlorid; $7,65 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat; $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7) auf 1 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden zunächst 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend für über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze für 20 Minuten bei 16.000 g und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®) und die β -Glucosidaseaktivität im Überstand bestimmt (siehe Seite 80).

Die Isolierung der Antikörper erfolgte mit Hilfe einer ProteinA-Säule (BioRad®). ProteinA wird aus *Staphylococcus aureus* Zellen gewonnen und beinhaltet fünf Bereiche, die an die Fc-Region von IgG binden. ProteinA kann so an eine (Agarose-) Matrix gekoppelt werden, dass diese Bereiche frei liegen. Ein Molekül gekoppeltes ProteinA kann auf diese Weise mindestens zwei Moleküle IgG binden (Amersham biosciences® 2004). Eine in ihrem Innenvolumen verstellbare Säule (Pharmacia®) wurde mit $7,5 \text{ ml}$ ProteinA-Agarose befüllt und an eine computergesteuerte (BioRad® BioLogic Duo Flow Version 3.0) FPLC-Anlage (BioRad® BioLogic Duo Flow) angeschlossen. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumphosphat-Lösung (Binding Buffer; pH 7) äquilibriert. Anschließend wurde 1 ml des Antiserums aufgetragen und die Säule so lange mit Binding Buffer gespült, bis der UV-Detektor wieder 0 anzeigte. Daraufhin wurde mit 5 Säulenvolumina $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumcitrat-Lösung (pH 3,5) eluiert. Das Eluat wurde in 2 ml Eppendorf®-Tubes aufgenommen, wobei die Tubes nach jedem Milliliter gewechselt wurden. Pro Tube wurden $650 \text{ } \mu\text{l}$ Tris-HCl ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 8) vorgegeben. Hierdurch ergab sich ein Elutionsvolumen von circa 14 ml . Das Eluat wurde mit Hilfe von Konzentratoren (Vivascience® Vivaspin 6 ml Concentrator 30.000 MWCO PES) durch Zentrifugation (Eppendorf® Centrifuge 5810 R) bei 3.000 g und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf ein Volumen von $500 \text{ } \mu\text{l}$ eingengt. Die Durchflussrate der ProteinA-Säule war für alle Läufe auf $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ eingestellt. Die Aktivität der Antikörper nach der Reinigung wurde mittels Präzipitintest (s.o.) überprüft. Abschließend wurden die Antikörper in einen Natriumcarbonat-Puffer (Coupling Buffer; $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumcarbonat; $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid; pH 8,3) überführt. Die Umpufferung erfolgte mittels PD10-Säule (Amersham biosciences® Sephadex™ G-25 M). Mit Hilfe der Konzentratoren (s. o.) wurde die antikörperhaltige Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1 ml eingengt. Die Proteingesamtkonzentration wurde durch photometrische Messung bei 280 nm abgeschätzt. Die gereinigten und umgepufferten Antikörper wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-24 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Anschließend wurden die Antikörper an cyanbromid-aktivierte Sepharose (Amersham biosciences®) gebunden. Die Sepharose enthielt Zusatzstoffe, die vor der Kopplung der Antikörper durch waschen entfernt werden mussten. Für den Waschschrift wurden $0,3 \text{ g}$ des Sepharose-Pulvers abgewogen, in ein 50 ml Falcontube® überführt und in etwa 30 ml einer eiskalten HCl-Lösung ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl; pH 2,5) suspendiert. Die Suspension wurde zum Aufwirbeln des Gels auf niedriger Stufe gevortext und anschließend bei 1.500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert (Hettich Universal 16 A). Der Überstand

wurde abgenommen. Der Waschschrift wurde mehrfach wiederholt. Insgesamt wurde die Sepharose mit 300 ml HCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper hinzugegeben und die Mischung unter leichtem Schütteln, so dass die Sepharose sich nicht absetzen konnte, für 20 Stunden inkubiert. Das Medium wurde mit 1.500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde wie auch alle Überstände der folgenden Waschschrift photometrisch auf die Absorption bei 280 nm überprüft. Das Medium wurde zunächst 3-mal mit je 5 ml des Coupling Buffers (s.o.) gewaschen. Anschließend wurden 5 ml 0,1 mol * l⁻¹ Tris-HCl-Puffer (pH 8; mit 0,5 mol * l⁻¹ NaCl) zum Medium hinzugegeben und die Lösung 2 Stunden inkubiert (blockieren freier aktiver Gruppen). Daraufhin wurde das Medium wechselnd mit 5 ml 0,1 mol * l⁻¹ Acetat-Puffer (pH 4; mit 0,5 mol * l⁻¹ NaCl) und 5 ml 0,1 mol * l⁻¹ Tris-HCl-Puffer (pH 8; mit 0,5 mol * l⁻¹ NaCl) gewaschen. Der Waschschrift erfolgte insgesamt 4-mal. Alle Lösungen und Puffer wurden vor ihrer Verwendung in einem Eisbad gekühlt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten in einem Kühlraum bei 4 °C. Abschließend wurde das Medium in eine Säule (Pharmacia[®]) mit verstellbarem Innenvolumen und einem maximalen Fassungsvermögen von 2 ml überführt. Die Säule wurde an die bereits zuvor genutzte FPLC-Anlage angeschlossen und mit 20 ml PBS-Puffer äquilibriert. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde hierzu auf 0,15 ml * min⁻¹ eingestellt. Der Durchlauf wurde auf die Absorption bei 280 nm hin überprüft.

Für die Gewinnung des auf die Säule aufzutragenden Proteinrohextraktes wurden die Blätter zunächst unter Zugabe von PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) und flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver vermahlen. Dieses wurde in einer möglichst geringen Menge Phosphat-Puffer (67 mmol * l⁻¹ Phosphat; pH 6,7) aufgenommen. Mörser und Pufferlösung wurden im Eisfach bzw. im Kühlschrank bei 4 °C vorgekühlt. Alle, auch die im Folgenden geschilderten Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zum Entfernen der Blattgewebereste wurde das Homogenat zunächst über einen Wattefilter gereinigt und anschließend zwei mal für jeweils 20 Minuten bei 4 °C mit 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin erneut gefiltert (CS-Chromatographie[®] Service GmbH; Multoclear; Porengröße 0,45 µm). Mit Hilfe von Konzentratoren (Vivascience[®] Vivaspin 6 ml Concentrator 30.000 MWCO PES) wurde er auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt und anschließend mittels PD10-Säule (Amersham biosciences[®] Sephadex™ G-25 M) umgepuffert (in PBS-Puffer). Abschließend wurde der Blattextrakt auf ein Gesamtvolumen von 1 ml eingengt.

Vor dem Probenauftrag wurde die Antikörpersäule zunächst mit 10 ml PBS-Puffer äquilibriert. Die Durchflussrate wurde wie auch bei allen weiteren Schritten auf 0,15 ml * min⁻¹ eingestellt. Anschließend wurde 1 ml des Blattextrakts aufgetragen und so lange mit PBS-Puffer gespült, bis die Absorption des Durchlaufs bei 280 nm wieder 0 betrug. Die Elution erfolgte mit 20 mmol * l⁻¹ Ammoniaklösung pH 10. Das Eluat wurde in Eppendorf[®]-Tubes (2 ml) aufgefangen, wobei die Tubes nach jedem Milliliter gewechselt wurden. Pro Tube war 1 ml Citrat-Puffer (50 mmol * l⁻¹ Citrat; 100 mmol * l⁻¹ Phosphat; pH 5,6) vorgegeben. Das Elutionsvolumen betrug dadurch circa 20 ml. Das Eluat

wurde auf 500 µl eingeeengt (Vivascience® Vivaspin 6 ml Concentrator 30.000 MWCO PES) und durch Inkubation mit pNPG auf β-Glucosidaseaktivität hin überprüft (siehe Seite 80). Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Zur Überprüfung der Isolierung wurden 2,5 µl-Aliquots des Eluats mit SDS-Loading-Buffer vermischt, für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert (Eppendorf Thermostat 5320) und auf ein Polyacrylamid-Gel (siehe Seite 80) aufgetragen. Die Proteinbanden wurden anschließend mittels Colloidal-Coomassie-Färbung detektiert. (siehe Seite 80).

Agarosegele

Zum Auftrennen von RNA und DNA wurden 1,2 %ige Agarosegele verwendet. Je nach Größe des Gels wurden 1 g Agarose in 80 ml TAE-Puffer (s.u.) bzw. 2 g Agarose in 160 ml TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50 - 60 °C wurde Ethidiumbromid hinzupipettiert (Endkonzentration 500 ng * ml⁻¹) und die Lösung in eine Gelform gegossen. Je nach Anzahl und Volumen der aufzutragenden Proben wurden hierbei Käbme für 20 oder 30 Taschen verwendet. Die RNA oder DNA Proben wurden mit 5x Ladepuffer (Fermentas®) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer (s.u.) bei 70 V für 30 - 105 Minuten in einer Elektrophoresekammer der Firma BioRad (USA).

Ethidiumbromid lagert sich bei doppelsträngiger DNA zwischen den Basen ein. Bei RNA findet diese Einlagerung z.B. an Stellen intramolekularer Schleifenbildung statt. Bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid. DNA-Fragmente und RNA können so detektiert werden. Zur Dokumentation der angefertigten Gele wurde das BioPrint-Fotodokumentationsprogramm Version 96.07 (Vilber Lourmat, Frankreich) verwendet.

TAE-Puffer 10x (nach SAMBROOK et al. 1989)

24,2 g Tris (gelöst in destilliertem Wasser); 10 ml EDTA (0,5 mol/l pH 8); 5,71 ml Eisessig (mit destilliertem Wasser auf einen Liter auffüllen)

Polyacrylamidgele und Colloidal-Coomassie-Färbung (CC-Färbung)

Angaben zur Anfertigung und CC-Färbung von Polyacrylamidgelen finden sich im Material und Methoden Teil des vierten Kapitels.

Färbung glycosilierter Proteine im Polyacrylamidgel

Glycosilierte Proteine wurden unter Verwendung von Schiffschem Reagenz gefärbt. Hierzu wurden zunächst die folgenden Lösungen angesetzt: Lösung A. 1 % (v * v⁻¹) Periodsäure in 3 %iger Essigsäurelösung, Lösung B. 0,1 % (w * v⁻¹) Natriummetabisulfat in 10 mmol * l⁻¹ Salzsäurelösung, Lösung C. 50 % (v * v⁻¹) Ethanol in destilliertem Wasser, Lösung D. 0,5 % (w * v⁻¹) Natriummetabisulfat

in $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Salzsäurelösung und Lösung E. 7,5 %ige ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) Essigsäurelösung mit 5 % ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) Methanol. Schiffssches Reagenz wurde als fertige Lösung bei Sigma Aldrich® gekauft.

Für die Glycoproteinfärbung wurde das Gel zunächst für 30 Minuten in Lösung C. inkubiert. Anschließend wurde es für 2-mal 10 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Danach wurde das Gel für 30 Minuten Lösung A überführt. Nach 6 Waschschritten von jeweils 5 Minuten Länge wurde das Gel für 2-mal 10 Minuten in Lösung B belassen. Anschließend wurde es für 1 Stunde im Dunkeln in Schiffsschem Reagenz inkubiert. Danach wurde das Gel für 1 Stunde in Lösung B überführt. Dieser Inkubationsschritt erfolgte ebenfalls im Dunkeln. Abschließend wurde das Gel für 2 Stunden in Lösung D gewaschen und über Nacht in dieser belassen. Dann erfolgte die Dokumentation am Scanner (HP Scanjet G4010).

Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität

Die Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität erfolgte nach HÖSEL und NAHRSTEDT (1975) unter Verwendung von para-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (pNPG; Fluka®) als Substrat. Hierbei wurde die pNPG-Konzentration in den Inkubationsansätzen auf eine Konzentration von $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingestellt. Alle Inkubationen erfolgten bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Weitere Angaben zur Bestimmung der β -Glucosidaseaktivität finden sich im Material und Methoden Teil des ersten Kapitels.

Liste der verwendeten Antibiotika

1. Ampicilin, Konzentration im LB-Medium bzw. LB-Agar $50 - 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
2. Chloramphenicol, Konzentration im LB-Medium bzw. LB-Agar $34 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
3. Kanamycin, Konzentration im LB-Medium bzw. LB-Agar $15 - 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
4. Tetracyclin, Konzentration im LB-Medium bzw. LB-Agar $12,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

2.3 Ergebnisse

Expression von Latex- und VSP-Linamarase in Blättern von *H. brasiliensis*

Zunächst sollte geprüft werden ob die im Latex und im sekundären Phloem gefundenen β -Glucosidasen (BGLU) bzw. Linamarasen (LIN) auch in den Blättern von *H. brasiliensis* exprimiert werden. Hierzu wurde mRNA sowohl aus Blättern des B- als auch des C-Stadiums isoliert und mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente anschließend als Template für PCR, bei der Latex- und VSP-LINspezifische Primer verwendet wurden. Die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Ansätze zeigt, dass offenbar sowohl Latex- als auch VSP-LIN in den Blättern exprimiert werden. Zwischen den Blattstadien B und C war diesbezüglich kein Unterschied zu erkennen (siehe Abbildung 2.3.1 A).

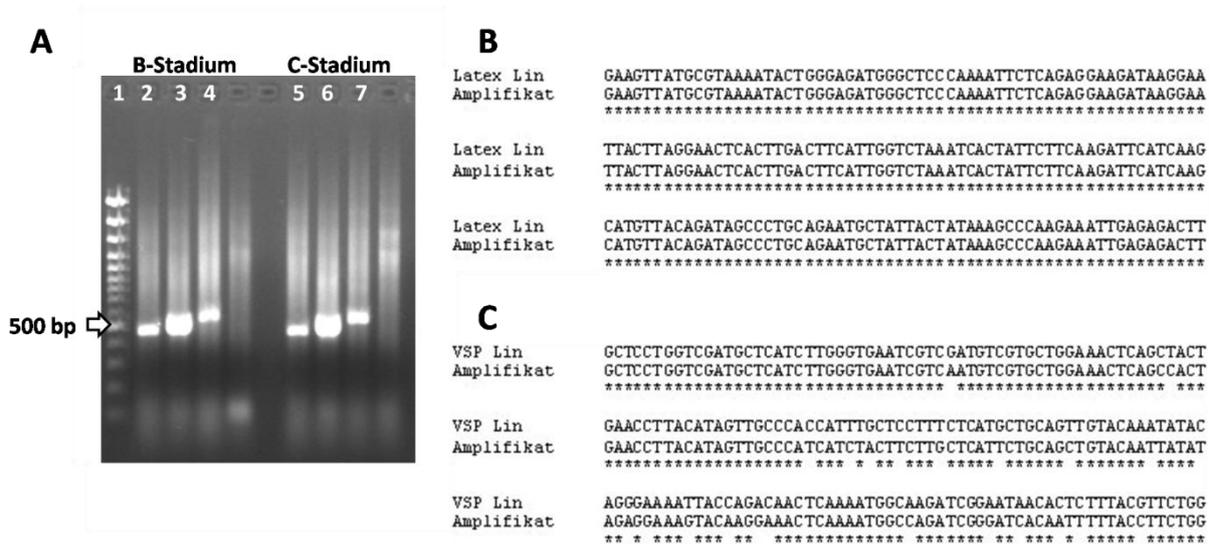


Abbildung 2.3.1: Expression von Latex- und VSP-Linamarase in Blättern von *H. brasiliensis*

Abschnitte von Latex- und VSP-Linamarase-cDNA wurden amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Teil **A**. zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse. 1: Marker (Fermentas®); 2 und 5: Latex-Linamarase; 3 und 6: VSP-Linamarase; 4 und 7: RT- und PCR-Kontrolle (Acetyl-CoA-Acetyltransferase); Zur Prüfung der Übereinstimmung mit der Zielsequenz wurden die Amplifikate sequenziert. Ausschnitte aus den jeweiligen Alignements (ClustalW) sind in Teil **B**. (Latex-Linamarase) und in Teil **C**. (VSP-Linamarase) wiedergegeben. Übereinstimmungen zwischen den jeweiligen Sequenzen sind durch Sterne markiert.

Um zu klären, ob es sich bei den Amplifikaten wirklich um Sequenzabschnitte der beiden Enzyme handelte, wurden die PCR-Ansätze sequenziert (DNA Cloning Service®). Wie der Abgleich (ClustalW) mit den Zielsequenzen zeigt, handelte es sich bei dem Amplifikat, welches sich bei Verwendung Latex-LINspezifischer Primer ergab, auch um ein Teilstück der entsprechenden cDNA (siehe Abbildung 2.3.1 B). Im Falle des vermeintlichen VSP-LIN-Amplifikates lag zwar der Sequenzabschnitt

einer BGLU vor, diese war aber nicht mit VSP-LIN identisch (siehe Abbildung 2.3.1 C). Möglicherweise handelt es sich um einen Sequenzabschnitt der Blatt-LIN.

Sequenzierung der Blatt- Linamarase

Von der Blatt-LIN aus *H. brasiliensis* ist bisher nur eine Teilsequenz des N-terminalen Bereiches bekannt (KADOW 2006). Um zu klären ob diese Teilsequenz zur selben cDNA gehört wie das beim VSP-LIN-Nachweis gefundene BGLU-Segment, erfolgte eine Komplettierung beider Sequenzen. Hierzu wurde zunächst RNA aus Blättern des C-Stadiums isoliert und zur Synthese doppelsträngiger (ds) cDNA genutzt. An deren Enden wurden Adapter mit bekannter Sequenz ligiert, um eine Amplifikation mittels PCR zu ermöglichen. Für die PCR wurde immer ein spezifischer Primer aus dem bekannten Sequenzabschnitt mit einem unspezifischen aus der Adapterregion kombiniert. Die Amplifikate wurden gelelektrophoretisch von Primerdimeren und z.T. auftretendem Hintergrund getrennt und anschließend sequenziert (DNA Cloning Service®). Die Sequenzdaten zeigen, dass es sich um zwei unterschiedliche cDNAs handelte, die ihrerseits weder mit Latex-LIN noch mit VSP-LIN oder P66 identisch sind (siehe Abbildung 2.3.2). Sie sollen im Folgenden als BGLU 1 (Blatt-LIN) und BGLU 2 geführt werden.

In Abbildung 2.3.2 ist ein Ausschnitt (circa von Base 1500 bis 1740) aus dem Sequenzvergleich der 5 *H. brasiliensis*-BGLU-Sequenzen wiedergegeben. Drei Bereiche, in denen sich die cDNAs unterscheiden, sind farblich hervorgehoben. So findet sich im Falle von BGLU 1 im ersten Abschnitt ein Einschub von 7 Basen (gelb markiert), der so bei BGLU 2, VSP-Linamarase, P66 und Latex-Linamarase nicht vorkommt. Auch im zweiten Abschnitt unterscheidet sich BGLU 1 von den übrigen BGLUs durch einen Einschub (grün markiert), der eine Länge von 8 Basen hat. Auch im Falle von BGLU 2 ist ein Einschub festzustellen. Er ist allerdings lediglich 3 Basen lang. Insbesondere die Latex-Linamarase unterscheidet sich im Bereich zwischen den beiden farblichen Markierungen sehr deutlich von den übrigen Sequenzen. Im vierten Abschnitt weisen VSP-Linamarase und P66 Einschübe auf (blau markiert). Verglichen mit der Sequenz von BGLU 1 hat dieser eine Länge von 9 Basen. In Bezug auf BGLU 2 beträgt er 10 Basen (blau und dunkelgrau markiert). Bei der Latex-Linamarase schließlich ergibt sich eine Lücke von 15 Basen (blau, dunkelgrau und grau markiert).

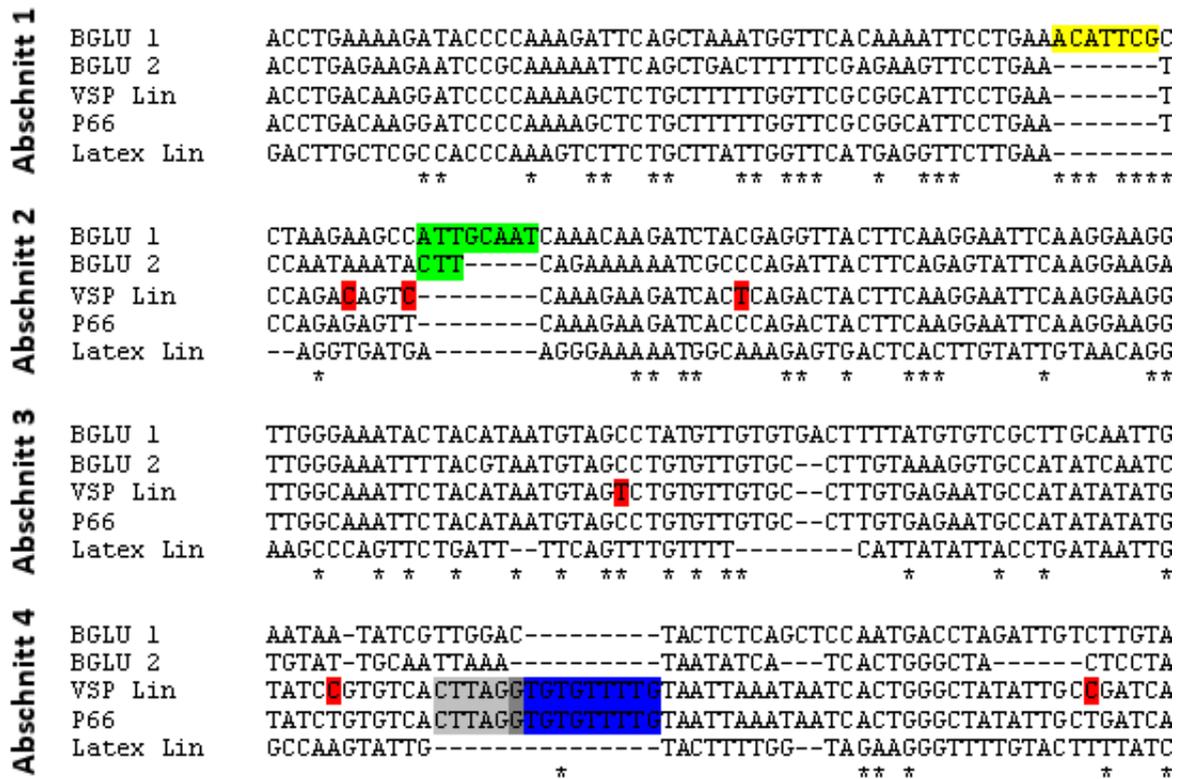


Abbildung 2.3.2: Vergleich von cDNA-Teilsequenzen der BGLUs aus *H. brasiliensis*

Für den Sequenz-Vergleich wurde ein Alignment mit Hilfe des Programmes ClustalW erstellt. Die Abbildung zeigt, der Übersichtlichkeit wegen, nur einen Ausschnitt (circa von Base 1500 bis 1740). Drei Bereiche in denen sich die Sequenzen besonders deutlich unterscheiden sind farblich (gelb, grün und blau) hervorgehoben. Rote Markierungen heben Abweichungen zwischen VSP-Linamarase und P66 hervor. Bereiche in denen alle 5 Sequenzen übereinstimmen sind durch Sterne markiert.

***H. brasiliensis* verfügt über mindestens 5 β -Glucosidasen**

Der Ausschnitt aus dem Alignment zeigt somit deutlich, dass es sich um mindestens 4 verschiedene Enzyme handelt. Allenfalls die VSP-LIN und P66 könnten identisch sein. Sie weichen im gezeigten Sequenzausschnitt nur um 6 Basen voneinander ab (siehe Abbildung 2.3.2; rot markiert). Außerdem weisen sie im direkten Vergleich der gesamten Sequenzen eine Übereinstimmung von 97 % auf (siehe Tabelle 2.3.1) und wurden beide aus dem gleichen Gewebe, dem sekundären Phloem des Sprosses (siehe Datenbank des NCBI: Accession-Nummer EF100816 und AF480476), isoliert. Bezüglich der übrigen BGLUs verdeutlicht der Vergleich der Komplettssequenzen noch einmal, dass es sich um verschiedene Proteine handelt. So weisen BGLU 1 und 2 eine Sequenzübereinstimmung von 81 % auf. Wird BGLU 1 mit VSP-LIN und P66 verglichen beträgt die Übereinstimmung in beiden Fällen 80 %. Nahezu selbiges gilt wenn BGLU 2 mit diesen abgeglichen wird. Am deutlichsten unterscheidet sich die Latex-LIN von den übrigen BGLUs. Die Übereinstimmung der cDNA-Sequenzen variiert zwischen 45 und 46 % (siehe Tabelle 2.3.1). In *H. brasiliensis* Blättern werden also mindestens 3 BGLUs exprimiert: BGLU 1, BGLU 2 und die Latex-LIN.

Tabelle 2.3.1: Übereinstimmung der cDNA-Sequenzen von 5 BGLUs aus *H. brasiliensis*

Für den Vergleich wurde, unter Verwendung des Programmes ClustalW, ein Alignment der Komplettssequenzen aller 5 cDNAs erstellt. Der Score gibt die Übereinstimmung der direkt miteinander verglichenen Sequenzen in Prozent wieder.

Sequenz	Anzahl der Basenpaare	Score	Vergleichssequenz
BGLU 1	1857	81	BGLU 2
		80	VSP-Linamarase
		80	P66
		45	Latex-Linamarase
BGLU 2	1880	81	BGLU 1
		80	VSP-Linamarase
		81	P66
		45	Latex-Linamarase
VSP-Linamarase	1856	80	BGLU 1
		80	BGLU 2
		97	P66
		46	Latex-Linamarase
P66	1831	80	BGLU 1
		81	BGLU 2
		97	VSP-Linamarase
		46	Latex-Linamarase
Latex-Linamarase	1806	45	BGLU 1
		45	BGLU 2
		46	VSP-Linamarase
		46	P66

Das es sich auch bei *VSP-Linamarase* und *P66* um unterschiedliche Gene handelt, legt eine genauere Betrachtung der 3'-Enden der beiden cDNAs nahe. Zum einen weist P66 Einschübe von jeweils einer Base gegenüber der VSP-LIN auf (siehe Abbildung 2.3.3; blau markiert). Hinzu kommen Abweichungen in der Basenabfolge (rot markiert). Vor allem aber fällt auf, dass die Sequenz der VSP-LIN um etliche Basen länger ausfällt (gelb markiert) als dies bei P66 der Fall ist. Es handelt sich also mit hoher Wahrscheinlichkeit um unterschiedliche Gene. Auf Proteinebene könnten VSP-Linamarase und P66 hingegen identisch sein.

```

VSP Lin      ATTAAATAATCACTGGGCTATATTGCCGATCATCAGCTCCAGTGACCTAGCTTGTGTTAT
P66          ATTAAATAATCACTGGGCTATATTGCGATCATCAGCTCCAGTGACCTACTTGTATTAT
*****

VSP Lin      AATAAATTTTCCTTGTGATGCTGCTGTGTCCCTTATACGGGAATTCCA-GCAAGCCTTTGC
P66          AATAAATTTTCCTTGTGATGCTGCTGTGTCCCTTATACGGGAATTCCA GCAAGCCTTTGC
*****

VSP Lin      -GTATTGCTATTGAACTATCTTTGAATAATAGATATTATTATCCCAAAAAAAAAAAA
P66          GTATTGCTATTGAAAAAAAAAAAAAAAA-----
***** *      ** ** *
    
```

Abbildung 2.3.3: Vergleich der 3'-Enden der cDNAs von VSP-Linamarase und P66

Für den Sequenzvergleich wurde ein Alignment mit Hilfe des Programmes ClustalW durchgeführt. Unterschiede in der Basenabfolge sind farblich hervorgehoben: rot = andere Base, blau = Base fehlt, gelb = 3'-Überhang. Sterne markieren die Abschnitte, in denen die Sequenzen übereinstimmen.

Eine Expression in den Blättern konnte weder für VSP-LIN noch für P66 nachgewiesen werden. Die hohe Sequenzähnlichkeit untereinander, aber insbesondere auch zu BGLU 1 und 2, macht eine Unterscheidung mittels PCR allerdings auch schwierig. In jedem Fall werden VSP-LIN und P66 aber im sekundären Phloem des Sprosses bzw. Stammes exprimiert (s.o.).

Das Genom von *H. brasiliensis* weist somit insgesamt mindestens 5 BGLUs auf, die wie konservierte Sequenzmotive zeigen (siehe Abbildung 2.3.4 II), zur GH-Familie1 gehören. Um die Nomenklatur zu vereinheitlichen sollen diese im Folgenden wie in Tabelle 2.3.2 zusammengefasst bezeichnet werden. Festgehalten ist auch in welchen Geweben bzw. Organen das jeweilige Enzym bisher nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 2.3.2).

Tabelle 2.3.2: Alte und neue Nomenklatur für die GH-Familie1-BGLUs aus *H. brasiliensis*

Die Einordnung in die GH-Familie1 erfolgte anhand der AS-Sequenzen. Als Ort der Expression sind die Gewebe angegeben, aus denen die cDNA isoliert wurde. BGLU 1 und 2 wurden im Rahmen der Arbeiten zum zweiten Kapitel sequenziert. Die Sequenzdaten von VSP- und Latex-Linamarase sowie P66 stammen aus der Datenbank des NCBI.

Zuordnung des Enzyms	Ort der Expression	Alte Bezeichnung	Neue Bezeichnung
GH-Familie1	Blatt	BGLU 1	BGLU 1
GH-Familie1	Blatt	BGLU 2	BGLU 2
GH-Familie1	Sekundäres Phloem	VSP-Linamarase	BGLU 3
GH-Familie1	Sekundäres Phloem	P66	BGLU 4
GH-Familie1	Latex (Stamm und Blatt)	Latex-Linamarase	BGLU 5

Familienzugehörigkeit der 5 β -Glucosidasen aus *H. brasiliensis*

Die Basenabfolgen der cDNAs von BGLU 1 und 2 wurden mit Hilfe des Programmes ORF-Finder in eine Aminosäure-(AS)-Sequenz übersetzt (siehe Abbildung 2.3.4 I). Die für GH-Familie1-Enzyme typischen Sequenzmotive des aktiven Zentrums, TF/LNEP und I/VT/SENG, finden sich in beiden Proteinen. Sie sind in der Abbildung farbig (gelb und rot) hervorgehoben. Auch BGLU 3, 4 und 5 weisen beide Motive auf. Während es sich aber im Falle von BGLU 1 bis 4 um die AS TFNEP und ITENG handelt, weist BGLU 5 die Sequenzmotive TLNEP und VTENG auf (siehe Abbildung 2.3.4 II). Weitere, bei Proteinen der GH-Familie1 konservierte, Sequenzmotive sind S/AAY/FQV/WEG, RFSIWSRIFP, APGRCS und GYFAWSLXDNFEW (siehe hierzu auch Seite 11). Diese finden sich ebenfalls, wenn zum Teil auch in leicht abgewandelter Form, in allen 5 Proteinen wieder. So weisen alle ein SAYQIEG Motiv (blau) auf in dem V/W durch I ersetzt ist. Die größten Abweichungen finden sich im Sequenzmotiv RFSIWSRIFP (rosa). Bei BGLU 1 ist F an zweiter Stelle durch M ersetzt. Außerdem ist an Position 5 ein S eingefügt. Schließlich sind IF an 8ter und 9ter Position gegen VI ausgewechselt. Bei BGLU 1 lautet das Sequenzmotiv daher RMSISWSRVIP (siehe Abbildung 2.3.4 I und II). BGLU 2 weist

ähnliche Abweichungen auf. Auch hier ist ein zusätzliches S an Position 5 eingefügt und IF gegen VI ausgetauscht. Zwar findet sich an Position 2 keine Veränderung der AS, dafür ist aber das S an Position 7 durch P ersetzt. Das Sequenzmotiv lautet RFSISWPRVIP (siehe Abbildung 2.3.4 I und II). Nahezu identisch verhält es sich bei BGLU 3 und 4. Mit dem einzigen Unterschied, dass das S an Position 7 nicht durch P ersetzt ist, womit das Sequenzmotiv im Falle von BGLU 3 und 4 die AS-Abfolge RFSISWSRVIP aufweist (siehe Abbildung 2.3.4 II). Bei BGLU 5 schließlich ist I an 4ter Position durch L ersetzt. Außerdem ist, wie bei allen anderen *H. brasiliensis* BGLUs der GH-Familie1 auch, an Position 5 ein S eingefügt. Das Sequenzmotiv lautet somit RFSLSWSRIFP (siehe Abbildung 2.3.4 II). Die AS-Abfolge APGRCS (dunkelgrün) findet sich bei BGLU 1 bis 4 in unveränderter Form wieder. Lediglich bei BGLU 5 ist sie durch APGKHE ersetzt. Auch was das Sequenzmotiv GYFAWSLXDNFEW (türkis) anbelangt finden sich wenige Veränderungen. Bei allen Enzymen bis auf BGLU 5 ist an Position 7 L durch Y ersetzt (siehe Abbildung 2.3.4 I und II). Das Vorhandensein sämtlicher Sequenzmotive ermöglicht die Einordnung in GH-Familie1 und legt nahe, dass alle 5 BGLUs auch katalytisch aktiv sind.

BGLU 1

```
MVMATKHSQLLAMLIFLISLLLALTKPTMADDIPEDFSSSYFPDDFIFGTATSAYQIEGEATTKGRGPSVW
DFTSKETPERILDGSDGNDVAVDFYNRFKEDIANVKNMGFKGFRFSISWSRVIPSGRRREGVKNKEGIEFYNNV
INGIISNGLEPFVTFIFHWDTPQALEDKYGGFLSRDIVDYDEYANLLFEFGDRVKYWMTFNEPWSLSGFSY
DDGVFAPGRCSSWVNRQCRAGNSATEPYIVAHLLLSHAAVVKL YREKFKPIHGGQIGITLFTFWYEPLSNE
PADVEAAKIALDFMFGLWMDPMTYGTYPRTVRDLVGDRLPKFTDAESKFLRGSYDFLGLQYYTSYYAKPNAI
VDPNRIRYKTDNHITETPYDYDGNLIGPQAYSSWFYIFPKGIRHLLNYTKDTYNNPVIYITENGVDNNMNET
QPIEEALQDEFRINYRKHLMNALGSLKNYSVNVKGYFAWSYLDNFEWINIGYTSRFGLYYVDYKDNLKRYPK
DSAKWFTKFLKHSPPKPLQSNKIYEVTSRNSRKVGKYYIM
```

BGLU 2

```
MASKHSRQLEMLIFLISFLALAKPALMADCVENFNRTYFPDDFIFGTATSAYQIEGAANISGKGPSVWDT
FTHEYPERIKDHSTGDVAVDFYHRYKEDIQNVKSMGFNAFRFSISWPRVIPSGRRREGVKNKEGIEFYNNVIN
ETIRQGLQPFVTFIFHWDTPQALEDKYRGFLSRNIVEDYRDYADLLFEKFGDRVKFWMTFNEPWSLSGFSYDD
GVFAPGRCSSWVNRQCRAGNSATEPYIVAHLLLSHAAVVQLYRGKYKETQNGQIGITIFTFWFEPLSNRAE
DIEASKTALDFMFGLWMDPLTYGRYPRIARDLAGDRLNFTEETHLLRGSYDFLGLQYYTSYYAKPNAPVD
PDHIRYKTDSHIETPYDYDGNLIGPQAYSSWFYIFPKGIRHLLNYTKDTYNDPVIYITENGVDNLNTEIDK
AGEENITAALKDEFRINYRKRMMNALGSLKDYHVNLKGYFAWSYLDNFEWENINIGYTSRFGLYYVDYHNNLRR
IRKNSADFFEFLNPLNTSEKIAQITSEYSRKIGKFYVM
```

Abbildung 2.3.4 I: AS-Sequenz und konservierte Sequenzmotive von *H. brasiliensis*- BGLU 1 und 2

BGLU 1 und 2 wurden im Rahmen der Arbeiten zum zweiten Kapitel sequenziert. Die entsprechende cDNA wurde aus Blattgewebe des C-Stadiums isoliert. Die 6 konservierten Sequenzmotive (Xu et al. 2004) von GH-Familie1-Enzymen - S/AAY/FQV/WEG (blau), RFSIWSRIFP (rosa), TF/LNEP (gelb), APGRCS (dunkelgrün), I/VT/SENG (rot) und GYFAWSLXDNFEW (türkis) - sind farblich unterlegt. Darüber hinaus sind die Signalpeptide grau unterlegt und die N-Termini hellgrün markiert. Die Signalpeptide bzw. die N-Termini wurden mit Hilfe des Programmes SignalP ermittelt.

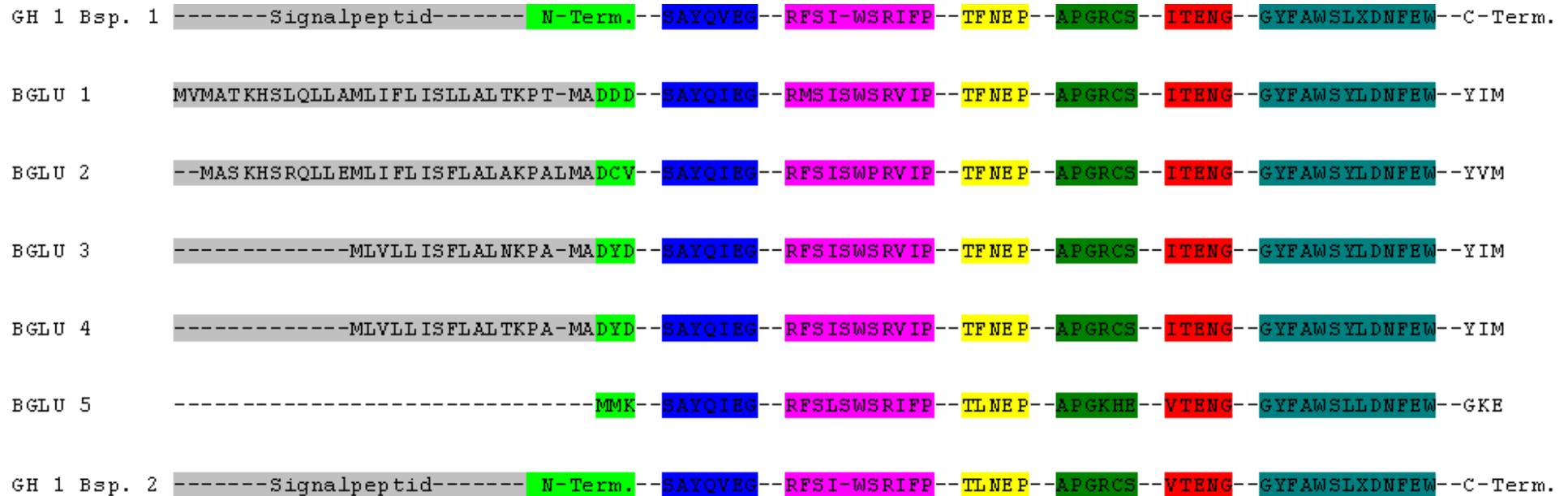


Abbildung 2.3.4 II: Konservierte Sequenzmotive der GH Familie 1 bei *H. brasiliensis* BGLU 1 - 5

BGLU 1 und 2 wurden im Rahmen der Arbeiten zum zweiten Kapitel sequenziert. Die Sequenzdaten von BGLU 3, 4 und 5 stammen aus der Datenbank des NCBI. Die 6 konservierten Sequenzmotive von GH-Familie1 Enzymen - S/AAY/FQV/WEG (blau), RFSIWSRIFP (rosa), TF/LNEP (gelb), APGRCS (dunkelgrün), I/VT/SENG (rot) und GYFAWSLXDNFEW (türkis) - sind in zwei hypothetischen Protein zusammengefasst und den entsprechenden Sequenzabschnitten der BGLUs 1 - 5 aus *H. brasiliensis* gegenübergestellt. Außerdem sind die Signalpeptide angegeben und grau unterlegt. Die N-Termini sind hellgrün markiert. Die Signalpeptide bzw. die N-Termini wurden mit Hilfe des Programmes Signalp ermittelt. Auch die letzten 3 AS am C-Terminus sind aufgeführt.

Funktion der 5 BGLUs aus *H. brasiliensis*

Unter Verwendung der AS-Sequenzen kann die Einordnung von BGLU 1 - 5 in den im Rahmen der Einleitung vorgestellten GH-Familie1-Stammbaum von *A. thaliana* erfolgen (siehe Abbildung 2.3.5). Sowohl BGLU 1 (siehe roter Pfeil) als auch BGLU 2 befinden sich in einem Cluster mit BGLU 3 und 4 (rot hervorgehoben) sowie den LIN aus *M. esculenta*. In den Enzymcluster wird auch BGLU 17 aus *A. thaliana* eingeordnet. BGLU 17 gehört entfernt zur Unterfamilie 2 (Xu et al. 2004), wird dieser aber in Anwesenheit der BGLUs aus *H. brasiliensis* und Maniok nicht mehr zugeordnet. Die Enzyme der Unterfamilie 2 und damit auch BGLU 17 werden als an Abwehrreaktionen beteiligte Hydrolasen betrachtet (XU et al. 2004). Für BGLU 1 aus *H. brasiliensis* ist eine solche Funktion direkt nachgewiesen (SELMAR et al. 1987). Es kann daher angenommen werden, dass auch die übrigen Enzyme des Clusters an Abwehrreaktionen beteiligt sind. Aus diesem Grund werden sie in der Abbildung als Unterfamilie 2.2 geführt (siehe Abbildung 2.3.5). BGLU 1 ist von BGLU 3 und 4 durch 3 Verzweigungen getrennt. Selbiges gilt bezüglich der Enzyme aus Maniok. BGLU 2 steht BGLU 3 und 4 offensichtlich evolutionär geringfügig näher. Es finden sich lediglich 2 Verzweigungen zwischen den Enzymen. Zu den LIN aus Maniok ist der Abstand größer. Er beträgt 4 Verzweigungen. Zwischen BGLU 3 bzw. 4 und den Maniok-LIN befinden sich sogar 5 Verzweigungen. Die einzige *H. brasiliensis*-BGLU, für die auch anhand von Substratinkubationen nachgewiesen wurde, dass es sich um eine LIN handelt (SELMAR et al. 1987), steht den LIN aus Maniok somit evolutionär am nächsten, während der Abstand zwischen HbBGLU 2 - 4 und den Maniok-LIN größer ist. Dies wirft die Frage auf ob nicht möglicher Weise im Laufe der Proteinveränderung auch eine Veränderung des Substratspektrums eingetreten ist. So wäre denkbar, dass BGLU 2 für die Hydrolyse von Lotaustralin zuständig ist, welches circa 5 - 10 % der cyanogenen Glucoside von *H. brasiliensis* ausmacht. Die Einordnung in eine Unterfamilie spricht aber letztendlich dafür, dass ähnliche, wenn nicht gleiche Substrate umgesetzt werden. Bezüglich der Enzyme aus *H. brasiliensis* könnte es sich also, analog zur Unterfamilie der Myrosinasen, um einen Cluster von an der Cyanogenese beteiligten BGLUs - eine LIN-Unterfamilie - handeln.

LIN aus *T. repens* (siehe grüner Pfeil) findet sich überraschender Weise, obwohl das Enzym ebenfalls nachweislich für die Hydrolyse von Linamarin zuständig ist, nicht in einem Cluster mit den anderen LIN. Das Enzym wird vielmehr zusammen mit Prunasinhydrolase aus *P. serotina* und Dhurrinase aus *S. bicolor* den übrigen Enzymen der Unterfamilie 2 zugeordnet. Der Abstand zu den LIN aus *M. esculenta* und *H. brasiliensis* beträgt 9 Verzweigungen. Den Proteinen BGLU 12 - 16 werden allerdings, wie auch der BGLU 17, Funktionen in der Abwehr zugesprochen. Darüber hinaus ist von den Cellulasen her bekannt, dass selbst Enzyme aus unterschiedlichen GH-Familien durchaus dieselbe Substratspezifität aufweisen können (DAVIES und HENRISSAT 2002).

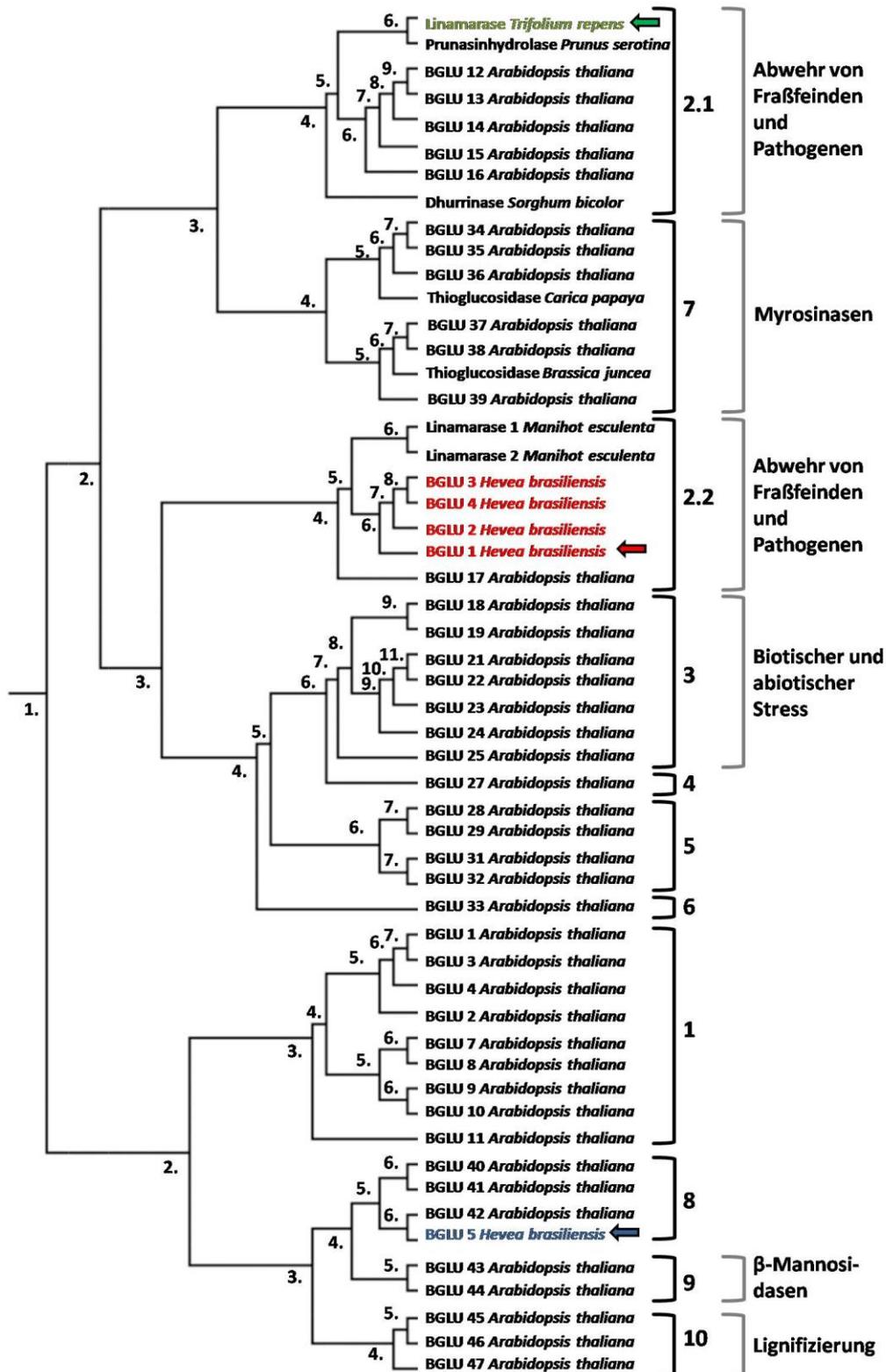


Abbildung 2.3.5: Einordnung der *H. brasiliensis*-BGLUs in den *A. thaliana*-GH-Familie1-Stammbaum

Die Erstellung des Stammbaumes erfolgte anhand der AS-Sequenzen. BGLU 1 und 2 aus *H. brasiliensis* wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenziert. Alle übrigen AS-Sequenzen stammen aus der Datenbank des NCBI. Für das Alignment der Sequenzen und die Stammbaumerstellung wurde das Programm ClustalW genutzt. Die Nummern hinter den schwarzen Klammern beziehen sich auf die jeweilige Unterfamilienzugehörigkeit. Hinter den grauen Klammern sind, soweit verfügbar, Informationen zur wahrscheinlichen Funktion der Glycosidhydrolasen angegeben (nach Xu et al. 2004).

Der Abstand zwischen BGLU 1 und BGLU 5 (siehe violetter Pfeil) aus *H. brasiliensis* beträgt 11 Verzweigungen. BGLU 5 wird in eine Cluster mit BGLU 40, 41 und 42 und damit in die Unterfamilie 8 eingeordnet. Für Unterfamilie 8 selbst ist keine Funktion vorhergesagt. Die den Enzymen evolutionär am nächsten stehenden BGLUs sind jene der Unterfamilien 9 (4 Verzweigungen) und 10 (5 - 6 Verzweigungen). Von den Hydrolasen der Unterfamilie 9 wird angenommen, dass sie β -Mannoside spalten. BGLU 45, 46 und 47, die die Unterfamilie 10 ausmachen, sind wahrscheinlich an der Lignifizierung beteiligt. Möglicher Weise ist auch die Funktion der BGLU 5 aus *H. brasiliensis* in diesen Bereichen zu suchen. Aufgrund der Lokalisation in den Luteoiden der Latexgefäße (SUNDERASAN 2002) und der größeren evolutionären Nähe zur Unterfamilie 9 (siehe Abbildung 2.3.5), erscheint eine Spezifität des Enzyms für β -Mannoside wahrscheinlicher.

Lokalisation der 5 BGLUs aus *H. brasiliensis*

Die GH1-BGLY aus *A. thaliana* weisen, mit Ausnahme von 3 Enzymen, Signalpeptide mit einer Länge von 19 bis 38 AS auf. Die Signalpeptidlänge bewegt sich mehrheitlich zwischen 20 - 24 AS (Xu et al. 2004). Auch BGLU 1 - 4 aus *H. brasiliensis* verfügen über Signalpeptide, wie die Analyse der AS-Sequenzen mit Hilfe des Programmes SignalP zeigte (siehe Abbildung 2.3.4 II). Bei BGLU 1 und 2 haben diese eine Länge von 30 bzw. 29 AS. Was BGLU 3 und 4 anbelangt beträgt die Länge der Signalpeptide 17 AS. Möglicher Weise wurden bei der Sequenzierung nicht alle Basen der mRNAs erfasst. BGLU 5 hingegen weist offensichtlich kein Signalpeptid auf (siehe Abbildung 2.3.4 II).

Die Lokalisation der HbBGLU 1 - 5 wurde unter Verwendung des Programmes Multiloc vorhergesagt. Demzufolge scheint BGLU 2 in den Golgi-Apparat transportiert und somit sekretiert zu werden (siehe Tabelle 2.3.3). Der Score, der die Wahrscheinlichkeit für die entsprechende Lokalisierung angibt, beträgt 0,80. BGLU 1 hingegen könnte sowohl sekretiert werden als auch in der Vakuole vorkommen. Der Score für einen Transport in den Apoplasten beträgt 0,55, der für eine Speicherung in der Vakuole 0,41. Da BGLU 1 bisher aber nur apoplastisch nachgewiesen wurde (SELMAR 1986), ist dieses Kompartiment zu favorisieren. BGLU 3 und 4 sind möglicher Weise in der Vakuole lokalisiert. Jedenfalls ist diese, das an erster Stelle geführte Kompartiment. Allerdings fällt der Score mit 0,32 (BGLU 3) und 0,36 (BGLU 4) relativ niedrig aus, was dafür sprechen könnte, dass Teile des Signalpeptids fehlen. In diesem Fall wäre eine präzise Vorhersage nicht möglich. Auf der anderen Seite wird BGLU 3 in den Vakuolen spezialisierter Speicherzellen des Phloems vermutet (TIAN et al. 2006 in NCBI). Das außerdem die Signalpeptide von BGLU 3 und 4 exakt dieselbe Länge aufweisen spricht dafür, dass keine Verkürzung durch die Abspaltung von Basen am 5'-Ende der cDNA vorliegt. BGLU 5 könnte in die Peroxisomen transportiert werden (siehe Tabelle 2.3.3). Dies gleicht der tatsächlichen Lokalisation des Enzyms, das in den Latexgefäßen innerhalb von vakuolenähnlichen Kompartimenten - den Luteoiden - vorkommt (SUNDERASAN 2002). Auch BGLU 42 aus *A. thaliana*, die

sich in einem Cluster mit BGLU 5 befindet (siehe Abbildung 2.3.5), fehlt das Signalpeptid. Auch hier wird eine Lokalisation in Microbodies vorhergesagt (Xu et al. 2004).

Tabelle 2.3.3: Hypothetische Lokalisation von BGLU 1 - 5 aus *H. brasiliensis*

Für die Vorhersage der Lokalisation wurde das Programm MultiLoc verwendet. Sie erfolgte anhand der AS-Sequenzen.

Enzym	Lokalisierung 1	Score	Lokalisierung 2	Score
BGLU 1	Golgi-Apparat / Apoplast	0,55	Vakuole	0,41
BGLU 2	Golgi-Apparat / Apoplast	0,80	Vakuole	0,16
BGLU 3	Vakuole	0,32	Peroxisom	0,23
BGLU 4	Vakuole	0,36	Golgi-Apparat / Apoplast	0,27
BGLU 5	Peroxisom	0,63	Cytoplasma	0,11

Posttranslationale Modifikation der 5 BGLUs aus *H. brasiliensis*

Viele pflanzliche BGLUs weisen N-Glycosilierungen auf (MØLLER und POULTON 1993; XU et al. 2004). Bei den *A. thaliana* GH1-BGLY weisen alle bis auf zwei Enzyme 1 - 5 potentielle Glycosilierungsstellen auf. Dies dürfte in Zusammenhang mit der hohen Anzahl an BGLUs stehen, die in den Apoplasten exportiert werden (Xu et al. 2004). Aus diesen Gründen wurde überprüft, ob auch die *H. brasiliensis* BGLUs über potentielle Glycosilierungsstellen verfügen. Hierzu wurde das Program Motif Scan verwendet. BGLU 1 weist 3 hypothetische Glycosilierungsstellen auf (siehe Tabelle 2.3.4). Bei BGLU 2 ist die Zahl potentieller Glycosilierungsstellen mit 7 deutlich höher. BGLU 3 und 4 verfügen beide über 6 Glycosilierungsstellen. BGLU 5 hat keine potentiellen Glycosilierungsstellen, was zur Lokalisierung in den Peroxisomen bzw. Luteoiden passt (siehe Tabelle 2.3.3).

Tabelle 2.3.4: Potentielle Glycosilierungsstellen der BGLUs 1 - 5 aus *H. brasiliensis*

Die Vorhersage der potentiellen Glycosilierungsstellen erfolgte mit Hilfe des Programmes Motif Scan. Sie beruht auf der AS-Sequenz.

Enzym								
BGLU 1	1	2	3					Glycosilierung
	AS 407-410	AS 430-433	AS 461-464					Position
BGLU 2	1	2	3	4	5	6	7	Glycosilierung
	AS 37-40	AS 61-64	AS 144-147	AS 327-330	AS 405-408	AS 437-440	AS 521-524	Position
BGLU 3	1	2	3	4	5	6		Glycosilierung
	AS 27-30	AS 134-137	AS 275-278	AS 395-398	AS 418-421	AS 486-489		Position
BGLU 4	1	2	3	4	5	6		Glycosilierung
	AS 27-30	AS 134-137	AS 275-278	AS 395-398	AS 418-421	AS 486-489		Position
BGLU 5	keine							Glycosilierung
								Position

Da für BGLU 2 eine apoplastische Lokalisierung angenommen werden kann (siehe Tabelle 2.3.3) war eine entsprechend starke Glycosilierung zu erwarten, die mit 7 potentiellen Glycosilierungsstellen auch gegeben ist. Das BGLU 1 nicht einmal halb so viele aufweist könnte mit dem offenbar möglichen vakuolären Vorkommen in Zusammenhang stehen. Das auch BGLU 3 und BGLU 4 stärker glycosiliert sind als BGLU 1 lässt vermuten, dass auch diese Enzyme, zumindest teilweise, sekretiert werden könnten.

Um die Glycosilierungsvorhersagen in Teilen zu Prüfen, wurde immunoaffinitätschromatographisch isolierte BGLU 1, unter Verwendung von Schiffischem Reagenz, auf das Vorhandensein von Zuckerresten untersucht. Die rosa Färbung der Proteinbanden im Polyacrylamidgel zeigt eindeutig, dass BGLU 1 glycosiliert ist (siehe Abbildung 2.3.6; Bahn 3 und 4) und bestätigt die Ergebnisse von Voß (2001). Im Gegensatz zu den Befunden von SELMAR et al. (1987), bei denen nach immunoaffinitätschromatographischer Reinigung des Proteins nur eine Bande im Gel gefunden wurde, handelt es sich hier aber um eine Doppelbande (siehe Abbildung 2.3.6). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Voß (2001) und KADOW (2006) gemacht. Die Coomassiefärbung des Gels unterstreicht noch einmal den Doppelbandencharakter (siehe Abbildung 2.3.6; Bahn 2).

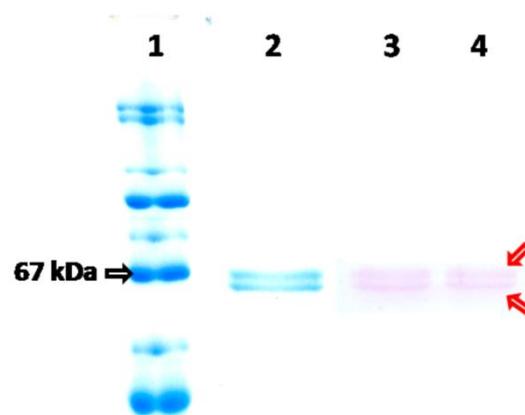


Abbildung 2.3.6: Detektion der Glycosilierung von BGLU 1 aus *H. brasiliensis*

BGLU 1 wurde immunoaffinitätschromatographisch aus dem Überstand von *H. brasiliensis*-Blattproteinrohextrakt isoliert. Aliquots wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde mittels Coomassie und Schiffischem Reagenz gefärbt. 1: Marker, Amersham Biosciences®; 2: BGLU 1 (Coomassiefärbung); 3 und 4: BGLU 1 (Färbung von Zuckern mittels Schiffischem Reagenz) In Bahn 4 sind die BGLU-Banden mit roten Pfeilen markiert.

BGLU 1 könnte in zwei Glycosilierungsvarianten vorkommen

Der Befund, dass immunoaffinitätschromatographisch gereinigte BGLU 1 im Gel eine Doppelbande bilden kann wirft die Frage auf, ob es sich um unterschiedliche Enzyme handelt. Von BGLU aus *Triticum aestivum* ist z.B. bekannt, dass sie als Hexamere vorliegt. Das Hexamer wiederum setzt sich z.T. aus Heterodimeren zusammen, wobei die AS-Sequenzen der 2 beteiligten Proteine nur geringfügige Abweichungen aufweisen (SUE et al. 2006). *H. brasiliensis* exprimiert in den Blättern, mit

BGLU 1 und BGLU 2 mindestens 2 GHs bzw. LIN, die sich in der AS-Abfolge nur geringfügig unterscheiden und daher beide durch den AK erkannt werden könnten. Die Doppelbande könnte somit auf BGLU 1 und BGLU 2 zurückzuführen sein. Um dies zu klären wurden beide Banden zunächst massenspektroskopisch analysiert. Das beobachtete Peptidmuster war in beiden Fällen identisch. Alle Sequenzabschnitte die identifiziert werden konnten, sind BGLU 1 zuzuordnen. Lediglich Fragment Nummer 7 findet sich in dieser Form auch in BGLU 2 (siehe Abbildung 2.3.7 A und B).

A

Obere Bande (circa 66 kDa)			
Fragment	AS-Sequenz	Protein	AS N-Terminus
1	RILDGSNGDVAVDFYNR	BGLU 1	DDDIPEDFS
2	DIVDYEYANLLFEEFGDR	BGLU 1	
3	LDFMFGLWMDPMTYGTYPRT	BGLU 1	
4	TFWYEPLSNE	BGLU 1	
5	FGLYYVDYK	BGLU 1	
6	GSYDFLGLQYYSYAK	BGLU 1 und 2	

Untere Bande (circa 64 kDa)			
Fragment	AS-Sequenz	Protein	AS N-Terminus
1	RILDGSNGDVAVDFYNR	BGLU 1	DDDIPEDFS
2	DIVDYEYANLLFEEFGDR	BGLU 1	
3	LDFMFGLWMDPMTYGTYPRT	BGLU 1	
4	TFWYEPLSNE	BGLU 1	
5	FGLYYVDYK	BGLU 1	
6	GSYDFLGLQYYSYAK	BGLU 1 und 2	

BGLU 1
MVMATKHSIQLLAMLIFLISLLALTKPTMA**DDDIPEDFS**SSYFPDDFIFGTATSAYQIEGEATTKGRGPSVWDTFSKETPERI**LDGSNGDVAVDFYNR**FKEDIANVKNMGFKGFRMSISWSRVI PSGRRREGVKNKEGIEFYNNVINGIISNGLEPFVTFIHWDTPQALEDKYGGFLSR**DIVDYEYANLLFEEFGDR**VKYWMTFNEPWSLSGFSYDDGVFAPGRCS SWVNRQCRA GNSATEPYI VAHLLLSHA AAVVKLYREKFKPIHGGQIGITLFT**TFWYEPLSNE**PADVEAAKIAL**DFMFGLWMDPMTYGTYPRT**TVRDLVGDRLPKFTDAESKFLR**GSYDFLGLQYYSYAK**PNAI
B VDPNRI RYKTDNHITETPYDYDGNLIGPQAYSSWFYIFPKGIRHLLNYTKD TYNNPVIYITENGVDN NNNETQP IEEALQDEF RIN YRKH LWNALGSLKNYSVNVKGYFAWSYLDNFEWNI GYTSR**FGLYYVDYK**DNLKRYPKDSAKWTFKFLKHPKPLQSNKIYEVTSRNSRKVGKYYIM

BGLU 2
MASKHSRQLEMLIFLISFLALAKPALMA**DCVPENFNR**TYFPDDFIFGTATSAYQIEGAANISGKGPSVWDTFTHEYPERIKDHSTGDVAVD FYHR YKEDI QNVKSMGFNAFRFSISWPRVIPSGRRRREGVKNKEGIFKYNRVIN ETIRQGLQPFVTFIHWDTPQALEDKYRGFLSRNIVEDYRDYADLLFEKFGDRVKFWMTFNEPWSLSGFSYDDGVFAPGRCS SWVNRQCRA GNSATEPYI VAHLLLSHA AAVQLYRGKYKETQNGQIGITIFTFWFEPLSNRAE DI EASKTALDFMFGLWMDPLTYGRYPRIARDLAGDRLLNFTEEETHL LR**GSYDFLGLQYYSYAK**PNAPVDPDHIRYKTDSHIETPYDYDGNLIGPQAYSSWFYIFPKGIRHLLNYTKD TYNDPVIYITENGVDN LNTEIDKAGEENI TAALKDEF RIN YRKR MWNALGSLKDYHVN LKGYFAWSYLDNFEWNI GYTSR**FGLYYVDYK**DYHNNLRRIRKNSADFFEKFLNPLNTSEKIAQITSEYSRKIGKFYVM

Abbildung 2.3.7: Massenspektroskopische Analyse und N-Terminale Sequenzierung der BGLU-Doppelbande

Immunoaffinitätschromatographisch gereinigte BGLU aus *H. brasiliensis*-Blättern beinhaltet zwei Proteine unterschiedlicher molekularer Größe. Die Analyseergebnisse zeigen, dass diese bezüglich der AS-Sequenz identisch sind.

A. AS-Sequenzen der massenspektrometrisch identifizierten Fragmente sowie der sequenzierten N-Termini. **B.** Anordnung der Fragmente (hellgrau unterlegt) im Protein; Der sequenzierte Teil des N-Terminus ist, wie die Vergleichssequenz bei BGLU 2, dunkelgrau unterlegt.

Die Daten decken sich mit den Befunden von KADOW (2006). Um sicher gehen zu können, dass es sich in der Tat um dasselbe Protein handelt, wurde außerdem eine Sequenzierung der N-Termini vorgenommen. BGLU 1 unterscheidet sich, was den N-terminalen Bereich anbelangt, deutlich von BGLU 2 - 5 (siehe Abbildung 2.3.4 I). Die eindeutige Identifizierung ist daher unproblematisch. Die Ergebnisse zeigten, dass die N-Termini der Proteine der beiden Banden identisch sind. Sie sind BGLU 1 zuzuordnen (siehe Abbildung 2.3.7 A und B).

Da die Proteine der Doppelbande auf AS-Ebene offensichtlich identisch sind, muss das abweichende Laufverhalten im Polyacrylamidgel auf Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation zurückzuführen sein. Das Protein beider Einzelbanden weist Glycosilierung auf (siehe Abbildung 2.3.6). Unterschiede im Glycosilierungsmuster oder in der Länge der Oligosaccharide könnten die Ursache der Doppelbande sein. In diesem Fall sollte eine Deglycosilierung des Proteins dazu führen, dass nur noch eine Bande im Gel detektiert werden kann. Um dies zu prüfen wurde zunächst immunoaffinitätschromatographisch gereinigte BGLU chemisch deglycosiliert (Sigma® Chemical Deglycosilation Kit). Im Gel war anschließend tatsächlich nur eine Bande zu erkennen, deren Protein geringfügig kleiner war als das der Doppelbande (siehe Abbildung 2.3.8 A). Da die Deglycosilierung aber offenbar auch zur Zerstörung von größeren Teilen des Proteins führte, ist das Ergebnis nicht eindeutig.

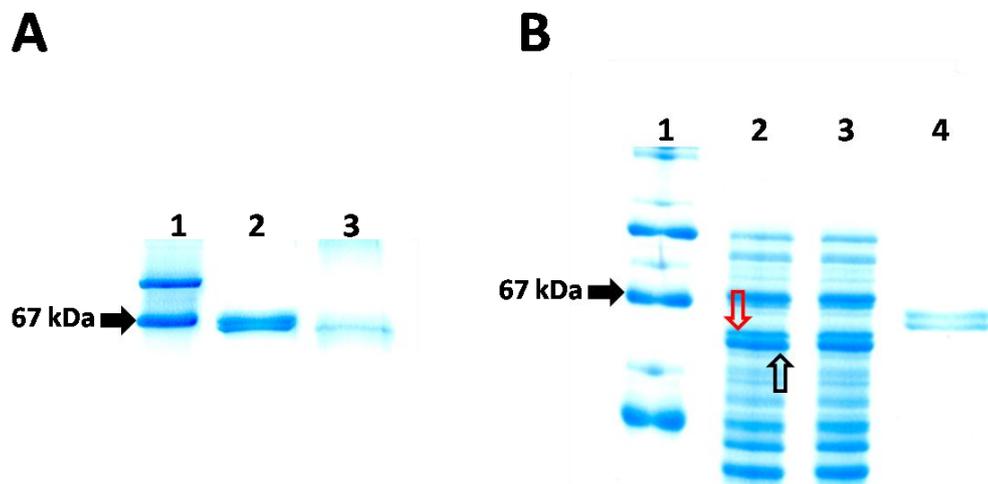


Abbildung 2.3.8: Gelelektrophoretische Analyse von chemisch deglycosilierter und von heterolog exprimierter BGLU 1

BGLU 1 wurde sowohl aus Blattgewebe isoliert und chemisch deglycosiliert als auch in *E. coli* exprimiert. Die Proteine wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Mit Verlust der Glycosilierung scheint auch der Doppelbandencharakter des Enzyms verloren zu gehen.

A. Gel mit chemisch deglycosilierte BGLU; 1: Marker (Amersham Biosciences®); 2: BGLU 1; 3: BGLU 1 chemisch deglycosiliert; **B.** heterolog exprimierte BGLU 1; 1: Marker (Amersham Biosciences®); 2 und 3: *E. coli*-Protein-Gesamtextrakt; 4: Kontrolle, isolierte BGLU 1; roter Pfeil BGLU 1; schwarzer Pfeil *E. coli*-Protein

Procaryoten wie *Escherichia coli* glycosilieren ihre Proteine nicht. In *E. coli* exprimierte BGLU 1 sollte daher im Gel als Einzelbande auftreten. Da das Protein in Inclusion-Bodies vorlag und nur durch Aufkochen in SDS-Puffer in Lösung gebracht werden konnte, war eine Abtrennung der *E. coli*-Proteine nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das Gesamtprotein aus den Zellen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Kontrolle wurde immunoaffinitätschromatographisch gereinigte BGLU appliziert. Wie zu erwarten verringert sich die Größe des Proteins bei fehlender Glycosilierung (siehe Abbildung 2.3.8 B; roter Pfeil). Direkt unterhalb der BGLU-1-Bande finden sich allerdings größere Mengen eines *E. coli*-Proteins (schwarzer Pfeil), so dass nicht zu erkennen ist, ob BGLU 1 als Doppelbande vorliegt. Daher wurden beide Banden massenspektrometrisch analysiert. Bei dem größeren der beiden Proteine handelte es sich ausschließlich um BGLU 1. Die zweite Bande enthielt vornehmlich ein Protein aus *E. coli* (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte auch BGLU 1 nachgewiesen werden. Die Seltenheit der entsprechenden Peaks lässt zwar darauf schließen, dass es sich lediglich um Spuren handeln kann, die beim Schneiden des Gels verschleppt wurden, da aber die Massenspektrometrie keine verlässliche Quantifizierung zulässt, ist das Ergebnis nicht eindeutig. Zusammengefasst deuten die Befunde aber darauf hin, dass der Grund für die Doppelbande in den Unterschieden im Glycosilierungsmuster zu suchen ist.

Stadienspezifische Expression von BGLU 1, 2 und 5 im Blattgewebe

Die 5 GH-Familie1-BGLUs, die bisher bei *H. brasiliensis* gefunden wurden, scheinen organ- und gewebespezifisch exprimiert zu werden. So konnten BGLU 3 und BGLU 4 bisher nur im sekundären Phloem des Sprosses nachgewiesen werden (SOOKMARK et al. 2002 in NCBI; TIAN et al. 2006 in NCBI). Das Vorkommen von BGLU 1 und BGLU 2 könnte hingegen auf die Blätter beschränkt sein. BGLU 5 findet sich zwar sowohl im Spross als auch in den Blättern, wird aber wohl nur in den Latexgefäßen exprimiert (SUNDERASAN 2002). Nicht bekannt ist hingegen, ob auch eine entwicklungspezifische Expression auftritt und ob funktionsbedingte Unterschiede im Expressionslevel vorkommen. Informationen hierzu könnten hilfreich bezüglich der Vorhersage spezifischer Funktionen der einzelnen BGLUs sein. Aus diesen Gründen wurde die Expression von BGLU 1, BGLU 2 und BGLU 5 sowie von HNL in den Blattstadien B, C und D mittels Real-Time-PCR (RT-PCR) untersucht. Um die Werte, die für die einzelnen Enzyme und Blattstadien gemessen wurden, miteinander vergleichen zu können, wurde das relative Expressionslevel (RE) berechnet. Von BGLU 1 ist die weitaus größte Menge an Transkripten vorhanden. Das RE beträgt im Blattstadium B 3018 ± 295 (siehe Abbildung 2.3.9). Bei BGLU 5 liegt das RE im B-Stadium lediglich bei 143 ± 1 . Im Falle von BGLU 2 ist die Transkriptmenge sogar noch viel niedriger. Das RE beträgt hier $1,9 \pm 0,3$. Die hohe Expression von BGLU 1 deckt sich mit der Linamarasefunktion des Enzyms. Die bei Gewebeverletzung einsetzende Blausäure-Freisetzung (HCN-Freisetzung) kann nur dann eine Repellent-Wirkung gegenüber

Fraßfeinden haben, wenn die Freisetzung schnell erfolgt (BALLHORN et al. 2005). Um dies zu garantieren, ist die Bereitstellung größerer Mengen an LIN bzw. BGLU 1 unabdingbar. Da für die schnelle HCN-Freisetzung bei *H. brasiliensis* außerdem Hydroxynitrillyase (HNL) erforderlich ist (SELMAR et al. 1989), war zu erwarten, dass auch die Transkriptmengen von HNL hoch sind. In der Tat liegt das RE in Blättern des B-Stadiums bei 927 ± 1 (siehe Abbildung 2.3.9).

In C-Stadien-Blättern ist die BGLU-1-Transkriptmenge leicht verringert. Das RE beträgt 2452 ± 240 . Bei HNL hingegen bleibt die Transkriptmenge offenbar konstant, wie das RE von 927 ± 1 belegt. Eine nach wie vor hohe Expression der beiden Enzyme war zu erwarten, da die C-Stadien, wie auch die B-Stadien, hochcyanogen sein können. Im Falle von BGLU 5 ist ein Absinken des RE auf 101 ± 10 festzustellen. Bei BGLU 2 hingegen ist die Transkriptmenge im C-Stadium leicht erhöht. Das RE liegt bei $2,7 \pm 0,1$.

Im D-Stadium verringert sich die Transkriptmenge aller Enzyme. Das RE von BGLU 1 und HNL beträgt nur noch 572 ± 56 (BGLU 1) bzw. 77 ± 15 (HNL). Die adulten Blätter des D-Stadiums sind durch die Lignifizierung gut vor Fraßfeinden geschützt und daher auf die Cyanogenese nicht mehr angewiesen. Eine verringerte Expression von BGLU 1 und HNL war daher zu erwarten. Auch die Expression von BGLU 5 fällt mit einem RE von 11 ± 1 deutlich niedriger aus als in den juvenilen Blattstadien. Die Transkriptmenge von BGLU 2 schließlich geht gegen 0 (siehe Abbildung 2.3.9).

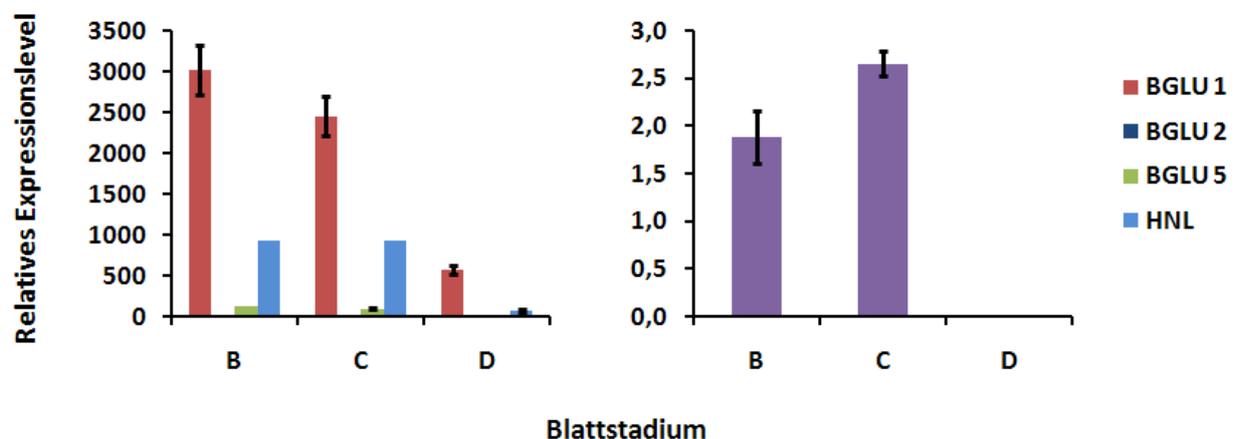


Abbildung 2.3.9: Relatives Expressionslevel von BGLU 1, BGLU 2, BGLU 5 und von HNL in den Blattstadien B, C und D

Die relativen Expressionslevel wurden aus den mittels Real-Time-PCR bestimmten CT-Werten berechnet. Sie sind ein Maß für das Verhältnis der Transkriptmengen der jeweiligen Gene und lassen damit auch einen Rückschluss auf die Proteinmengenverhältnisse zu. So dürfte von BGLU 1 eine um ein vielfaches größere Transkriptmenge vorhanden sein als von BGLU 2.

Die im Vergleich zu BGLU 1 extrem niedrige Expression von BGLU 2 spricht dagegen, dass es sich, wie aufgrund der AS-Sequenz angenommen, um ein Enzym handelt das Lotaustralin umsetzt. Da Lotaustralin etwa 5 - 10 % der cyanogenen Glucoside bei *H. brasiliensis* ausmacht, Linamarin

hingegen 90 - 95 %, könnte für die an der Hydrolyse beteiligten Enzyme ein ähnliches Verhältnis erwartet werden. Dies ist aber nicht der Fall. Die Transkriptmenge von BGLU 1 ist im B-Stadium 1600 fach, im C-Stadium 900 fach höher als die von BGLU 2 (siehe Abbildung 2.3.9). Die mengenmäßige Verschiebung der BGLU-2-Expression in den juvenilen Blattstadien und das Fehlen im D-Stadium lassen vermuten, dass das Enzym in Zusammenhang mit der Blattentwicklung stehen könnte. So wäre eine Beteiligung an der Aktivierung von Phytohormonen denkbar. Eine Funktion im Zusammenhang mit der im späten C-Stadium einsetzenden Lignifizierung erscheint, aufgrund der in Abbildung 2.3.5 gezeigten Einordnung des Enzyms, eher unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite ist beispielsweise aus GH-Familie5 bekannt, dass eine hohe Übereinstimmung in Bezug auf die AS-Sequenz nicht gleichzeitig auch bedeuten muss, dass die Enzyme dasselbe Substrat umsetzen (DAVIES und HENRISSAT 2002).

***H. brasiliensis* verfügt über mindestens 10 Gene die BGLU-1-ähnliche Enzyme kodieren**

Die bisher vorgestellten Ergebnisse erfassen nur die Anzahl der BGLUs, die in dem beprobten Gewebe und zum Zeitpunkt der Beprobung exprimiert wurden. Darüber hinaus erschwert die Dominanz des BGLU-1-Transkriptes mit Sicherheit die Identifikation anderer BGLUs. Um zu prüfen wie viele Gene es gibt, die BGLU-ähnliche GHs kodieren, wurde daher ein Southern-Blot (SB) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst DNA aus Blättern des C-Stadiums isoliert und mit 2 Restriktionsenzymen verdaut, von denen eines auch im *BGLU 1*-Gen, nicht aber im Sequenzbereich der Sonde, schnitt. Die Sonde wurde durch Amplifikation eines 194 Basenpaare (bp) langen Abschnittes des *BGLU 1*-Gens hergestellt. Durch Zugabe von Digoxigenin-(DIG)-markierten dNTPs zum PCR-Ansatz wurde die Sonde entsprechend markiert.

Nach gelelektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente aus dem Verdau wurde diese auf eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran) geblotted. Die NC-Membran wurde daraufhin mit der Sonde und schließlich mit einem DIG-spezifischen AK, bei dem es sich um ein HRP-Konjugat (HRP: Horseradish Peroxidase) handelte, inkubiert. Abschließend konnten die Membranbereiche, auf denen sich der AK befand, mit Hilfe des HRP-Substrates CSPD sichtbar gemacht werden. Um auch Banden mit geringerem DNA-Gehalt detektieren zu können, wurde in einer Wiederholung die aufgetragene DNA-Menge verdreifacht. Die Ergebnisse zeigen, dass mindestens 10 Gene vorhanden sind, die BGLU-1-ähnliche Enzyme kodieren (siehe Abbildung 2.3.10). Bei drei von diesen dürfte es sich um *BGLU 2*, *BGLU 3* und *BGLU 4* handeln. Die verbleibenden 7 Gene wurden bisher noch nicht identifiziert.

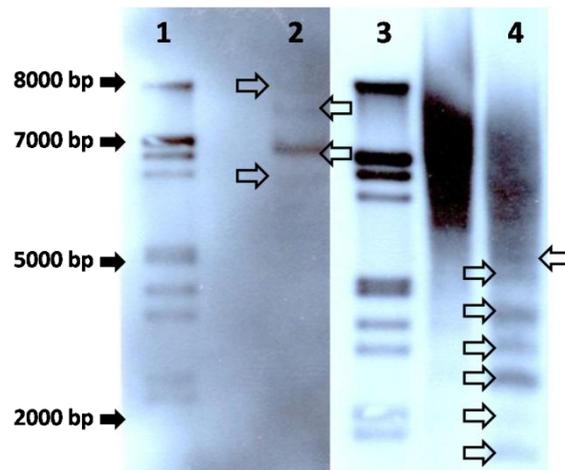


Abbildung 2.3.10: Ergebnis des Southern-Blots mit *BGLU-1*-spezifischer Sonde

Genomische DNA aus Blättern von *H. brasiliensis* wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *Alw44I* verdaut. BGLU-1-ähnliche Sequenzabschnitte wurden mit einer BGLU-1-spezifischen Sonde detektiert. Das Ergebnis zeigt, dass *H. brasiliensis* über mindestens 10 Gene verfügt, die BGLU-1-ähnliche Enzyme kodieren. 1 und 3: Marker (Roche Applied Sciences); 2 und 4: DNA-Probe (4 mit dreifacher DNA-Menge); Die schwarzen Pfeile markieren von der Sonde detektierte Membranbereiche.

Erstellung von 3D-Strukturmodellen für BGLU 1 - 5

Mit Hilfe des Programms Swiss-Model können AS-Sequenzen in eine 3D-Struktur übertragen werden. Vorausgesetzt es findet sich ein Protein mit ähnlicher AS-Abfolge, dessen 3D-Struktur bereits bekannt ist. Je länger dabei die AS-Sequenz ist, desto geringer kann der Grad der Übereinstimmung sein, ohne dass sich die Qualität des Modells nennenswert verschlechtert. Für die Modellierung von BGLU 1 - 5 wäre aufgrund der Länge von durchschnittlich 500 AS ein Template mit einer Sequenzübereinstimmung von 50 % ausreichend (TORDA, persönliche Mitteilung). Was Linamarasen angeht wurde von BARRETT et al. (1995) die 3D-Struktur des Enzyms aus *T. repens* (1CBG) aufgeklärt. Da sie zur selben GH-Familie gehört wie BGLU 1 - 5 und darüber hinaus dieselbe Reaktion katalysiert wie BGLU 1 sollte sie für die 3D-Struktur-Vorhersage der *H. brasiliensis*-Enzyme geeignet sein. Der Vergleich der AS-Sequenzen bestätigte diese Annahme. Die prozentuale Übereinstimmung der AS-Sequenzen lag, von BGLU 5 abgesehen, in allen Fällen über 50 % (siehe Tabelle 2.3.5). 1CBG wurde aus diesem Grund als Template für die Erstellung der 3D-Struktur-Modelle von BGLU 1 - 4 gewählt. Bei BGLU 5 betrug die Übereinstimmung zur AS-Sequenz von 1CBG 45 %. Eine BGLU aus *Oryza sativa* (Os3BGlu7, 2RGM) erwies sich als geeigneter. Verglichen mit dieser lag die Sequenzübereinstimmung bei 48 %. Die 3D-Struktur von Os3BGlu7 wurde von CHUENCHOR et al. (2008) publiziert. Für die Erstellung des 3D-Modells von BGLU 5 wurde Os3BGlu7 bzw. 2RGM als Template gewählt.

Tabelle 2.3.5: Übereinstimmung der AS-Sequenzen von BGLU 1 - 5 mit 1CBG und 2RGM

Die AS-Sequenzen von BGLU 1 und 2 wurden im Rahmen der Arbeiten zu diesem Kapitel ermittelt. Die Sequenzen von BGLU 3 - 5 stammen aus der Datenbank des NCBI, die Sequenzen von 1CBG und 2RGM aus der Datenbank des RCSB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Das Alignment sowie die Berechnung des Grades der Übereinstimmung der AS-Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Programmes ClustalW. **1CBG**: Linamarase aus *T. repens*; **2RGM**: β -Glucosidase aus *O. sativa*

Protein	Anzahl der AS	Template	Übereinstimmung [%]
BGLU 1	544	1CBG	54
BGLU 2	543	1CBG	53
BGLU 3	527	1CBG	53
BGLU 4	527	1CBG	53
BGLU 5	489	1CBG	45
BGLU 5	x	2RGM	48
1CBG	490	x	x
2RGM	481	x	x

Um einen Vergleich der 3D-Strukturen bzw. Modelle zu ermöglichen, wurden diese zunächst unter Verwendung des Programmes Chimera übereinandergelegt, so dass die Ausrichtung aller Strukturdarstellungen identisch war. Orientiert wurde die Ausrichtung an 1CBG. Für die Erstellung der Abbildungen wurde, der Übersichtlichkeit halber, immer nur eine der Strukturen angezeigt (siehe Abbildung 2.3.11). Wie die Übersicht über die 3D-Modelle von BGLU 1 - 5 sowie das Modell von 1CBG zeigt, befinden sich die bei GH1-BGLY konservierten Sequenzmotive (siehe Abbildung 2.3.4 oder Seite 11), sämtlich in ähnlichen wenn nicht gleichen Positionen (siehe Abbildung 2.3.11). Dies gilt insbesondere für die beiden an der Katalyse beteiligten Sequenzmotive TF/LNEP (gelb markiert) und I/VT/SENG (rot markiert), ist aber auch bei den Motiven S/AAY/FQV/WEG (blau markiert) und GYFAWSLXDNFEW (türkis markiert) der Fall. Was den Abschnitt APGRCS (dunkelgrün markiert) anbelangt finden sich hingegen deutliche Abweichungen zwischen BGLU 5 und den übrigen GHs. Zwar weist das Sequenzmotiv in allen Fällen eine lineare Sekundärstruktur auf, die Windung ist aber bei BGLU 1 - 4 und 1CBG anders (markiert durch dunkelgrüne Pfeile). Ähnlich verhält es sich mit dem Sequenzmotiv RFSIWSRIFP (rosa markiert). Hier weisen die BGLUs 1 - 5 eine α -helicale Sekundärstruktur auf, während sie bei 1CBG linear ist. Darüber hinaus findet sich eine Reihe struktureller Abweichungen in den weniger stark konservierten Sequenzbereichen, von denen einige am Beispiel von 1CBG und BGLU 1 exemplarisch hervorgehoben sind (markiert durch Pfeile). So sind α -Helices bei BGLU 1 z.T. um 1 halbe bis eine ganze Windung verlängert oder verkürzt (markiert durch hellgrüne Pfeile). In einigen Bereichen weist 1CBG lineare Überhänge auf, die so bei BGLU 1 nicht vorkommen (markiert durch hellblaue Pfeile). BGLU 5 wiederum, die sich auch was die AS-Sequenz anbelangt deutlich von BGLU 1 - 4 unterscheidet (siehe Tabelle 2.3.1), weicht auch in der 3D-Struktur von diesen ab, wie sich am Vergleich mit BGLU 4 verdeutlichen lässt.

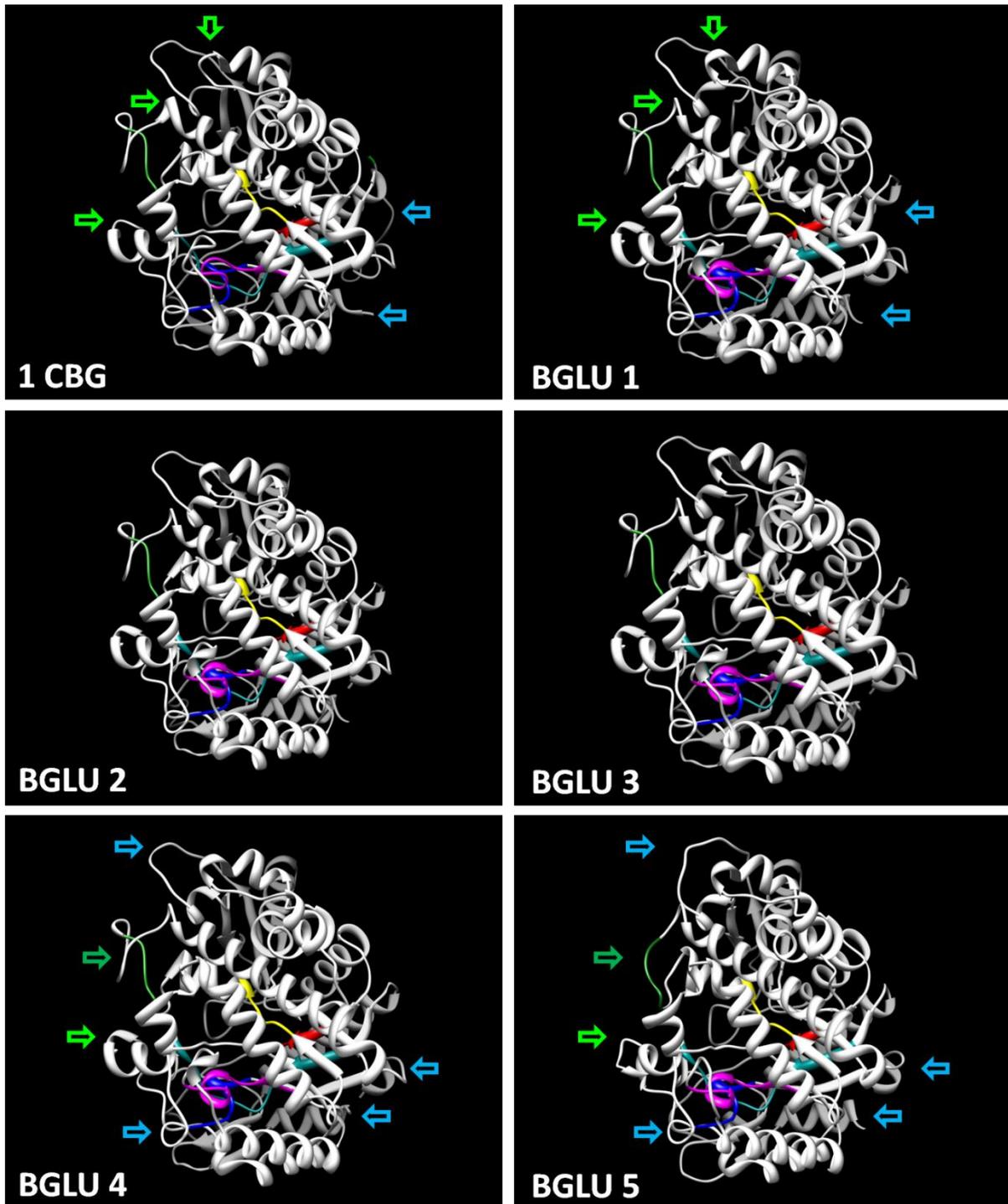


Abbildung 2.3.11: Hypothetische 3D-Struktur von BGLU 1 - 5

Die 3D-Strukturmodelle wurden mit Hilfe des Programmes Swiss-Model erstellt. Die Bearbeitung und das Erstellen der Abbildungen erfolgte mittels Chimera. Die Modelle von BGLU 1 bis 4 sind an der Struktur der Linamarase (1CBG) aus *T. repens* orientiert. Das Modell von BGLU 5 hingegen ist an der Struktur von Os3Bglu7 (2RGM) aus *O. sativa* orientiert. Die bei GH1-BGLY konservierten Sequenzmotive sind farblich hervorgehoben: das S/AAY/FQV/WEG-Motiv blau, RFSIWSRIFP rosa, TF/LNEP gelb, APGRCS dunkelgrün, I/VT/SENG rot und GYFAWSLXDNEFW türkis. Die Pfeile markieren exemplarisch Strukturbereiche in denen sich 1CBG von BGLU 1 bzw. BGLU 5 von BGLU 4 unterscheidet. Hellgrüne Pfeile = veränderte Sekundärstruktur; hellblaue Pfeile = Struktur fehlt bei einem der Proteine oder ist anders positioniert; dunkelgrüner Pfeil = Veränderung der Anordnung des konservierten Sequenzmotives APGRCS bei BGLU 5.

So finden sich in einigen Bereichen α -helicale Sekundärstrukturen, die verlängert oder verkürzt sind (markiert durch grüne Pfeile). Z.T. weisen lineare Abschnitte eine andere Positionierung auf (markiert durch hellblaue Pfeile). Insgesamt weisen die 3D-Strukturen aber eine hohe Übereinstimmung auf, was für die Qualität der Modelle spricht und eine Weiterverwendung ermöglicht.

Struktureller Vergleich der katalytischen Zentren von BGLU 1 - 5

2RGM aus *O. sativa* wurde in Gegenwart eines Inhibitors, der 2-Deoxy-2-Fluoro-Glucose (G2F), kristallisiert (CHUENCHOR et al. 2008). Da 2RGM eine relativ hohe Übereinstimmung zu den AS-Sequenzen von BGLU 1 - 5 aufweist (Daten nicht gezeigt) und sich die 3D-Strukturen außerdem weitestgehend zur Deckung bringen lassen, ist es möglich die Positionierung der an der Katalyse beteiligten Glutaminsäurereste zu vergleichen (siehe Abbildung 2.3.12). Zunächst fällt auf, dass der Glutaminsäurerest des I/VT/SENG Motives (rot markiert), der während der Katalyse glycosiliert wird (siehe Seite 10), bei den BGLUs 1 - 4 gegenüber der Orientierung bei 2RGM um circa 90° gedreht ist. Dies bedingt eine Veränderung der Abstände zwischen den Sauerstoffatomen des Glutaminsäurerestes und dem anomeren Kohlenstoffatom der Glucose von G2F. Bei 2RGM bindet die Glucose an einem der Sauerstoffatome, was einem molekularen Abstand zwischen Sauerstoff und Kohlenstoff von 1,432 Å entspricht. Der Abstand des zweiten Sauerstoffs zum anomeren Kohlenstoff beträgt 2,604 Å (siehe Abbildung 2.3.12). Durch die Drehung erhöht sich der Abstand des bindenden Sauerstoffatoms im Falle von BGLU 1 auf 2,492 Å, der des zweiten Sauerstoffs auf 3,799 Å. Ähnlich verhält es sich bei BGLU 2 - 4. Mit Werten für das bindende Sauerstoffatom von 2,509 (BGLU 2), 2,491 (BGLU 3) und 2,485 Å (BGLU 4) sowie Abständen von 3,801 (BGLU 2), 3,812 (BGLU 3) und 3,975 Å (BGLU 4) bezüglich des zweiten Sauerstoffs sind sie zu BGLU 1 nahezu identisch. Das Sauerstoffatom des Glutaminsäurerestes aus dem TF/LNEP Motiv (gelb markiert), welches sich näher am anomeren Kohlenstoffatom des Zuckers befindet, hat im Falle von 2RGM einen Abstand von 3,609 Å zu diesem (siehe Abbildung 2.3.12). Bei BGLU 1 ist er mit 3,462 Å etwas kleiner. Dies trifft auch für BGLU 2 und 4 zu. Hier betragen die Abstände 3,475 und 3,462 Å. Bei BGLU 3 liegt er mit 3,556 Å zwischen BGLU 1, 2 sowie 4 und 2RGM. Die Abweichungen zwischen BGLU 1 - 4 und 2RGM könnten natürlich auf eine veränderte Positionierung ein und desselben Substrates zurückgehen. Da BGLU 1 aber vornehmlich für die Spaltung von Linamarin zuständig ist, ein Substrat welches sich bei *O. sativa* nicht findet, dürfte die unterschiedliche Positionierung der Glutaminsäurereste auf die abweichende Substratspezifität zurückzuführen sein. Im Weiteren könnte dies bedeuten, dass das Substratspektrum von BGLU 1 - 4, trotz leichter Abweichungen in AS-Sequenz und 3D-Struktur, identisch ist. Damit würde es sich doch, wie zuvor vermutet, um eine LIN-Unterfamilie der GH-Familie¹ von *H. brasiliensis* handeln (siehe Abbildung 2.3.5).

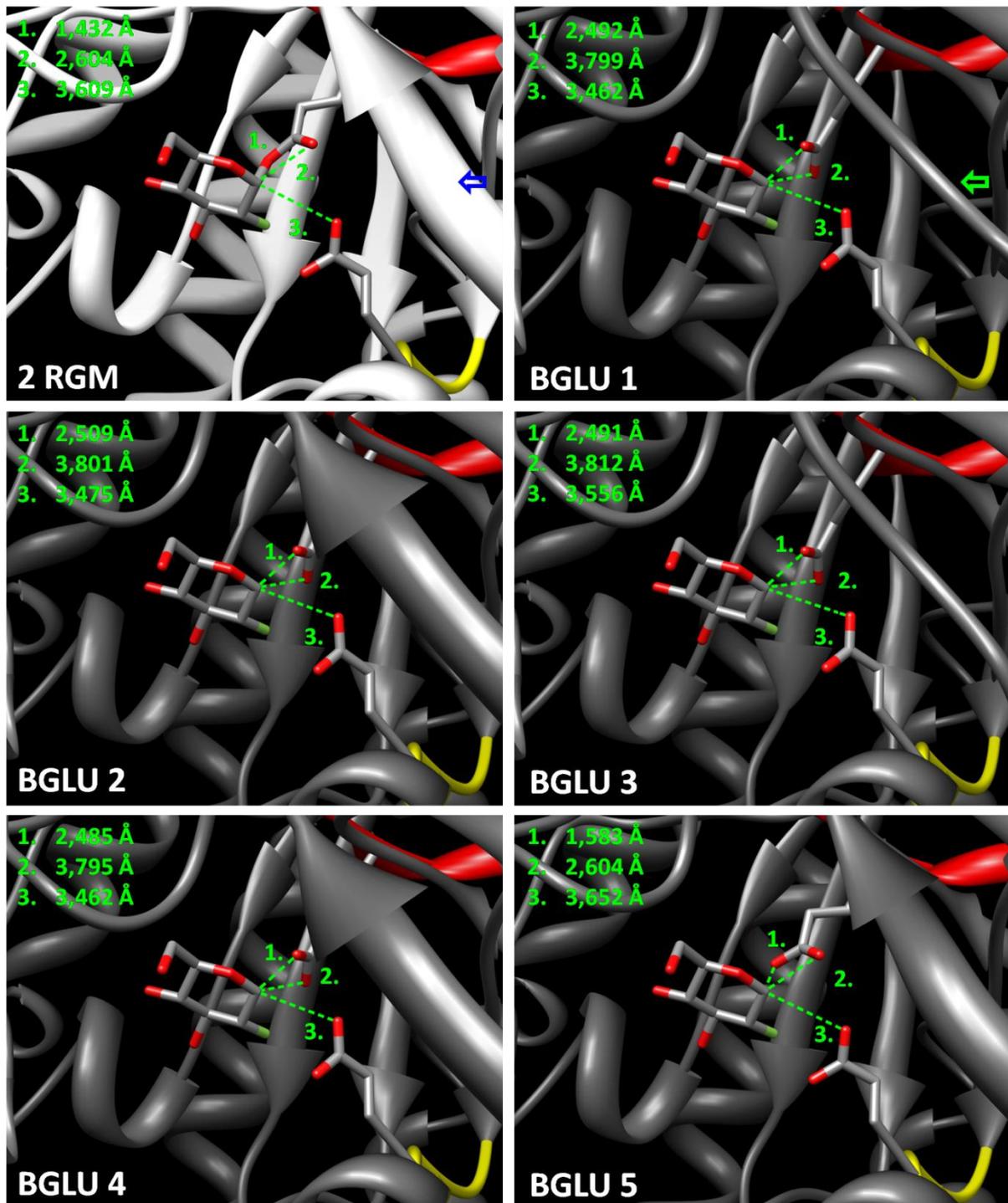


Abbildung 2.3.12: Hypothetische Position von G2F in den katalytischen Zentren von BGLU 1-5

Die hypothetischen 3D-Strukturen von BGLU 1 - 5 wurden über die von 2RGM gelegt, um die Positionierung des Inhibitors G2F zu den am Katalysemechanismus beteiligten Glutaminsäureresten des TF/LNEP- (gelb) und des I/VT/SENG-Motivs (rot) vergleichen zu können. Gemessen wurden die Abstände zum anomeren Kohlenstoffatom, das im Rahmen der Hydrolyse an das Enzym bindet (siehe 2RGM). Während die Abstände bei BGLU 1 - 4 weitestgehend gleich sind und sich deutlich von denen bei 2RGM unterscheiden, entsprechen sie im Falle von BGLU 5 den bei 2RGM gemessenen. Die gemessenen Abstände sind durch eine hellgrüne Linie markiert und mit einer Nummer versehen. Jeder Nummer ist in der oberen, rechten Bildhälfte der gemessene Abstand zugeordnet.

Bei BGLU 5 ist der Glutaminsäurerest des I/VT/SENG Motives (rot markiert) nicht gedreht. Der Abstand zwischen dem bindenden Sauerstoffatom und dem anomeren Kohlenstoffatom des Zuckers beträgt daher lediglich 1,583 Å, was nahezu dem bei 2RGM gemessenen Wert entspricht (siehe Abbildung 2.3.12). Das zweite Sauerstoffatom dieses Glutaminsäurerestes befindet sich mit 2,604 Å sogar in einem identischen Abstand zum anomeren Kohlenstoffatom. Beim Sauerstoffatom des Glutaminsäurerestes aus dem TF/LNEP Motiv (gelb markiert) ist der Abstand wiederum geringfügig größer. Er beträgt 3,652 Å. Bei den BGLUs 1 - 4 war er hingegen kleiner als dies bei 2RGM der Fall ist. Die Ähnlichkeiten zwischen BGLU 5 und 2RGM könnten auf eine vergleichbare Substratspezifität hinweisen. Dies bestätigt die bereits zuvor auf Grundlage der AS-Sequenz dargestellte Einschätzung (siehe Abbildung 2.3.5), dass BGLU 5 keine Linamarase ist.

Zu erwähnen ist noch, dass in dem Bereich nahe des katalytischen Zentrums, in dem 2RGM eine β -Faltblattstruktur aufweist (markiert durch einen hellblauen Pfeil), im Falle von BGLU 1 eine lineare Sekundärstruktur (hellgrüner Pfeil) vorliegt (siehe Abbildung 2.3.12). In diesem Punkt stimmen BGLU 2, 4 und 5 mit 2RGM überein, BGLU 3 hingegen mit BGLU 1. Es sei bezüglich der Gewichtung dieser Daten noch einmal darauf hingewiesen, dass es sich um Modelle handelt, weshalb die beschriebenen Abweichungen letztendlich auf das Template zurückzuführen sind. Sie ermöglichen keine definitiven Aussagen in Bezug auf die *in vivo*-Faltung und die *in vivo*-Substratbindung.

Heterologe Expression von BGLU 1 in *E. coli*

Um die Vorhersagen zur Substratspezifität der HbBGLUs 1 - 5 künftig prüfen zu können, wäre eine heterologe Expression der Enzyme hilfreich. Daher sollte zunächst BGLU 1 exemplarisch in *E. coli* exprimiert werden, um zu testen ob das Expressionssystem geeignet ist. Hierzu wurde der entsprechende Sequenzabschnitte aus ds cDNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pTrcHis2-TOPO® (Invitrogen®) kloniert. Für die anschließende Transformation wurden XL1-Blue Zellen (DNA Cloning Service®) verwendet. Basenabfolge und Orientierung des Inserts wurden durch Sequenzierung (DNA Cloning Service®) überprüft. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mmol * l⁻¹) induziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden konnte eine maximale BGLU-1-Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem Protein auch tatsächlich um BGLU 1 handelte, wurde sowohl der N-Terminus sequenziert, als auch eine massenspektrometrische Analyse vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass es sich um BGLU 1 handelte (Daten nicht gezeigt). Die gefundenen Sequenzabschnitte entsprachen denen, die sich bei Analyse von immunoaffinitätschromatographisch isolierter BGLU 1 ergaben (siehe Abbildung 2.3.7 A). Das Protein erwies sich aber, unabhängig von der Zellaufschlussmethode, als unlöslich und konnte nur durch aufkochen in SDS-Ladepuffer in Lösung gebracht werden. Es war somit für die Weiterverwendung ungeeignet.

Um die Löslichkeit des Proteins zu verbessern und die Ablagerung in Inclusion-Bodies zu verringern wurde ein 30 kDa großes SUMO-Protein vor den N-Terminus von BGLU 1 gehängt. Hierzu wurde die Sequenz von BGLU 1 aus ds cDNA amplifiziert und in den PET-SUMO®-Vektor der Firma Invitrogen® kloniert. Für die Transformation wurden XL1-Blue Zellen (DNA Cloning Service®) verwendet. Nach Überprüfung von Basenabfolge und Orientierung der Inserts mittels Sequenzierung (DNA Cloning Service®), wurden die Plasmide ausgewählter Klone isoliert und für die Transformation von BL21Star®-Zellen (Invitrogen®) verwendet. BL21Star®-Zellen haben zweierlei Vorteile. Zum einen ist die Expression zweier *E. coli*-eigener Proteasen ausgeschaltet, was den Verlust an heterolog exprimiertem Protein minimiert, zum anderen kann die Expression des Proteins, obwohl sie unter Kontrolle des T7-Promotors steht, durch alleinige Zugabe von IPTG induziert werden. Der T7-Promotor ermöglicht eine besonders hohe Expressionsrate. Das heterolog exprimierte Protein kann 50 % und mehr des Gesamtproteins ausmachen. In der Tat fand sich in Zellen, in denen die BGLU-Expression induziert wurde, fast ausschließlich BGLU 1 (siehe Abbildung 2.3.13 A und B), was auch auf die starke Reduktion der Expression *E. coli*-eigener Proteine zurückzuführen ist. So findet sich in der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden eine Vielzahl von Proteinen (siehe Abbildung 2.3.13 A; Bahn 2). Der IPTG-haltige Ansatz hingegen weist nach 4 Stunden fast ausschließlich BGLU 1 auf (Bahn 5; roter Pfeil). Darüber hinaus fällt auf, dass die Expression sehr schnell einsetzt. Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit konnten größere Mengen von BGLU 1 detektiert werden (siehe Bahn 3). Nach 2 Stunden wurde bereits das Expressionsmaximum erreicht (siehe Bahn 4). Der Proteingehalt der Proben unterscheidet sich allerdings nicht wesentlich, wie die densitometrische Untersuchung des Gels (Abbildung 2.3.13 A) zeigte. So beträgt der Wert für den Proteingehalt (D) der BGLU-1-Bande nach einer Stunde 12,7. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 2 Stunden hat einen Anstieg auf D = 15,6 zur Folge. Nach 4 Stunden ist keine weitere Steigerung mehr festzustellen. Der Wert für D sinkt auf 13,6 (siehe Abbildung 2.3.13 B; roter Pfeil).

Durch das Hinzufügen des SUMO-Tags sollte das BGLU 1 Protein theoretisch eine Größe von 96 bzw. 94 kDa aufweisen. Dass das Protein jedoch kleiner war (siehe Abbildung 2.3.13 A) dürfte auf die fehlende Glycosilierung zurückzuführen sein. Eine Doppelbande war nicht zu erkennen, was aber durch das Auflösungsvermögen des Gels bedingt sein dürfte. In jedem Fall hatte das SUMO-Tag keinerlei Verbesserung der Löslichkeit von BGLU 1 zur Folge (Daten nicht gezeigt).

Eukaryotische mRNAs können Kodons aufweisen, die bei *E. coli* sehr selten sind. Beinhaltet eine mRNA mehrere solcher Kodons, kann dies zu erheblichen Problemen bei der Expression und zur Unlöslichkeit des Proteins führen. Des Weiteren verfügen *E. coli* Zellen nicht über die Möglichkeit Disulfidbrücken zu knüpfen, was ebenfalls zu einer schlechteren Löslichkeit der entsprechenden Proteine beitragen kann. Rosetta-Gami-Zellen (RG-Zellen) verfügen über größere Mengen der an sich seltenen tRNAs und sind in der Lage Disulfidbrücken zu knüpfen. Daher wurden RG-Zellen der Firma

Novagen® für die erneute Expression von BGLU 1 genutzt. Für die Transformation konnten die bereits zuvor selektierten PET-SUMO-Vektoren verwendet werden. Ein weiteres Problem bei der Expression pflanzlicher Proteine in *E. coli* stellt die hohe Inkubationstemperatur von 37 °C da. Sie kann zur Denaturierung und damit zur Unlöslichkeit großer Mengen des heterolog exprimierten Proteins beitragen. Daher wurde die Inkubationstemperatur der Kulturen vor der Induktion mit IPTG auf 22 °C abgesenkt. Die niedrige Temperatur sowie die Zugabe von 3 verschiedenen Antibiotika zum Inkubationsmedium, die bei Verwendung von RG-Zellen erforderlich ist, führte zu einer deutlichen Verlangsamung der Expression. Nach einer Stunde Inkubationszeit konnten erst kleinste Proteinmengen im Überstand detektiert werden (siehe Abbildung 2.3.13 C; Bahn 3). BGLU 1 war nicht darunter.

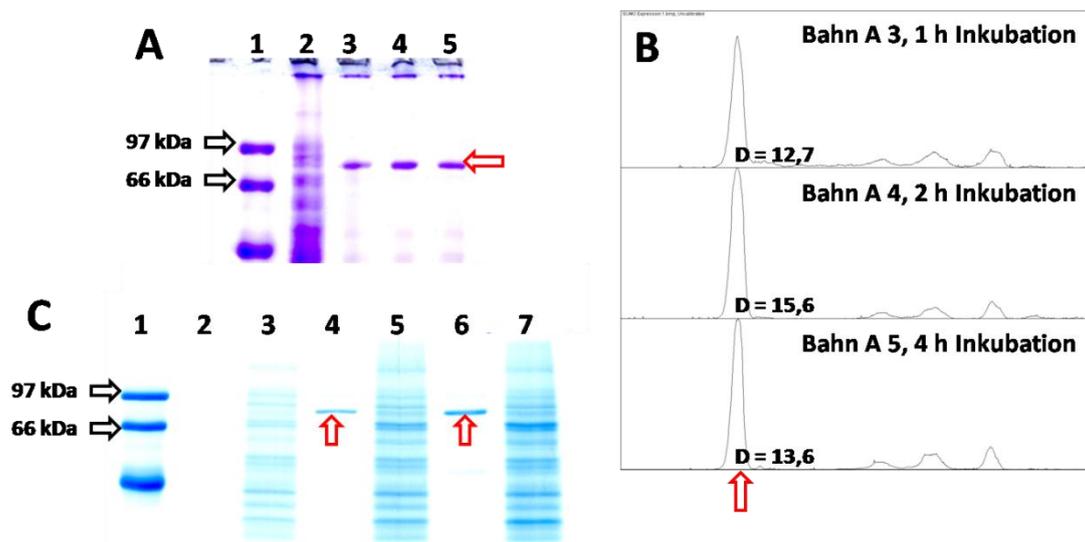


Abbildung 2.3.13: Heterologe Expression von BGLU 1

BGLU 1 aus *H. brasiliensis* wurde in *E. coli* exprimiert. Dabei wurden sowohl BL21Star (DE3)- als auch Rosetta-Gami-DE3-Zellen verwendet. Das Protein war zwar in großen Menge in den Zellextrakten vorhanden, blieb jedoch unabhängig davon welcher *E. coli*-Stamm verwendet wurde und wie der Zellaufschluss erfolgte unlöslich.

A. Gelanalyse des Zellextraktes bei Expression in BL21Star (DE3); 1: Marker (Amersham Biosciences®); 2: Zellextrakt nicht induzierter Kulturen; 3 - 5: Zellextrakt induzierter Kulturen nach 1, 2 und 4 Stunden; Die BGLU-Banden sind mit einem roten Pfeil markiert.

B. Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung (ImageJ) des in Teil A gezeigten Gels. D gibt die gemessene Signaldichte der Banden wieder und ist damit ein Maß für die Proteinmengen. Der rote Pfeil markiert den Peak der BGLU entspricht.

C. Gelanalyse des Zellextraktes bei Expression in Rosetta-Gami-DE3; 1: Marker (Amersham Biosciences®); 2, 4 und 6: Fraktion der unlöslichen Proteine nach 1, 2,5 und 5 Stunden; 3, 5 und 7: Fraktion der löslichen Proteine nach 1, 2,5 und 5 Stunden; Rote Pfeile markieren die Banden, die BGLU entsprechen.

Nach 2,5 Stunden war die Proteing Gesamtmenge deutlich erhöht (Bahn 5). Auch BGLU 1 konnte detektiert werden. Allerdings ausschließlich im Pellet (Bahn 4; roter Pfeil). Die Erhöhung der

Inkubationszeit auf 5 Stunden hatte auch eine deutlich erhöhte BGLU-1-Expression zur Folge (Bahn 6). Das Protein war jedoch unlöslich und befand sich ausschließlich im Pellet (Bahn 6 und 7 im Vergleich). Um sicher zu gehen, dass sich keinerlei BGLU 1 im Überstand befand wurde außerdem die BGLU-Aktivität gemessen. Es konnte keinerlei Substratumsatz nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das BGLU 1 in *E. coli* nicht in nativer, löslicher Form exprimiert werden konnte, könnte auf die fehlende Glycosilierung zurückzuführen sein. Die Expression in *Pichia pastoris*, mit der bereits begonnen wurde, soll zur Behebung des Löslichkeitsproblems beitragen und eine Analyse des Substratspektrums sämtlicher GH 1-BGLUs, die bisher aus *H. brasiliensis* bekannt sind, ermöglichen.

2.4 Diskussion

BGLU 1 - 4: Mitglieder einer Linamarase-Unterfamilie bei *H. brasiliensis*?

Wie hier gezeigt werden kann scheint *H. brasiliensis*, analog zur GH1-Unterfamilie der Myrosinase bei *A. thaliana*, über eine Linamarase-Unterfamilie zu verfügen. Mindestens 11 Gene kodieren Linamarase-ähnliche Enzyme. Von 4 dieser Gene wurde bisher die Expression nachgewiesen. 2 sind auch auf Proteinebene beschrieben. Es handelt sich hierbei um die Blatt-Linamarase BGLU 1, die von SELMAR et al. (1987) isoliert und charakterisiert wurde und um die VSP-Linamarase BGLU 3, die im sekundären Phloem des Sprosses vorkommt (TIAN et al. 1998) und von TIAN et al. (2006 in NCBI) sequenziert wurde. Die Anzahl der Gene lässt vermuten, dass bei *H. brasiliensis* noch weitere Linamarasen vorkommen. Ob alle Gene auch tatsächlich exprimiert werden und ob alle Genprodukte auch gleichermaßen katalytisch aktiv sind bleibt zu klären.

Im Falle von *M. esculenta* wurden 3 verschiedene Linamarasen beschrieben, die organspezifisch exprimiert werden und Linamarin unterschiedlich schnell hydrolysieren (MCMAHON et al. 1995). Während in den Blättern alle drei Enzyme vorkommen findet sich in den Wurzelknollen lediglich jenes, welches Linamarin langsam umsetzt. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass in den Knollen auch große Mengen an Linamarin, zwecks der Speicherung von reduziertem Stickstoff, eingelagert sind (SIRITUNGA 2002). In einem solchen Gewebe könnten schon kleinere Verletzungen verheerende Folgen haben. Bei einer hohen Linamarase-Aktivität würden schnell größere Mengen an Blausäure (HCN) freigesetzt, was bedingt auch durch den geringen Luftaustausch unter der Erde zu einem Absterben weiterer Zellen und damit zur Freisetzung weiterer HCN führen würde. Es bestünde die Gefahr des Verlustes ganzer Speichergewebe. Die Expression eines Enzyms mit niedrigerer Aktivität könnte vor solchen Folgen schützen. Gleichzeitig könnte aber auch, beim Auftreten starker Gewebeschäden wie sie z.B. durch Fraßfeinde verursacht werden, eine ausreichend starke Freisetzung gewährleistet bleiben, um einen Repellent-Effekt zu erzielen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Hydroxynitrilase in den Wurzeln offenbar nur sehr schwach exprimiert wird, was die HCN-Freisetzung ebenfalls verlangsamt (WHITE et al. 1998).

Ähnliches könnte für *H. brasiliensis* gelten. Auch hier fungiert Linamarin als Speicher reduzierten Stickstoffs in den Wurzeln (SELMAR 1993). Gleichzeitig wird dort aber auch BGLU 3 als vegetatives Speicherprotein abgelegt (TIAN et al. 1998; TIAN et al. 2006 in NCBI). Gewebeverletzung aber auch die Mobilisierung beider Speicherstoffe zu Beginn des Blattaustriebs könnten zu einer ungewollten Blausäure-Freisetzung führen. Wäre BGLU 3 katalytisch weniger oder nicht aktiv könnte die Freisetzung vermieden werden. Die hier vorgestellten 3D-Analysen sprechen allerdings gegen katalytische Inaktivität. Eine reduzierte Aktivität wie beim Maniok wäre aber denkbar, die nur bei Gewebeverletzung eine nennenswerte Blausäure-Freisetzung ermöglicht und damit eine Schutzfunktion garantiert.

A. thaliana verfügt über 6 verschiedene Myrosinasen (Xu et al. 2004). Dieser scheinbaren Vielzahl an gleichen Enzymen stehen 36 verschiedenen Glycosinolate gegenüber (REICHEL et al. 2002). Das Vorhandensein mehrerer Myrosinasen ist offenbar auf den Umstand zurückzuführen, dass eine große Zahl unterschiedlicher Substrate hydrolysiert werden muss. Bei *H. brasiliensis* scheinen mindestens 4 Linamarasen vorzukommen. Die Zahl der cyanogenen Glycoside beläuft sich aber lediglich auf 2, namentlich Linamarin und Lotaustralin. Die Anzahl potentiell an der Cyanogenese beteiligter Enzyme kann also nicht mit der Substratvielfalt in Zusammenhang stehen. Vielmehr könnten die BGLUs 1 - 4 Anpassungen an unterschiedliche Anforderungen darstellen. Die Cyanogenese kann als Repellent gegenüber Herbivoren fungieren. Allerdings nur, wenn die Blausäure-Freisetzung schnell genug erfolgt (BALLHORN et al. 2005). Die beteiligte Linamarase sollte somit einen schnellen Substratumsatz ermöglichen. Auf der anderen Seite führt die Blausäure zu einer Autoinhibition anderer Abwehrreaktionen (LIEBERE 2007). Von einigen pathogenen Pilzen ist bekannt, dass sie gegenüber Blausäure resistent sind. Sie können aus diesen Gründen die Gewebe hochcyanogener Pflanzen problemlos besiedeln (LIEBERE 2007). Eine Linamarase mit verlangsamtem Substratumsatz könnte zu einer Minderung der Cyanogenität und damit zu einer Verringerung der Anfälligkeit gegenüber solchen Schädlingen beitragen. Die Tatsache, dass die Cyanogenese sowohl eine Schutzfunktion haben, als auch eine erhöhte Anfälligkeit bedingen kann - sowie die zusätzliche Funktion von Linamarin und Linamarase als Speicherstoff - könnten die Vielzahl unterschiedlicher Linamarase-Gene bedingen.

Zu prüfen bleibt natürlich, ob tatsächlich alle Enzyme die Hydrolyse von Linamarin katalysieren. Von BGLU 1 ist bekannt, dass sie neben Linamarin auch β -Mannoside und β -Galactoside spaltet. Bereits geringfügige Veränderungen der Enzymstruktur könnten ausreichen um eine Verschiebung der Substratspezifität hin zu diesen Glycosiden zu bedingen. Möglicher Weise handelt es sich bei den vermeintlichen Linamarasen also um β -Mannosidasen und β -Galactosidasen.

BGLU 2: eine *H. brasiliensis*-di-Glucosidase?

H. brasiliensis speichert Linamarin nicht nur in den Blättern sondern auch in den Samen. Im Rahmen der Keimung wird diese Stickstoffressource in die Blätter transportiert und dort offenbar metabolisiert. Da der Transport zum Teil apoplastisch erfolgt wird Linamarin zuvor zu Linustatin glucosyliert. Anderenfalls würde eine Hydrolyse durch Linamarase erfolgen (SELMAR et al. 1988). Linustatin könnte in den Blättern von einer di-Glucosidase gespalten und das HCN zur Bildung von β -Cyanoalanin genutzt werden. β -Cyanoalanin könnte dann in Asparagin überführt werden (SELMAR et al. 1988). Di-Glucosidase-Aktivität lässt sich offenbar nur in juvenilen Blattstadien nachweisen (SELMAR 1986). BGLU 2 wird, wie hier gezeigt werden konnte, ausschließlich in jungen Blättern exprimiert (siehe Abbildung 2.3.9). Möglicher Weise handelt es sich bei BGLU 2 also auch um die di-

Glucosidase. Dagegen spricht allerdings, dass die Expression von BGLU 2 im C-Stadium ansteigt, während SELMAR (1986) in Blättern dieses Stadiums keine di-Glucosidase-Aktivität mehr nachweisen konnte.

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

Kapitel 3: Lokalisierung von Linamarase und Hydroxynitrillyase im Blattgewebe

Zusammenfassung

Cyanogene Pflanzen sind befähigt bei Gewebeverletzung Blausäure (HCN) freizusetzen. HCN inhibiert die Atmung und ist aus diesem Grund für die meisten Lebewesen hochgradig toxisch. Daher kann sie als effektives Repellent gegen Herbivore, Pilze und Bakterien fungieren. Auch für die Pflanze ist HCN toxisch. Die Vermeidung einer starken Freisetzung im intakten Gewebe ist daher von höchster Wichtigkeit. Aus diesem Grund sind cyanogene Glycoside und die an ihrer Degradation beteiligten Enzyme in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert. Von *H. brasiliensis* war bisher nur bekannt, dass sich zumindest Teile der β -Glucosidase (BGLU) im Apoplasten befinden. Hier kann erstmalig gezeigt werden, dass BGLU, neben der extrazellulären Lokalisation, vor allem in den Vakuolen phloemassoziierter Zellen gespeichert wird. Hydroxynitrillyase (HNL) hingegen scheint sich vornehmlich im Bereich der unteren Epidermis zu befinden. Sie liegt in Assoziation mit der Plasmamembran vor, wird aber auch in den Vacuolen der Epidermiszellen abgelegt. Beides ist insbesondere unterhalb von Blattadern der Fall. Da die vakuoläre Speicherung von BGLU und HNL offenbar nur in spezialisierten Zellen erfolgt, werden diese als PAZ (phloemassozierte Zellen die BGLU speichern) und PEZ (phloemnahe Epidermiszellen die HNL oder BGLU speichern) definiert. Die vacuoläre Speicherung von BGLU und HNL könnte in Zusammenhang mit der Aktivierbarkeit der beiden Enzyme stehen.

3.1 Einleitung

Die Synthese und Lokalisierung cyanogener Vorstufen

Die Biosynthese cyanogener Glycoside erfolgt in einem Metabolon, wie NIELSEN et al. (2008) für die Bildung von Dhurrin nachweisen konnten. Das Metabolon besteht aus 2 multifunktionalen Cytochromen-P450, einer NADPH-cytochrom-P450-oxidoreduktase sowie UDP-Glycosyltransferase. Im Fall von *Sorghum bicolor* wird die Aminosäure Tyrosin innerhalb des Metabolons zunächst zu p-Hydroxymandelonitril umgewandelt und anschließend sofort glucosyliert, was eine Degradation des instabilen Nitrils verhindert (NIELSEN et al. 2008). Das so entstandene Dhurrin wird anschließend zur Speicherung in die Vakuolen transportiert (SAUNDERS und CONN 1977). Auch für *H. brasiliensis* ist die

vakuoläre Speicherung des Linamarins nachgewiesen (GRUHNERT et al. 1994). Obwohl nur wenige Daten vorliegen wird angenommen, dass - analog zu anderen sekundären Pflanzenstoffen - cyanogene Glycoside im Allgemeinen in den Vakuolen akkumuliert werden (SELMAR, persönliche Mitteilung).

Die Lokalisierung von β -Glucosidase und Hydroxynitrillyase

Bezüglich der Lokalisierung der an der Degradation der cyanogenen Glucoside (CG) beteiligten Enzyme sind große Abweichungen zwischen den verschiedenen, cyanogenen Pflanzen festzustellen. Bei *M. esculenta* ist offenbar sowohl BGLU als auch HNL im Apoplasten des Blattgewebes lokalisiert (McMAHON et al. 1995; WHITE et al. 1998). Die BGLU bzw. Linamarase (LIN) scheint mit der Zellwand assoziiert zu sein (McMAHON et al. 1995). CG (Linamarin) finden sich hingegen in den Vakuolen der Mesophyllzellen. Auf diese Weise wird verhindert, dass die CG im intakten Gewebe mit LIN und HNL in Kontakt kommen und die HCN-Freisetzung beginnt (siehe Abbildung 3.1.1).

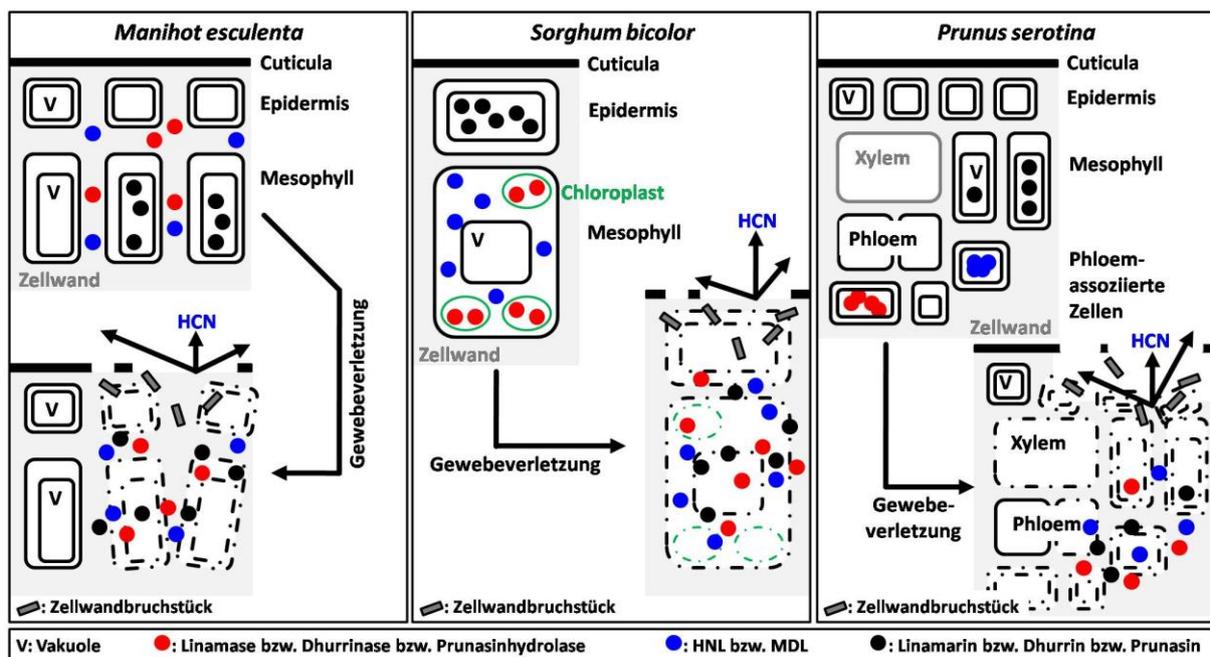


Abbildung 3.1.1: Lokalisierung von CG, BGLU und HNL bzw. MDL im Blattgewebe von *M. esculenta*, *S. bicolor* und *P. serotina* (McMAHON et al. 1995; WHITE et al. 1998; KOJIMA et al. 1979; THAYER und CONN 1981; WAJANT et al. 1994; SWAIN et al. 1992; SWAIN und POULTON 1994)

Bei *M. esculenta* (linker Abschnitt) ist sowohl BGLU als auch HNL apoplastisch lokalisiert. Die CG werden in den Vakuolen der Mesophyllzellen gespeichert. Bei *S. bicolor* (mittlerer Abschnitt) hingegen befinden sich BGLU und HNL in den Zellen des Mesophylls. Während HNL im Cytosol lokalisiert ist, wird BGLU in den Chloroplasten abgelegt. Die CG werden vornehmlich in den Vakuolen der Epidermiszellen gespeichert. *P. serotina* (rechter Abschnitt) hingegen speichert sowohl BGLU als auch MDL in der Vakuole. Allerdings nur im Falle spezialisierter, phloemassoziierten Zellen. Die CG werden in den Vakuolen des Mesophylls abgelegt.

Was *S. bicolor* anbelangt findet sich weder BGLU bzw. Dhurrinase noch HNL im Apoplasten der Blattzellen. Dhurrinase ist in den Chloroplasten des Mesophylls lokalisiert (THAYER und CONN 1981), HNL hingegen im Cytosol (WAJANT et al. 1994). Das CG (Dhurrin) befindet sich nicht in den Vakuolen der Zellen desselben Gewebes. Dhurrin kommt vorwiegend in den Vakuolen der Epidermiszellen vor (KOJIMA et al. 1979) (siehe Abbildung 3.1.1). Auch bei *Prunus serotina* konnte keinerlei BGLU bzw. Prunasinhydrolase (PH) oder Mandelonitrillyase (MDL) im Apoplasten nachgewiesen werden. Hier befinden sich beide Enzyme in den Vakuolen phloemassoziierter Zellen. In den Zellen ist entweder PH oder MDL abgelegt. Die Enzyme finden sich nie gemeinsam in einer Zelle (SWAIN und POULTON 1994). Das CG (Prunasin) ist in den Vakuolen der Mesophyllzellen lokalisiert (SWAIN et al. 1992). Von *H. brasiliensis* ist bekannt, dass sich BGLU-Aktivität sowohl in der Epidermis als auch im Grund- und Leitgewebe nachweisen lässt (SELMAR 1986; VOß 2001). Das Enzym scheint somit nicht ausschließlich in einem bestimmten Zelltyp vorzukommen, wie es bei *S. bicolor* und *P. serotina* der Fall ist. Darüber hinaus stellte SELMAR (1986) fest, dass sich BGLU-Aktivität in der interzellularen Waschlösung befindet. GRUHNERT et al. (1994) konnten zeigen, dass *H. brasiliensis*-Blatt-Protoplasten keinerlei BGLU-Aktivität enthalten. Es ist somit davon auszugehen, dass beim Kautschukbaum, ähnlich wie bei Maniok, BGLU apoplastisch lokalisiert ist. Da beide Pflanzen zur Familie der Euphorbiaceae gehören, wäre eine solche Übereinstimmung nicht überraschend. Zur Lokalisierung von HNL ist, was *H. brasiliensis* anbelangt, nichts bekannt. Kenntnis von der Verteilung beider Enzyme im Gewebe ist für ein detaillierteres Verständnis des cyanogenen Syndroms von großer Wichtigkeit, insbesondere da sie im Falle von *H. brasiliensis* auch zur Klärung des Aktivierungsprozesses beitragen könnte. So ist von BGLU 23 aus *A. thaliana* bekannt, dass das Enzym in inaktiver Form in ER-Bodies (ER: Endoplasmatisches Retikulum) gespeichert wird. Erst bei Verlust der Zellintegrität kommt BGLU 23 mit einer cytosolischen Komponente in Kontakt, die die Aktivierung bewirkt (NAGANO et al. 2005). Aus diesen Gründen stellt sich die Frage, wo LIN und HNL im Falle von *H. brasiliensis* lokalisiert sind und ob die Lokalisierung in Zusammenhang mit der Enzym-Aktivierung stehen könnte.

Somit ergeben sich für dieses Kapitel folgende Fragestellungen und Zielsetzungen:

1. Feststellung der Lokalisierung von LIN und HNL im intakten Blattgewebe von *H. brasiliensis*
2. Feststellung der Lokalisierung von LIN und HNL im mechanisch verletzten Blattgewebe von *H. brasiliensis*
3. Lässt die Lokalisierung der beiden LIN und HNL Rückschlüsse auf den Mechanismus der verletzungsbedingten Enzymaktivierung zu?

3.2 Material und Methoden

Fixierung und Einbettung der *H. brasiliensis* Blattproben

Für die Einbettung wurden Blätter des C-Stadiums, aus der Übergangsphase zwischen C- und D-Stadium sowie Blätter des D-Stadiums verwendet. Als Fixierlösung diente Phosphatpuffer mit einer Konzentration von $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ und einem pH Wert von 6,4, der 4 % Formaldehyd enthielt. Aus der zu beprobenden Blattspreite wurde zunächst eine etwa 3 mal 3 cm große Fläche herausgeschnitten und in die Fixierlösung überführt. Anschließend wurden von jedem der Ränder circa 5 mm des Gewebes entfernt. Ein Teil des verbleibenden Blattgewebes wurde daraufhin in 2 x 3 mm große Stücke geschnitten. Diese wurden in ein Falcontube® überführt, in dem 15 ml Fixierlösung vorgegeben waren. Die Proben wurden bei 4 °C über Nacht fixiert. Blattstückchen, die nach dieser Inkubation nicht auf den Gefäßboden gesunken waren, wurden durch kurzes Anlegen eines Vakuums infiltriert, bis auch sie absanken. Anschließend wurden sie für weitere 6 Stunden bei 4 °C fixiert. Neben intaktem Blattgewebe wurde auch mittels Präpariernadel verletztes für die Fixierung verwendet.

Waren die Proben für die elektronenmikroskopische Betrachtung gedacht, so wurden sie vor der Entwässerung für 2 Stunden und bei 4 °C in 1 %iger Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert. Proben die für eine Detektion hydrophober Substanzen verwendet werden sollten wurden nicht entwässert, sondern im Anschluss an die Fixierung sofort in Low-Melting-Agarose eingebettet. Hierzu wurden 2,5 g der Agarose in Phosphatpuffer (s.o.) erhitzt. Anschließend wurde die zähflüssige Lösung in eine Petrischale überführt und auf 35 °C abgekühlt. Nach Erreichen der Temperatur wurden die fixierten Blattstücke mittels Pinzette in die Agaroselösung eingebracht, so dass sie in etwa mittig zu liegen kamen. Die Petrischalen wurden zum Abkühlen bei 4 °C im Kühlschrank belassen.

Bei allen anderen Proben erfolgte nach Abschluss der Fixierung eine Entwässerung in Ethanol. Dabei wurde mit einer Ethanolmenge von 30 % begonnen. Sie wurde schrittweise alle 30 Minuten um 10 Prozentpunkte erhöht, bis die Ethanolmenge 100 % betrug. Es folgte eine 2-stündige Inkubation in 50 % Ethanol 50 % LR-White Resin (Plano®). Daraufhin wurden die Proben über Nacht in 100 % LR-White Resin belassen. Alle Entwässerungsschritte und die Inkubationen mit LR-White erfolgten bei 4 °C.

Nach Abschluss der LR-White-Inkubation wurden die Blattstücke einzeln in Cellulosekapseln überführt, in denen frisches LR-White vorgegeben war. Die Kapseln wurden für 24 Stunden zum Aushärten bei 60 °C in den Vakuumschrank gestellt.

Schneiden der Blattproben

Um die eingebetteten Proben auf das Schneiden vorzubereiten wurde zunächst die Cellulosekapsel entfernt. Anschließend wurde das Resin um die Probe herum angespitzt, so dass diese nur noch von einer möglichst dünnen Schicht umgeben war. Unter Verwendung eines Mikrotoms der Firma

Reichert (Reichert UltraCut®) wurden Schnitte mit einer Dicke von 1 µm angefertigt. Als Klinge diente ein Glasmesser. Die Schnitte wurden zunächst auf einer Wasseroberfläche aufgenommen und anschließend, mittels Pinsel, auf einen unterteilten Objektträger überführt. Um das Überführen der Schnitte zu vereinfachen war auf den Segmenten des Objektträgers je ein Tropfen Wasser vorgegeben. Nachdem der Objektträger mit Schnitten bestückt war, wurde das Wasser auf einer Heizplatte verdampft. Dies bewirkte außerdem ein Festsetzen der Schnitte auf der Glasoberfläche. Für das Anfertigen von Schnitten mit einer Dicke von 2 µm wurde ein anderes Mikrotommodell der Firma Reichert verwendet (Reichert AutoCut®). Ansonsten wurde identisch verfahren.

Waren die Schnitte für eine elektronenmikroskopische Betrachtung vorgesehen, wurde anstelle des Glasmessers ein Diamantmesser verwendet. Die Dicke der Schnitte betrug 80 nm. Sie wurden zunächst auf einer Wasseroberfläche aufgenommen und anschließend mit einem Pinsel zusammengesoben. Befand sich eine ausreichend große Anzahl von Schnitten auf der Wasseroberfläche, wurden sie auf ein Nickegrid überführt, indem dieses kurz auf die Schnitte gedrückt wurde.

Für das Schneiden der in Agarose eingebetteten Proben wurde eine Vibratom verwendet. Zunächst wurde die Agarose in kleine Blöcke zerschnitten, so dass sich in jedem der Blöcke ein Blattstück befand. Die Blöcke wurden unter Verwendung von Sekundenkleber auf den Probenhaltern befestigt. Vor dem Schneiden, das mit Hilfe einer Rasierklinge erfolgte, wurde die Vibratomkammer in der sich Probe und Rasierklinge befanden, mit destilliertem Wasser befüllt. Hierdurch konnten die Schnitte direkt in Wasser aufgenommen werden. Anschließend erfolgte, mit Hilfe von Pipette und Pinsel, eine Überführung der Schnitte in Eppendorf®-Tubes, in denen je 500 µl Phosphatpuffer (s.o.) vorgegeben waren. Die Tubes wurden bis zur Weiterbearbeitung der Proben auf Eis gekühlt.

Toluidinfärbung

Für eine lichtmikroskopische Betrachtung wurden Objektträger, auf denen sich Schnitte mit einer Dicke von 1 bis 2 µm befanden, über Nacht in Toluidinlösung gestellt. Überschüssige Färbelösung wurde unter fließendem Wasser abgewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 15 Minuten in destilliertes Wasser gestellt. Nach Abschluss dieses Waschschruttes wurde soviel Wasser auf dem Objektträger belassen, das die Schnitte benetzt waren. Die Segmente des Objektträgers wurden mit einem Deckgläschen verschlossen und die Proben sofort am Lichtmikroskop ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der integrierten Digitalkamera.

Immunofluoreszenzmarkierung von BGLU, HNL und *Hev b 1*

Für die Immunofluoreszenzmarkierung wurden Schnitte mit einer Dicke von 1 bis 2 μm verwendet. Auf die einzelnen Segmente der Objektträger wurden zunächst 50 μl eines 10 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ PBS-Puffers (Phosphate Buffered Saline Solution; pH 7,0) gegeben, der 2,5 % BSA und 0,5 % BSA-C enthielt. Zur Blockierung proteinbindender Komponenten wurden die Schnitte 1 Stunde bei Raumtemperatur (Rt) in dieser Lösung belassen. In der Zwischenzeit wurden die jeweiligen Antikörper (AK) in Blockierlösung verdünnt. Bezüglich des BGLU-spezifischen AKs war eine 1 zu 100 Verdünnung erforderlich. Der HNL-AK wurde 1 zu 500 verdünnt. Bei II4F9 (*Hev b 1*-AK) wurden Verdünnungen von 1 zu 100, 1 zu 200 und 1 zu 500 gewählt. Nach Ablauf der Stunde wurden 50 μl der jeweiligen AK-Lösung auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation mit dem primären AK erfolgte für 2 Stunden bei Rt. Anschließend wurden die Schnitte 4-mal für jeweils 10 Minuten mit Blockierlösung gewaschen. Als sekundärer AK wurden FITC-Konjugate verwendet (s.u.). Diese wurden 1 zu 80 (Anti Hase) bzw. 1 zu 120 (Anti Maus) in Blockierlösung verdünnt. Jeweils 50 μl wurde daraufhin auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Rt im Dunkeln. Dann wurden die Schnitte für 4-mal 10 Minuten mit Blockierlösung gewaschen. Es folgte ein einzelner 10 minütiger Waschschrift in PBS-Puffer ohne BSA und eine 5 minütige Inkubation in 1 zu 10 verdünnter Toluidinlösung. Abschließend wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit PBS Puffer gespült und mit CitiFluor-Lösung benetzt. Die Segmente der Objektträger wurden mit Deckgläschen verschlossen und die Proben sofort am Fluoreszenzmikroskop bzw. am Konfokal-Lasermikroskop ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der integrierten Digitalkameras.

Die Kontrollen wurden identisch behandelt, mit dem Unterschied, dass nur der zweite oder kein AK appliziert wurde.

Goldmarkierung von LIN

Für die Goldmarkierung wurden Schnitte mit einer Dicke von 80 nm verwendet. Wie auch bei der Immunofluoreszenzmarkierung wurden zunächst proteinbindende Komponenten der Schnitte blockiert. Hierzu wurden je 50 μl der Blockierlösung (s.o.) auf einen Streifen Parafilm® pipettiert und die Nickelgrids mit der Seite auf der sich die Schnitte befanden auf die Tropfen gelegt. Sie wurden für 1 Stunde bei Rt auf der Blockierlösung belassen. Der BGLU-spezifische AK wurde 1 zu 100 verdünnt. Von der AK Lösung wurden ebenfalls je 50 μl auf den Parafilmstreifen pipettiert und die Nickelgrids auf den neuen Tropfen platziert. Die Inkubationszeit auf der AK-Lösung betrug 2 Stunden bei Rt. Danach wurden die Schnitte 4-mal für 10 Minuten in je 50 μl Blockierlösung gewaschen. Der sekundäre AK (s.u.) war mit Goldpartikeln von 10 μm Durchmesser konjugiert. Er wurde für den Gebrauch 1 zu 60 in Blockierlösung verdünnt. Die Nickelgrids mit den Schnitten wurden für 1 Stunde

auf die AK-Lösung gelegt. Anschließend folgten 4 Waschschritte von jeweils 10 Minuten Länge in Blockierlösung. Zum Schluss wurde 1-mal mit PBS-Puffer gewaschen.

Für die Nachkontrastierung wurden die Proben zunächst für 5 Minuten in Uranylacetatlösung inkubiert. Nach kurzem Abspülen wurden sie für ebenfalls 5 Minuten in Bleicitratlösung überführt. Nach kurzem Waschen war die Nachkontrastierung abgeschlossen und die Schnitte wurden sofort am Elektronenmikroskop ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der integrierten Digitalkamera.

Die Kontrollen wurden identisch behandelt, mit dem Unterschied, dass nur der zweite oder kein AK appliziert wurde.

Oil-Red-O-Färbung hydrophober Substanzen

Für die Markierung von Latexgefäßen wurde eine Färbung mittels Oil-Red-O gewählt. Verwendet wurden ausschließlich Schnitte von nicht entwässerten Proben, da während der Inkubation in Ethanol große Teile der hydrophoben Substanzen verloren gehen können. Zunächst wurde die Oil-Red-O Färbelösung angesetzt. Hierzu wurden 0,05g Oil-Red-O in 10 ml Ethylenglycol aufgenommen. Die Lösung wurde auf 95 °C erhitzt und über einen Papierfilter (Porengröße 25 µm) gegeben. Anschließend wurde sie über Nacht bei RT stehen gelassen.

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in reines Ethylenglycol überführt, um eine Vermischung des Oil-Red-O mit Wasser zu vermeiden. Danach wurden sie für 2,5 Stunden bei Rt in der Oil-Red-O-Lösung inkubiert. Abschließend wurden sie zur Differenzierung für 10 Minuten in 85%igem Ethylenglycol belassen und zweimal mit destilliertem Wasser gespült.

Die gefärbten Präparate wurden auf Objektträger überführt, auf denen einigen Tropfen Wasser vorgegeben waren und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurden die Schnitte sofort am Lichtmikroskop ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der integrierten Digitalkamera.

GFP-Markierung von HNL (Erstellung eines GFP-Vektors mit *Sfi*-Schnittstellen)

Für die GFP-Markierung von HNL wurde der modifizierte pMon30049 Vektor GFP2 (HERRMANN et al. 2006) verwendet. Die Modifikation besteht in einer Verkürzung des GFPs um 6 Aminosäuren (AS), was die Fluoreszenz des Proteins nicht beeinträchtigt, aber die Wahrscheinlichkeit einer ER-Retention stark verringert. GFP2 verfügt über drei Schnittstellen an denen die gewünschte Sequenz eingefügt werden kann. Eine *Bam*HI-, eine *Bcl*I- und eine *Nco*I-Schnittstelle. Um die Auswahl der Restriktionsenzyme zu erweitern und um ein gerichtetes Klonieren zu ermöglichen wurden zwei *Sfi*-Schnittstellen in den GFP2 eingefügt. *Sfi*-Schnittstellen sind sehr selten, weshalb sie den Vorteil haben, dass anschließend praktisch jede Sequenz in den Vektor eingesetzt werden kann. Darüber

hinaus erzeugt *Sfi*, in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der jeweiligen Schnittstelle, unterschiedliche Überhänge, so dass ein gerichtetes Klonieren möglich ist. Für das Einfügen der Schnittstellen wurden Primer bestellt (Metabion®), die zwei unterschiedliche Zielsequenzen von *Sfi* beinhalten (s.u.) und eine 5'-Phosphorylierung aufwiesen. Die Primer waren, bis auf einen *BamHI*-Überhang, komplementär, so dass sie sich bei Vermischen zu einem doppelsträngigen Insert zusammenlagerten.

Ein Aliquot (0,5 µg) des GFP2 Vektors (zur Verfügung gestellt von Herrn Lorbiecke) wurde zunächst mit Fast®-*BamHI* (Fermentas®) verdaut und parallel mittels Fast®-AP (Fermentas®) dephosphoryliert. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers entsprechend verfahren. Zur Entfernung der Enzyme und der Puffersalze wurde der geschnittene und dephosphorylierte Vektor mittels SureClean® gefällt (siehe Manual Bioline SureClean®) und in 25 µl sterilen MilliQ®-Wassers wieder aufgenommen. Zur Kontrolle des Verdau wurde ein Aliquot auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2; Daten nicht gezeigt). Der geschnittene Vektor wurde im Verhältnis von 1 zu 2 mit dem doppelsträngigen *Sfi*-Insert vermischt und für 2 Stunden bei Rt mit T4-DNA-Ligase (Fermentas®) inkubiert. Dabei wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Anschließend wurden 2,5 µl des Ligationansatzes direkt für die Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen verwendet (XL1Blue tetracyclinresistent; DNA Cloning Service®; bezüglich der Transformation siehe Kapitel 2). Die Transformanten wurden mittels PCR-Screening (siehe Kapitel 2) auf die Orientierung des Inserts kontrolliert (Daten nicht gezeigt). 5 Transformanten mit gewünschter Orientierung wurden für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Zunächst wurden von diesen Über-Nacht-Kulturen (ÜNK; siehe Kapitel 2) angesetzt und die Plasmide mittels Axygen MiniPrep Kit® isoliert. Dabei wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Aliquots wurden, zwecks Kontrolle der neuen Schnittstellen, zum Sequenzieren gegeben (DNA Cloning Service®). Die Schnittstellen wiesen bei keinem der Plasmide Fehler auf (Daten nicht gezeigt). Der so erhaltene GFP Vektor wurde GFP-*Sfi* genannt.

Für die Klonierung in GFP-*Sfi* wurden die Sequenzabschnitte von HNL zunächst mittels PCR (Long Distance PCR) aus *Hevea*-ds-cDNA (siehe Kapitel 2) amplifiziert. Dabei wurde den Angaben des Herstellers Clontech® entsprechend verfahren. Die verwendeten Primer wiesen einen Überhang auf, der die entsprechenden *Sfi*-Schnittstellen beinhaltete (siehe Anhang Seite 174). Zur Kontrolle der PCR wurden Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2). In der Zwischenzeit wurden Teile der Ansätze mit *Sfi* (Fermentas®) verdaut. Parallel erfolgte auch der *Sfi*-Verdau (Fermentas®) des Vektors sowie dessen Dephosphorylierung mittels Fast® AP. Bei allen Reaktionsansätzen wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren. Nach abgeschlossener Inkubation wurden Enzyme, Puffersalze und Basenoligomere durch Fällung mittels SureClean® entfernt (siehe Manual Bioline SureClean®). Die DNA Pellets wurden in 10 bis 25 µl MilliQ®-Wasser aufgenommen. Bezüglich des

DNA-Gehalts der Proben wurde von der im Verdau eingesetzten Menge ausgegangen. Vektor und HNL-Insert wurden in einem Verhältnis von 1 zu 2 gemischt und mit T4-DNA-Ligase über Nacht (ÜN) bei 16 °C auf dem Schüttler (Eppendorf® Thermo Mixer) inkubiert (siehe Manual Fermentas® T4-DNA-Ligase). Die Ansätze wurden direkt für die Transformation von XL1Blue-Zellen (DNA Cloning Service®; siehe Kapitel 2) verwendet. Zur Kontrolle wurden die Transformanten mittels PCR-Screening (siehe Kapitel 2) auf das Insert und die Insertorientierung überprüft. Alle Transformanten wiesen ein Insert in der korrekten Orientierung auf (Daten nicht gezeigt). Von 5 der Transformanten wurden ÜNK (siehe Kapitel 2) angesetzt und die Plasmide mittels Avegen MiniPrep Kit isoliert (siehe Manual Avegen MiniPrep Kit®). Aliquots wurden, zwecks der Sequenzkontrolle der Inserts zum Sequenzieren gegeben (DNA Cloning Service®). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes ORF-Finder in eine AS-Abfolge übersetzt. Es zeigte sich, dass das HNL-Insert in drei Positionen von der bei NCBI gespeicherten Sequenz abwich. Da diese weder in der Nähe des N-Terminus, noch im Bereich des aktiven Zentrums lagen (Daten nicht gezeigt), wurden die Plasmide für die ballistische Transformation von *Allium cepa*-Epidermiszellen verwendet. Hierzu war zunächst eine Fällung des Plasmids auf Goldpartikel erforderlich. 1 µg Plasmid DNA wurde in einem 1,5 ml Eppendorf®-TUBE mit 8,3 µl einer Goldpartikelsuspension (40 mg * ml⁻¹ in sterilem MilliQ® Wasser; Größe 0,5 µm) vermischt und anschließend auf Eis gestellt. Im Deckel des Tubes wurden 8,3 µl Calciumchloridlösung (2,5 mol * l⁻¹) mit 3,3 µl Spermidinlösung (0,1 mol * l⁻¹) zügig gemischt und anschließend zu Plasmid und Goldpartikeln gegeben. Nachdem 1 Minute auf dem Vortex wurden die Goldpartikel für 30 Sekunden mit 3.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch Aufnehmen in Ethanol (50 µl) und erneutes Zentrifugieren gewaschen. Abschließend wurden die Goldpartikel in 26 µl Ethanol aufgenommen.

Von den Frühlingszwiebeln wurde im Bereich der Blattbasis ein circa 1 cm langes Stück abgeschnitten und halbiert. Die innersten Blattlagen wurden entfernt, so dass die zu beschießende Fläche knapp 1 x 0,8 cm betrug. Die Abschnitte wurden sofort in einer verschließbaren Box auf angefeuchtetem Filterpapier platziert.

Je 20 µl der Goldpartikelsuspension wurden in zwei Schritten auf einen Macrocarrier (Bio Rad®) aufgetragen. Nachdem das Ethanol vollständig verdampft war, wurde der Macrocarrier in die Partikelkanone (Bio Rad® PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System) eingebracht (Schiene 2). Die Zwiebelpräparate wurden für den Beschuss auf 0,5 % Wasseragar gelegt und auf Schiene 4 in die Partikelkanone gestellt. Die Transformation erfolgte mit einem Druck von 3.000 psi und einem Vakuum von 28 inch Hg. Anschließend wurden die Zwiebelpräparate sofort zurück auf das Filterpapier gelegt und für 25 Stunden bei Rt im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Epidermis vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen und auf einen Objektträger überführt,

auf dem einige Tropfen sterilen MilliQ®-Wassers vorgegeben waren. Anschließend erfolgte eine sofortige Analyse und Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop (Olympus).

Probenauswertung und Dokumentationen am Licht- am Fluoreszenz- und am Konfokal-Laser-Mikroskop

Für die Probenauswertung und Dokumentation wurden die folgenden Mikroskope mit integrierten Digitalkamerasystemen genutzt:

1. Lichtmikroskop Olympus BH-2 mit integrierter Digitalkamera Olympus ColorView (Soft Imaging System); Kamera computergesteuert, Programm AnalySIS; Filterkombination FITC und GFP: BGB + EY 455 + Y 495
2. Konfokal-Lasermikroskop Leica TCS 4D, Dokumentation mittels Leica ScanWare
3. Elektronenmikroskop LEO 906E Zeiss, Kamera Gatan MultiScan, Dokumentation mittels Digital Micrograph 3.4.4

Verwendete Antikörper

Der LIN-spezifische Antikörper (AK) wurde freundlicher Weise von Herrn Selmar von der Technischen Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt.

Die Herstellung des *H. brasiliensis*-HNL-spezifischen AKs wurde bei der Firma GenScript in Auftrag gegeben. Für die Immunisierung der Kaninchen wurde heterolog exprimierte *H. brasiliensis*-HNL (*Pichia pastoris*) verwendet. Das heterolog exprimierte Protein wurde freundlicher Weise von Herrn Maier von der Technischen Universität Harburg zur Verfügung gestellt.

Der Latexallergen *Hev b 1*-spezifische AK II4F9 wurde freundlicher Weise von Frau Raulf-Heimesoth von der Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

Die Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobulin-spezifischen, FITC-konjugierten AKs, wurden bei der Firma Sigma Aldrich® bestellt.

Vorhersage der subzellulären Lokalisation

Die Vorhersage der subzellulären Lokalisation erfolgte auf Basis der Aminosäure-Sequenz unter Verwendung der Programme MultiLoc (www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/), Targetp (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) und TargetLoc (www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/).

3.3 Ergebnisse

Vorhersage der subzellulären Lokalisation von LIN und HNL

Eine Sequenzierung von *H. brasiliensis*-HNL-cDNA wurde von HASSLACHER et al. (1996) durchgeführt. Die Sequenz der cDNA und damit auch des Proteins ist unter der Accession-Nummer U40402 in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) gespeichert. Eine LIN-cDNA wurde im Rahmen der Arbeiten zum 2. Kapitel sequenziert und mit Hilfe des Programmes ORF-Finder in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Die Verfügbarkeit beider Sequenzen ermöglichte es vorab, mittels entsprechender Vorhersageprogramme, die mögliche Lokalisierung der Enzyme zu prüfen. Genutzt wurden hierfür die Programme Multiloc, Targetp und TargetLoc. Die Ergebnisse zeigen, dass bezüglich beider Enzyme eine apoplastische Lokalisation am wahrscheinlichsten ist. HNL wird von allen drei Programmen als sekretorisches Protein eingeordnet. Der Score liegt zwischen 0,48 (Targetp) und 0,86 (TargetLoc). Bereits die Platz-2-Lokalisierungen werden als entsprechend unwahrscheinlich eingestuft. Der Score liegt zwischen 0,09 (TargetLoc) und 0,26 (Targetp). Darüber hinaus sagt, was die Platz-2-Lokalisierung anbelangt, lediglich MultiLoc eine Kompartiment, nämlich das endoplasmatische Retikulum (ER), vorher. Targetp und TargetLoc geben lediglich die Zuordnung „Anderes Kompartiment“ an (siehe Tabelle 3.3.1).

Bei LIN sind die Vorhersagen ähnlich. TargetLoc und Targetp stufen LIN als sekretorisches Protein ein. Der Score beträgt 0,88 (TargetLoc) und 0,99 (Targetp). Multiloc gibt neben dem Golgi Apparat mit einem Score von 0,55 die Vakuole als Zielkompartiment an. Der Score beträgt 0,41 (siehe Abbildung 3.3.1). Nichts desto trotz scheint auch was LIN anbelangt eine apoplastische Lokalisation am wahrscheinlichsten.

Tabelle 3.3.1: Lokalisierungsvorhersage für LIN und HNL aus *H. brasiliensis*-Blättern

Die Lokalisierungsvorhersagen erfolgten auf Basis der Aminosäuresequenzen. Die Sequenzdaten der HNL sind unter der Accession Nummer U40402 in der Datenbank des NCBI zu finden. Eine LIN-cDNA wurde im Rahmen der Arbeiten zum zweiten Kapitel sequenziert. Für die Lokalisierungsvorhersagen wurden die Programme Multiloc, Targetp und TargetLoc genutzt.

Programm	Enzym	Lokalisierung 1	Score	Lokalisierung 2	Score
Multiloc	LIN	Golgi Apparat	0,55	Vakuole	0,41
Targetp	LIN	Apoplast	0,99	Anderes Kompartiment	0,03
TargetLoc	LIN	Apoplast	0,88	Chloroplast	0,10
Multiloc	HNL	Apoplast	0,71	Endoplasmatisches Retikulum	0,16
Targetp	HNL	Apoplast	0,48	Anderes Kompartiment	0,26
TargetLoc	HNL	Apoplast	0,86	Anderes Kompartiment	0,09

Immunofluoreszenz- und Immunogoldmarkierung von LIN

Für die Immunofluoreszenzmarkierung wurden Stücke von C-Stadien-Blättern in LR-White eingebettet und Schnitte mit einer Dicke von 1 bis 2 μm angefertigt. Zur Detektion der LIN wurde der von SELMAR (1986) hergestellte Antikörper (AK) genutzt. Der sekundäre AK war mit FITC konjugiert. Das Fluoreszenzsignal zeigt eindeutig, dass LIN im Apoplasten der Blätter von *H. brasiliensis* vorkommt. Darüber hinaus kann festgestellt werden, dass dies sowohl für die Epidermis, als auch für Palisaden- und Schwammparenchym gilt (siehe Abbildung 3.3.1 B). Der Befund stimmt mit den Ergebnissen von SELMAR (1986) überein, der BGLU-Aktivität in der interzellulären Waschlösung sowie in allen Zelllagen von *H. brasiliensis* Blättern nachwies.

Neben der Fluoreszenzmarkierung erfolgte auch eine Immunogoldmarkierung. Auch hier kann, wie nach den Ergebnissen der Fluoreszenzmarkierung zu erwarten, eine apoplastische Lokalisierung der LIN festgestellt werden. Die Verteilung der Goldpartikel entlang der Plasmamembran wirft die Frage auf, ob nicht zumindest Teile der LIN mit dieser assoziiert sind (siehe Abbildung 3.3.1 C).

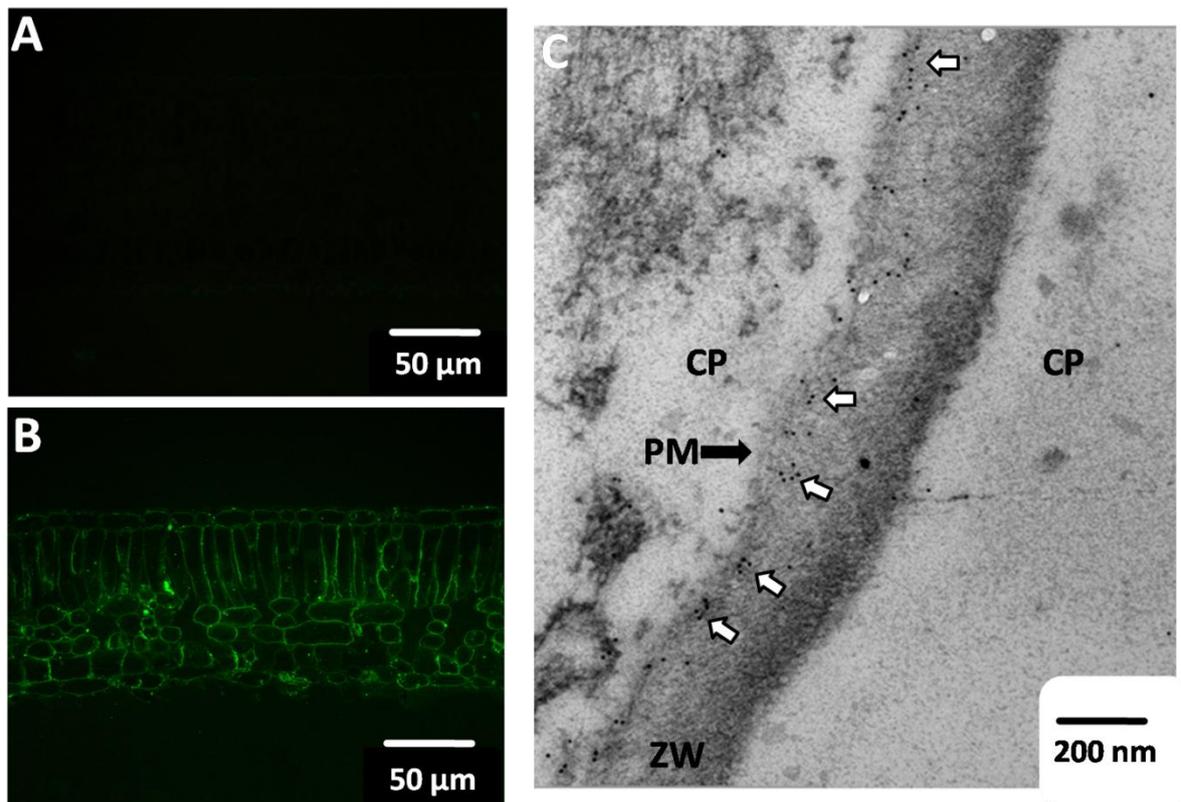


Abbildung 3.3.1: Immunofluoreszenz- und Immunogoldmarkierung von LIN im Blattgewebe von *H. brasiliensis*

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des späten C-Stadiums verwendet. Für die LIN-Detektion wurde der von SELMAR (1986) hergestellte Antikörper genutzt. LIN ist im Apoplasten aller Gewebe der untersuchten Blätter lokalisiert.

A. Immunofluoreszenz-Kontrolle; **B.** Immunofluoreszenzdetektion von LIN; **C.** Immunogold-Detektion von LIN; CP: Cytoplasma; PM: Plasmamembran; ZW: Zellwand; Die Position einiger Goldpartikel ist durch weiße Pfeile mit schwarzem Rand markiert.

Darüber hinaus findet sich, wie Immunofluoreszenz- und Immunogoldmarkierung zeigen, eine größere Menge an LIN auch in der Vakuole (siehe Abbildung 3.3.2 I und II). Dies gilt jedoch ausschließlich für phloemassoziierte Zellen. Diese finden sich sowohl im zentralen Leitbündel (Teil II, F und H), als auch in kleineren Leitbündeln (Teil I, D) und feinsten Blattadern (Teil I, B). Eine Lokalisation dieser Art ist auch für Prunasinhydrolase (PH) aus *P. serotina* Blättern beschrieben (SWAIN und POULTON 1994).

Darüber hinaus finden sich kleinere Einschlüsse von BGLU auch in den Vakuolen der oberen Epidermis. Allerdings nur, wenn sich die Epidermiszellen in Leitbündelnähe befinden (Teil I, B).

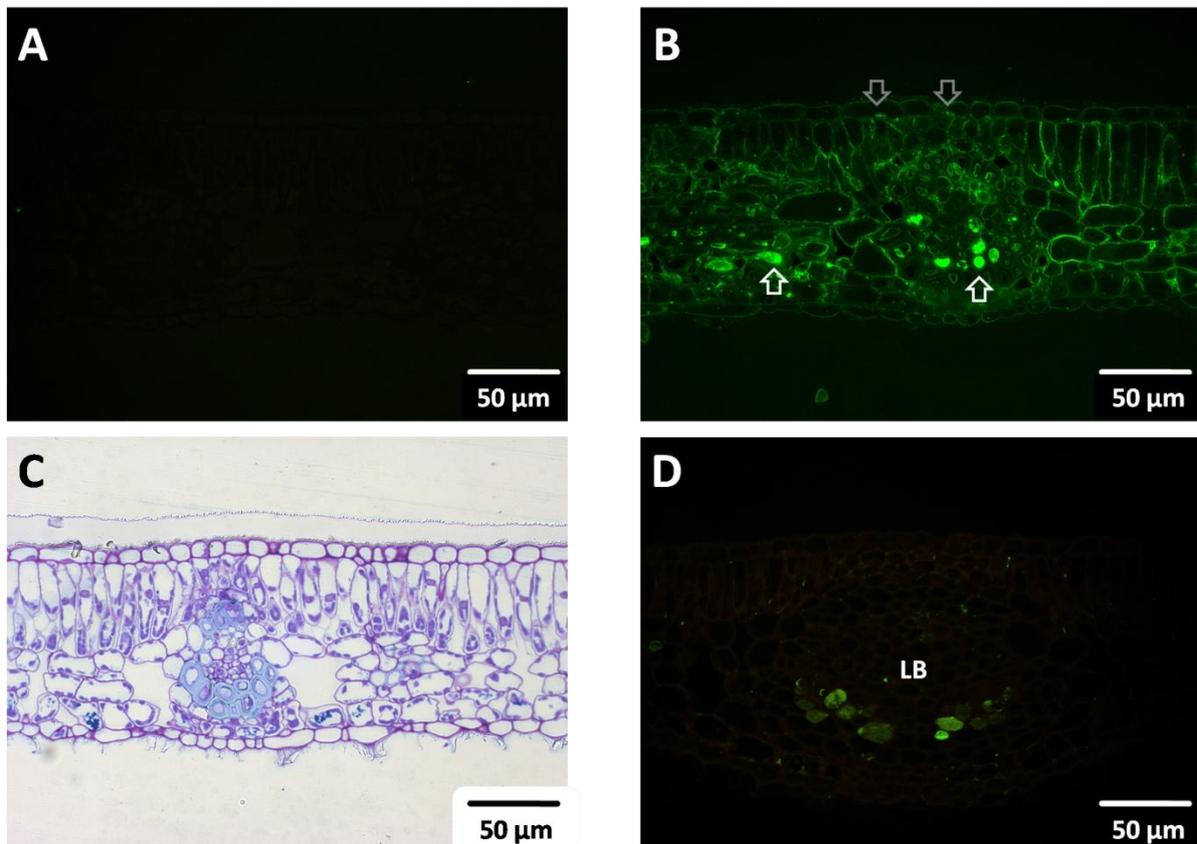


Abbildung 3.3.2 I: Vakuoläre Lokalisation von *H. brasiliensis*-LIN in phloemassoziierten Zellen

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des C-Stadiums verwendet. Für die LIN-Detektion wurde der von SELMAR (1986) hergestellte Antikörper genutzt. LIN ist offenbar nicht nur im Apoplasten, sondern darüber hinaus auch in den Vakuolen phloemassoziierten Zellen lokalisiert.

A. Kontrolle; **B.** Blattquerschnitt im Bereich kleinster Leitbündel; Die Pfeile markieren vakuoläre LIN-Einschlüsse (weiße Pfeile für phloemassoziierte Zellen, graue Pfeile für Zellen der oberen Epidermis); **C.** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Blattquerschnittes mit kleinem Leitbündel; **D.** Blattquerschnitt im Bereich eines Leitbündels mittlerer Größe. Die Bezeichnung LB markiert das Leitbündel.

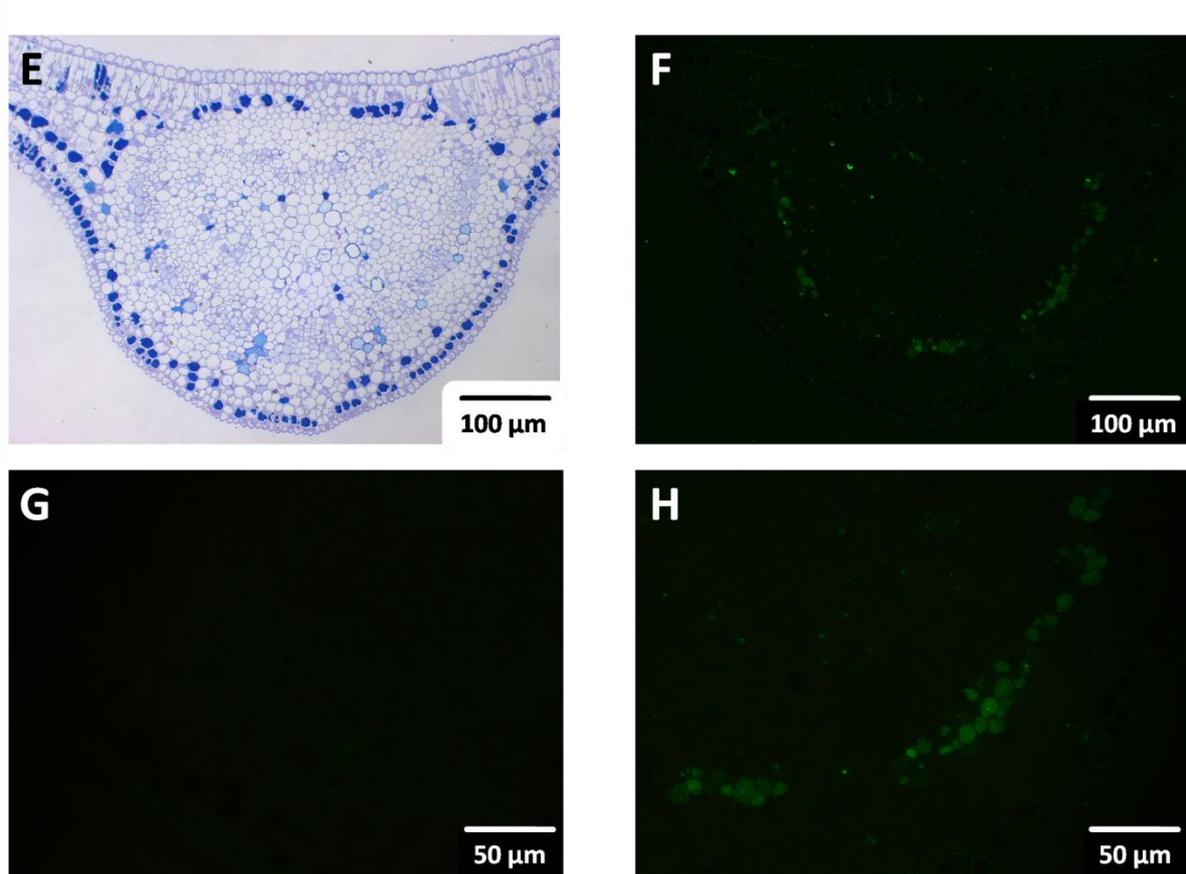


Abbildung 3.3.2 II: Vakuoläre Lokalisation von *H. brasiliensis*-LIN in phloemassoziierten Zellen

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des C-Stadiums verwendet. Für die LIN-Detektion wurde der von SELMAR (1986) hergestellte Antikörper genutzt. LIN ist offenbar nicht nur im Apoplasten, sondern darüber hinaus auch in den Vakuolen phloemassoziierten Zellen lokalisiert.

E. Lichtmikroskopische Aufnahme des zentralen Leitbündels; Der Inhalt der blau gefärbten Vakuolen ist nicht eindeutig zuzuordnen. Möglicher Weise handelt es sich um phenolische Substanzen. **F.** Querschnitt im Bereich des zentralen Leitbündels; **G.** Kontrolle; **H.** Ausschnitt des zentralen Leitbündels

Wie zu erwarten finden sich in den phloemassoziierten Zellen, deren Vakuole LIN beinhaltet, auch Goldpartikel (siehe Abbildung 3.3.3). Zum Teil sind die Vakuolen gleichmäßig mit Goldpartikeln gefüllt (siehe A, B und C), zum Teil finden sich lediglich kleinere Akkumulationen in der Nähe der Vakuolenmembran (D und E). In jedem Fall weisen die Bereiche, in denen sich offensichtlich LIN befindet immer auch eine Substanz auf, deren Elektronendichte höher ist als die der Umgebung (C und E). Selbiges wurde auch im Rahmen der Untersuchungen an *P. serotina*-Blättern festgestellt (SWAIN und POULTON 1994). Worum es sich bei dieser Substanz handelt ist nicht bekannt.

Phloemassoziierte Zellen, die LIN in ihrer Vakuole speichern sollen im Folgenden kurz als PAZ bezeichnet werden.

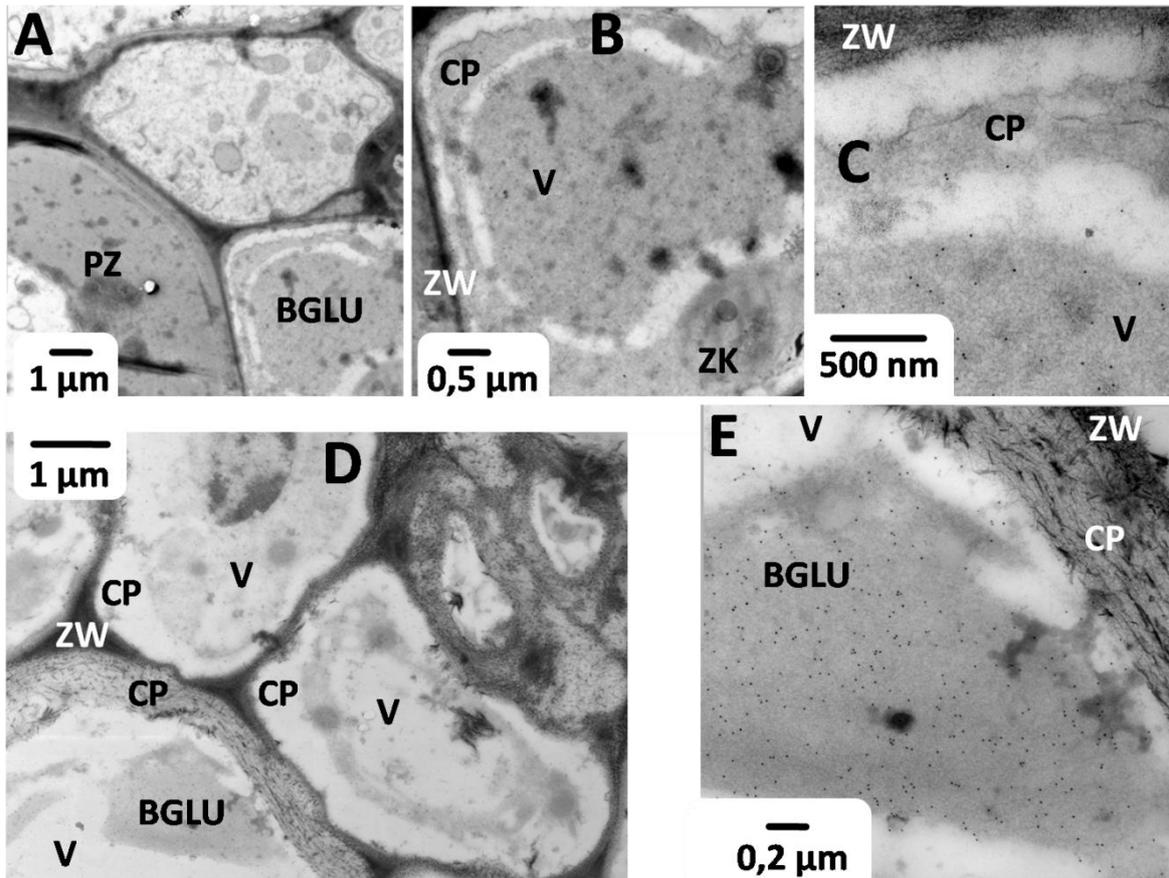


Abbildung 3.3.3: Vakuoläre Lokalisation von *H. brasiliensis*-LIN in Phloem assoziierten Zellen

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des späten C-Stadiums verwendet. Für die LIN-Detektion wurde der von SELMAR (1986) hergestellte Antikörper genutzt. LIN ist in den Vakuolen phloemassoziierter Zellen lokalisiert.

A. Übersicht des Phloembereiches in dem sich eine LIN-speichernde Zelle befindet. Die Vakuole der Zelle ist zur Gänze mit LIN gefüllt. **B.** Detailaufnahme der LIN-speichernden Zelle. **C.** Ausschnitt der LIN-speichernden Zelle. Die Goldpartikel finden sich vornehmlich im Bereich der Vakuole. **D.** Übersicht des Phloembereiches in dem sich eine LIN-speichernde Zelle befindet. Auffällig ist, dass nicht die gesamte Vakuole mit LIN gefüllt zu sein scheint. Es finden sich lediglich Ablagerungen im Randbereich. **E.** Ausschnitt der LIN-speichernden Zelle. Die Goldpartikel finden sich fast ausschließlich in diskreten Randbereichen der Vakuole. CP: Cytoplasma; PZ: Phloemzelle; V: Vakuole; ZW: Zellwand

Detektion von Latexgefäßen

H. brasiliensis verfügt über Latexgefäße, auch in den Blättern. Diese leiten sich von Phloemzellen ab. Im Falle von *M. esculenta* wurde in diesen Linamarase nachgewiesen (PANCORO und HUGHES 1992). Denkbar wäre daher, dass es sich bei den Zellen, die LIN enthalten, um Latexgefäße handelt. Um dies zu prüfen wurden Blattquerschnitte mit einer Dicke von 30 µm angefertigt. Die Proben wurden vor dem Schneiden nicht entwässert, um einen Verlust hydrophober Substanzen zu vermeiden. Die Schnitte wurden in Oil-Red-O-Färbelösung inkubiert, was eine rötliche Färbung lipophiler

Zellbestandteile zur Folge hat. Parallel wurden Proben für die Immunfluoreszenz-markierung des Latexallergens Hev b 1 vorbereitet.

Die Inkubation in Oil-Red-O-Färbelösung führt zu einer deutlichen Markierung der Cuticula und der Zellwand der oberen Epidermis. Im Bereich der kleineren Leitbündel konnten keine Zellen gefunden werden, die lipophile Substanzen enthielten (siehe Abbildung 3.3.4 A und B). Bei Verwendung des Hev b 1-spezifischen AK ließ sich keinerlei Fluoreszenzmarkierung feststellen (siehe Abbildung 3.3.4 D). Die Zellen, die LIN enthalten, scheinen somit keinen Latex zu führen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass CHOW et al. (2007), bei der Sequenzierung eines Latex-Transkriptoms, keine LIN-Sequenzen unter den Transkripten mit hoher Frequenz fanden.

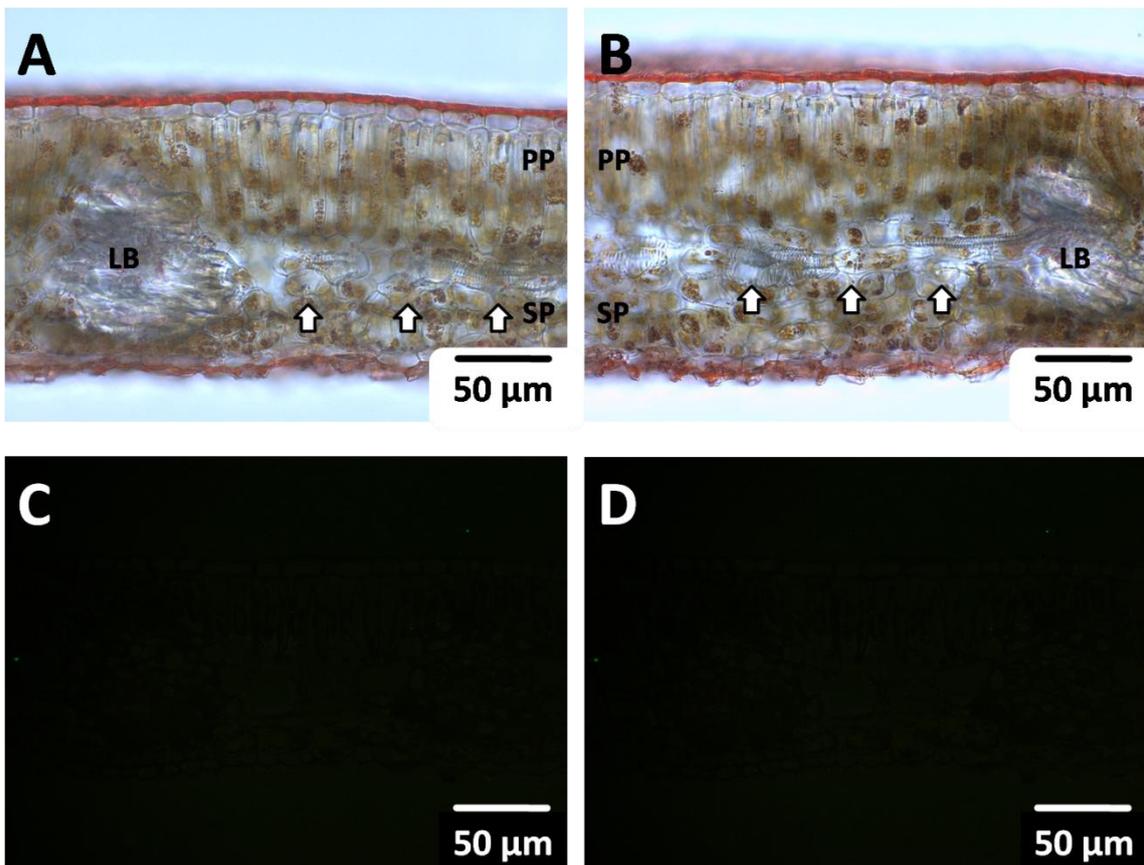


Abbildung 3.3.4: Detektion latexführender Gefäße in *H. brasiliensis* Blättern mittels Oil-Red-O und Immunfluoreszenzmarkierung

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des C-Stadiums verwendet. Die Färbung hydrophober Substanzen und damit auch der Latexgefäße erfolgte mittels Oil-Red-O. Für die Detektion des im Latex lokalisierten Allergens Hev b 1 wurde der Antikörper II4F9. Weder mittels Oil-Red-O-Färbung, noch mittels II4F9 konnten Latexgefäße im Bereich der kleineren Blattadern nachgewiesen werden.

A. und **B.** Oil-Red-O-Färbung hydrophober Substanzen; Lediglich die Cuticula weist eine deutliche Rotfärbung auf. Im Bereich der Leitbündel konnten keine hydrophoben Substanzen gefunden werden. Die Leitbündel sind mit der Bezeichnung LB Markiert. Weiße Pfeile mit schwarzem Rand verdeutlichen den Querverlauf der Leitbündel. PP: Palisadenparenchym; SP: Schwammparenchym; **C.** und **D.** Immunfluoreszenzdetektion von Hev b 1; **C.** Kontrolle; **D.** Immunfluoreszenzdetektion von Hev b 1; Im Bereich der kleineren Leitbündel des Blattgewebes konnte keinerlei Hev b 1 detektiert werden.

Immunofluoreszenz- und GFP-Markierung von HNL

Für die Immunofluoreszenzmarkierung von HNL wurden zunächst, wie auch bei der LIN-Detektion, Stücke aus C-Stadien-Blättern in LR-White eingebettet und Schnitte mit einer Dicke von 1 bis 2 μm angefertigt. Zur Detektion der HNL wurde ein von der Firma GenScript hergestellter AK genutzt. Der sekundäre AK war mit FITC konjugiert. Das Fluoreszenzsignal zeigt, dass HNL vornehmlich im Bereich der unteren Epidermis lokalisiert ist (siehe Abbildung 3.3.5). Hier scheint sie zum Einen in Assoziation mit der Plasmamembran vorzuliegen (B). Ob sich das Enzym im Apoplasten befindet, oder aber der cytosolischen Seite der Membran anhaftet kann nicht gesagt werden. Die Ergebnisse der Lokalisierungsvorhersage lassen auf ein apoplastisches Vorkommen schließen (siehe Tabelle 3.3.1).

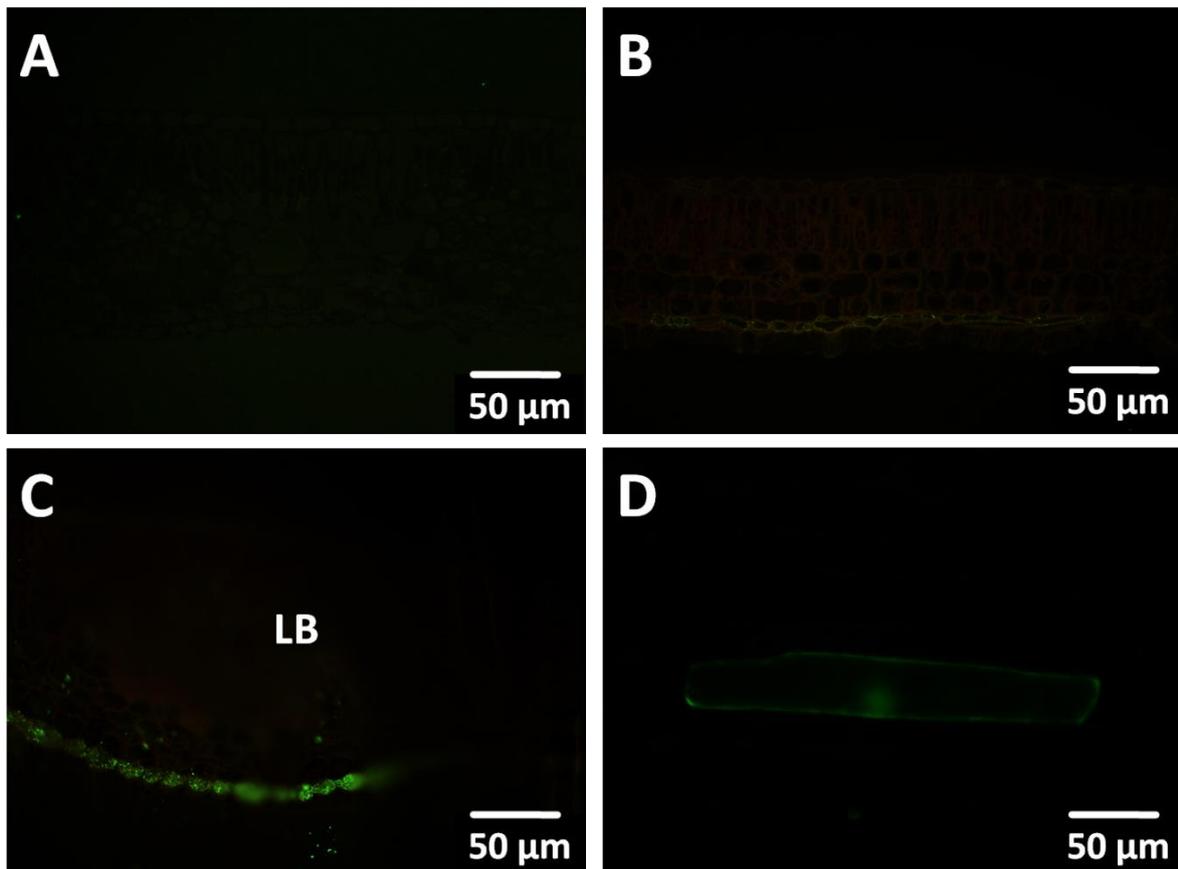


Abbildung 3.3.5: Immunofluoreszenz- und GFP-Markierung von HNL in Blättern von *H. brasiliensis* bzw. in Epidermiszellen von *Allium cepa*

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des C-Stadiums verwendet. Für die HNL-Detektion wurde der von der Firma GenScript hergestellte Antikörper genutzt. Zwecks Feststellung der subzellulären Lokalisation wurden außerdem Zwiebelepidermiszellen mit einem HNL-GFP-Konstrukt transformiert (D). HNL ist offenbar vornehmlich im Bereich der unteren Epidermiszellen lokalisiert (B und C). Sie scheint dort in Assoziation mit der Plasmamembran vorzuliegen (B). In Leitbündelnähe speichern diese Zellen außerdem größere Mengen an HNL in der Vakuole (C).

A. Kontrolle; **B.** Blattquerschnitt ohne Leitbündel; **C.** Blattquerschnitt mit einem Leitbündel mittlerer Größe. Das Leitbündel ist mit der Bezeichnung LB markiert. **D.** GFP-Markierung von HNL in Zwiebelepidermiszellen; Das GFP-Signal findet sich zwar im Cytosol, eine Membranassoziation scheint aber nicht vorzuliegen.

GFP-(Green Fluorescent Protein)-Markierung und Expression der HNL in Zwiebelzellen hingegen zeigte, dass sich größere Mengen des Enzyms im Cytosol befinden (siehe Abbildung 3.3.5 D). Diese scheinen aber nicht membranassoziiert zu sein. Es könnte sich somit um Protein handeln, das zwar schon exprimiert, aber noch nicht sekretiert wurde.

Darüber hinaus befindet sich ein Großteil der HNL in den Vakuolen der unteren Epidermiszellen (siehe Abbildung 3.3.5 C). Dies ist jedoch anscheinend, wie auch bezüglich der LIN festgestellt, nur im Bereich von Leitbündeln der Fall (B und C). Epidermiszellen die sich in Phloemnähe befinden und LIN oder HNL in ihrer Vakuole speichern sollen im Folgenden kurz als PEZ (phloemnahe Epidermiszellen) bezeichnet werden.

Immunfluoreszenzmarkierung von LIN und HNL in verletztem Blattgewebe

Neben intaktem Blattgewebe wurden auch mittels Präpariernadel verletzte Flächen für die Einbettung in LR-White sowie die anschließende Immunfluoreszenzmarkierung von LIN und HNL genutzt. Die Proben wurden sowohl am Fluoreszenz- als auch am Konfokal-Lasermikroskop dokumentiert. Die Ergebnisse zeigen, dass im Bereich der Einstiche eine Überschwemmung aller Zellen und Gewebe mit LIN stattfindet (siehe Abbildung 3.3.6 B). Zusätzlich findet sich Fluoreszenzsignal in verstärktem Maße auch in Zellen, die im intakten Gewebe nur eine geringfügige Markierung aufwiesen. So sind Epidermiszellen, in deren Vakuolen zuvor nur kleinere LIN-Einschlüsse detektiert wurden (siehe Abbildung 3.3.2 I B), zur Gänze mit LIN gefüllt (siehe Abbildung 3.3.6 B). Allerdings ist die Verteilung der Signaldichte nicht gleichmäßig, wie die Dokumentation am Konfokal-Lasermikroskop belegt (C, D und E.) Es scheint darüber hinaus so als wäre LIN im intakten Gewebe für die Detektion mittels AK nur begrenzt zugänglich. Besonders deutlich macht sich selbiges im Falle der HNL bemerkbar. Auch hier führte mechanische Verletzung des Gewebes zu einer Überschwemmung des Einstichbereiches mit HNL (G). Im intakten Gewebe war jedoch kaum oder kein Fluoreszenzsignal zu finden (F). Offenbar führt mechanische Gewebeverletzung nicht nur zu einer Aktivierung von LIN und HNL (siehe Kapitel 1), sondern auch zu einer verbesserten Zugänglichkeit für die Detektion mittels AK.

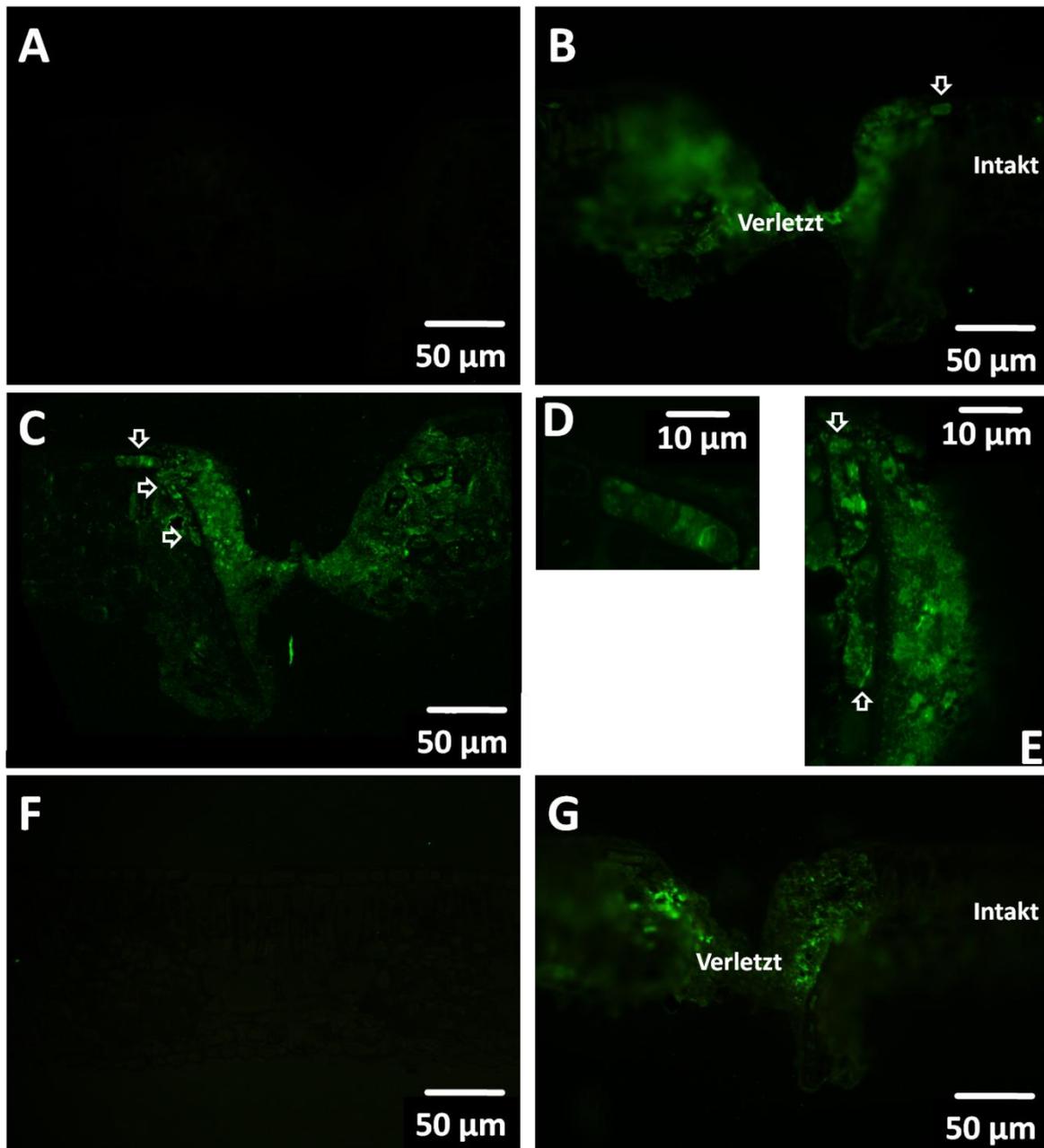


Abbildung 3.3.6: Immunfluoreszenzmarkierung von LIN und HNL in mechanisch verletztem Blattgewebe von *H. brasiliensis*

Für die Anfertigung der Schnitte wurden Blätter des C-Stadiums verwendet. Für die LIN-Detektion wurde der von SELMAR (1986) hergestellte Antikörper genutzt, für die HNL-Detektion der der Firma GenScript. Sowohl LIN als auch HNL überschwemmen offenbar nach mechanischer Verletzung den gesamten Bereich des betroffenen Gewebes (B, C und G). Darüber hinaus konnte LIN auch verstärkt in den Zellen der oberen Epidermis detektiert werden (C, D und E).

A. Kontrolle ohne primären AK; B. LIN-Detektion im verletzten Blattgewebe; C. LIN-Detektion im verletzten Blattgewebe (Aufnahme am Konfokal-Lasermikroskop); Epidermiszellen in deren Vakuolen sich offensichtlich LIN befindet sind mit weißen Pfeilen markiert; D. und E. Detailaufnahmen der LIN-enthaltenden Epidermiszellen (In Aufnahme E sind die Vakuolen mit weißen Pfeilen markiert; F. HNL-Detektion im intakten Blattgewebe; G. HNL-Detektion im verletzten Blattgewebe

3.4 Diskussion

Vakuoläre Lokalisation von LIN und HNL

Bisher wurde angenommen, dass BGLU bzw. LIN in *H. brasiliensis* Blättern vornehmlich apoplastisch lokalisiert ist. Zur Lokalisierung von HNL lagen keine Informationen vor. Wie hier gezeigt werden kann, kommen beide Enzyme in den Vakuolen von Blattzellen vor. Dies überrascht, da in den Vakuolen auch die Speicherung der cyanogenen Glycoside (CG) erfolgt (GRUHNERT et al. 1994). Auch beim Maniok, der ebenfalls zu den Euphorbiaceae gehört, wurden sowohl Linamarase als auch HNL vornehmlich im Apoplasten gefunden (McMAHON et al. 1995; WHITE et al. 1998). Selbstverständlich müssen die Vakuolen, in denen die Enzyme vorkommen, nicht mit denen identisch sein, in denen die CG gespeichert werden. Darüber hinaus ist eine vakuoläre Lokalisation von BGLU und HNL offenbar nichts Ungewöhnliches. Bei *P. serotina* wurden sowohl PH als auch MDL in den Vakuolen phloemassoziierter Zellen gefunden (SWAIN und POULTON 1994). In solchen Zellen (kurz PAZ) scheint auch LIN aus *H. brasiliensis* lokalisiert zu sein. Im Gegensatz zu *P. serotina* kommt sie beim Kautschukbaum aber auch apoplastisch vor. HNL ist nicht wie MDL in den Vakuolen phloemassoziierter Zellen lokalisiert, sondern findet sich vornehmlich in den Vakuolen phloemnaher Zellen der unteren Epidermis (kurz PEZ). Wie auch LIN kommt sie darüber hinaus im Apoplasten vor, ist hier aber offensichtlich Membran assoziiert. Der Befund der vakuolären Lokalisation von LIN steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von GRUHNERT et al. (1994), die zeigen konnten, dass Protoplasten aus *H. brasiliensis*-Blättern keine BGLU-Aktivität aufweisen. Er könnte damit zu erklären sein, dass sich in den Protoplasten-Fraktionen der Arbeitsgruppe keine Vakuolen von PAZ befanden, die den Großteil der in den Vakuolen gespeicherten LIN enthalten. Möglich ist auch, dass das Enzym in der Vakuole inaktiv vorliegt und erst bei mechanischer Gewebeverletzung aktiviert wird. Dies würde nicht nur erklären warum GRUHNERT et al. (1994) keine BGLU-Aktivität in den Protoplasten nachweisen konnten, sondern wäre auch der Schlüssel zum Mechanismus der Enzymaktivierung. Die Inaktivität wäre außerdem unabdingbar, sollten sich in den Vakuolen gleichzeitig Linamarin befinden.

Eine vakuoläre Speicherung von Enzymen ist auch für nicht cyanogene Pflanzen beschrieben. So wurde in den leitbündelnahen Zellen des Mesophylls und der Epidermis von *Glycine max* eine Lipoxygenase (LOX) nachgewiesen, die hier in größeren Mengen abgelegt wird. Da die Einlagerung des Enzyms in Zusammenhang mit der Stickstoffverfügbarkeit steht wird angenommen, das LOX, ein vegetatives Speicherprotein (VSP), der temporären Zwischenspeicherung von Stickstoff dient (TRANBARGER et al. 1991). VSP finden sich, neben *G. max*, bei einer Vielzahl weiterer Leguminosen (TIAN und HU 2004). Gut beschrieben ist auch die Einlagerung von VSP bei *Populus deltoides*, die im Herbst in Wurzeln und Stamm einsetzt. Im Frühjahr werden diese Reserven mobilisiert und den wachsenden Geweben zur Verfügung gestellt (COLEMAN et al. 1991; LANGHEINRICH und TISCHNER 1991).

VSP können im Allgemeinen bis zu 50% des löslichen Gesamtproteins ausmachen, fungieren als temporärer Aminosäurespeicher und dienen offenbar der Gewährleistung einer gleichmäßigen Stickstoffversorgung (LIU et al. 2005). *Arabidopsis thaliana* VSP2 wird durch Gewebeverletzung, Methyljasmonat und Insektenfraß induziert. Bei dem Protein handelt es sich um eine saure Phosphatase, die die Entwicklung von Insekten verlangsamen und deren Mortalität erhöhen kann (LIU et al. 2005). VSP dienen somit offensichtlich nicht nur als temporärer Stickstoff- bzw. Aminosäurespeicher, sondern können darüber hinaus auch an Abwehrreaktionen der Pflanze beteiligt sein. Eine solche Doppelfunktion wäre z.B. auch im Falle von LOX aus Sojabohne denkbar.

Auch *H. brasiliensis* verfügt über VSP. Dieses wird, offenbar zum Ende der Wachstumsperiode hin, in den Vakuolen spezialisierter Zellen des sekundären Phloems, den sogenannten Proteinspeicherzellen (PSC), eingelagert (TIAN et al. 1998). Mit beginnendem Austrieb und der damit verbundenen Ausbildung neuer Blätter, wird das Protein mobilisiert. Im Falle des Kautschukbaumes scheinen die VSP-Einlagerungen vornehmlich aus einem Polypeptid zu bestehen, das eine Größe von 67 Kilodalton aufweist (TIAN et al. 1998). Auch im Falle des *Hevea*-VSP handelt es sich um ein Enzym. Die Sequenzierung ergab, dass *H. brasiliensis* offensichtlich LIN als VSP im sekundären Phloem einlagert (TIAN et al. 2006 in NCBI). In den Blättern, die kein sekundäres Phloem haben, konnten keine PSC nachgewiesen werden (TIAN et al. 1998). Die hier vorgestellten Befunde belegen aber, dass auch in den Blättern eine Speicherung von LIN in PAZ erfolgt. Ob diese mit den PSC identisch sind, kann nicht gesagt werden. Die Ergebnisse stehen somit nicht zwangsläufig im Widerspruch zu den Befunden von TIAN et al. (1998).

Mit Hilfe des BGLU-spezifischen AKs lässt sich die gesamte, lösliche BGLU-Aktivität im Proteinrohextrakt aus *H. brasiliensis*-Blättern präzipitieren. Sie geht auf ein einziges Polypeptid zurück (SELMAR et al. 1987). Da der AK nur dieses eine Blattprotein erkennt ist davon auszugehen, dass es sich bei der vakuolär gespeicherten LIN um das gleiche Protein handelt, das auch im Apoplasten zu finden ist. Bisher konnte lediglich eine mRNA gefunden werden, die dieses Protein kodiert. Das Signalpeptid, das diese Sequenz beinhaltet, deutet auf eine Sekretion des Enzyms hin, nicht auf eine vakuoläre Lokalisation (siehe Abbildung 3.3.1). Das Vorkommen von LIN in beiden Kompartimenten, ließe sich mit folgendem Szenario erklären. Die Blätter synthetisieren selbst nur einen Teil der insgesamt im Blatt befindlichen LIN, diese wird in den Apoplasten transportiert. Zusätzlich erhalten die jungen Blattstadien, bei denen es sich um *Sink*-Gewebe handelt, VSP und damit LIN aus den PSC des sekundären Phloems. Sie wird für die Versorgung der jungen Blätter mit Aminosäuren (AS) und reduziertem Stickstoff genutzt. Um eine gleichmäßige Verfügbarkeit zu garantieren, werden Teile des Proteins in den Vakuolen der PAZ gespeichert (siehe Abbildung 3.4.2), was zu der beobachteten Verteilung führen würde. VSP-LIN könnte so der Versorgung der jungen Blätter mit AS und ihrem Schutz gleichzeitig dienen. Auch CG, die eine wichtige Funktion in der Abwehr von Fraßfeinden

haben, werden bei *H. brasiliensis* für die Speicherung reduzierten Stickstoffs genutzt (SELMAR et al. 1988) und bei Bedarf in die *Sink*-Gewebe transportiert. Die parallele Versorgung der Blätter mit LIN erscheint sinnvoll.

Wahrscheinlicher ist aber, dass VSP-LIN zu AS abgebaut wird, die dann in die *Sink*-Gewebe transportiert werden. Zur Zwischenspeicherung könnten diese dann in den PAZ wieder für die LIN-Synthese genutzt werden. Als VSP bzw. temporärer Stickstoffspeicher würde diese LIN in die Vakuole verlagert werden. In geringerem Maße könnte dies auch in den PEZ stattfinden, die daher nur kleinere Ablagerungen von LIN aufweisen (siehe Abbildung 3.4.1). Die geringere Syntheseleistung wäre darauf zurückzuführen, dass die Versorgung der Zellen mit freien AS niedriger ausfällt, da ein Großteil bereits von den PAZ verbraucht wurde. Direkt über das Phloem mit AS versorgte Zellen, PAZ und PEZ also, könnten als einzige vornehmlich oder ausschließlich LIN exprimieren, deren Signalpeptid eine vakuoläre Speicherung bedingt (siehe Abbildung 3.4.2). Das alle übrigen Zellen des Blattgewebes in diesem Szenario LIN synthetisieren, die sekretiert wird, könnte der Grund dafür sein, dass bisher nur diese mRNA gefunden wurde.

Ähnliches wäre auch in Bezug auf HNL denkbar. Die gleichmäßige Versorgung der phloemnahen Zellen der unteren Epidermis mit freien AS könnte dazu führen, dass neben der Synthese von plasmamembran-assoziiierter HNL vornehmlich solche exprimiert wird, die als VSP zusammen mit anderen Proteinen in der Vakuole abgelegt wird (siehe Abbildung 3.4.2). Das die HNL-Synthese in der unteren Epidermis stärker ausfällt als die LIN-Expression in der oberen, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass sich erstere in größerer Nähe zum Phloem befindet und daher besser mit AS versorgt werden kann.

Lokalisation und Aktivierbarkeit

Die Lokalisation von LIN und HNL sowohl im Apoplasten als auch in der Vakuole könnte in Zusammenhang mit der Aktivierbarkeit der beiden Enzyme stehen. Es wär möglich, dass lediglich die extrazellulär befindlichen Enzyme katalytisch aktiv sind. Die in den Vakuolen gespeicherten hingegen könnten inaktiv sein. Dafür das vakuolär lokalisierte LIN inaktiv sein könnte spricht der Befund von GRUHNERT et al. (1994), dass in isolierten Vakuolen keine BGLU-Aktivität nachzuweisen ist. Die Inaktivierung könnte durch die dichte Zusammenlagerung in Protein-Bodies Zustandekommen, wie sie für Speicherproteine üblich ist. Sie könnte auch die begrenzte Detektierbarkeit mittels AK bedingen (siehe Abbildung 3.3.7 G). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in Vakuolen der Epidermiszellen von intaktem Gewebe lediglich kleinere Ablagerungen von LIN gefunden wurden. Nach mechanischer Verletzung hingegen, scheint die gesamte Vakuole mit LIN gefüllt zu sein (siehe Abbildung 3.4.1). Anders als im Falle von BGLU 23 aus *A. thaliana* scheint die Aktivierung von LIN und auch von HNL bei *H. brasiliensis* somit zumindest teilweise innerhalb intakter Zellen zu erfolgen. Die

Überschwemmung verletzter Gewebereiche (siehe Abbildung 3.3.6 B und G) mit Enzym lässt aber vermuten, dass auch in den zerstörten Zellen eine Aktivierung stattfindet.

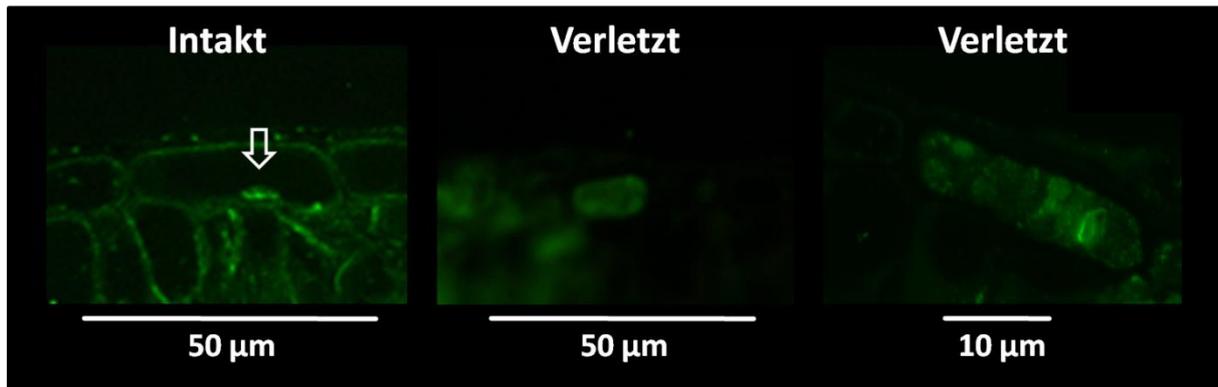


Abbildung 3.4.1: Immunofluoreszenzmarkierung von LIN in den Vakuolen von Epidermiszellen aus intaktem und verletztem Gewebe

Im intakten Blattgewebe finden sich in den Vakuolen der oberen Epidermis wenn, dann nur kleine, kompakte Ablagerungen von LIN (linkes Bild). Nach Verletzung hingegen scheint die gesamte Vakuole mit LIN gefüllt zu sein (mittleres Bild). Die ungleichmäßige Verteilung (rechtes Bild) könnte mit einer verletzungsbedingten Auflösung der kompakten Strukturen erklärt werden, welche zu einer erhöhten Löslichkeit von LIN führt.

Die LIN-Ablagerung in der Vakuole der Epidermiszelle im intakten Gewebe ist mit einem weißen Pfeil markiert.

LIN könnte also im intakten Blattgewebe vakuolär in einem kompakten Verbund vorliegen, der erst bei Verletzung aufgehoben wird. Die Kompaktheit der Struktur könnte die Enzyminaktivierung bedingen. Ihre verletzungsbedingte Auflösung die LIN-Aktivierung (siehe Abbildung 3.4.2). Selbiges wäre auch für HNL denkbar. Die Hydroxynitrilase könnte dabei im Verbund mit anderen Proteinen vorliegen. Dafür spräche die punktuelle Signalverteilung in den Vakuolen der Epidermiszellen (siehe Abbildung 3.3.6 C).

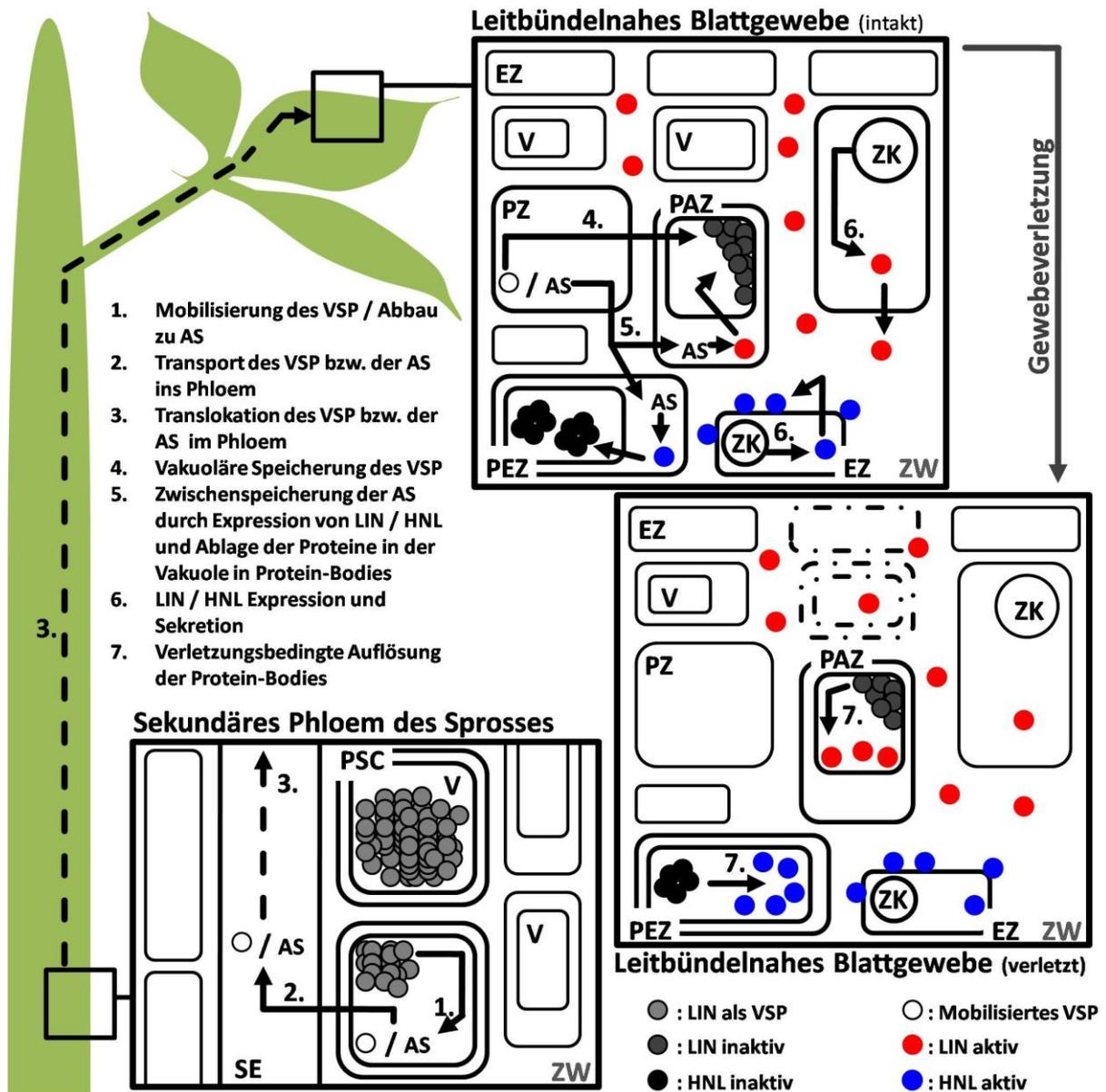


Abbildung 3.4.2: Modell zur Lokalisierung und Aktivierung von LIN und HNL

H. brasiliensis speichert BGLU bzw. LIN als VSP (Vegetative Storage Protein) in den Vakuolen der PSC (Protein Storage Cells) des sekundären Phloems (TIAN et al. 1998; TIAN et al. 2006 in NCBI). Das VSP wird zu Beginn des neuen Blattaustriebs mobilisiert (TIAN et al. 1998). In Form von Aminosäuren (AS) oder vielleicht auch als Protein erfolgt der Transport in die *Sink*-Gewebe. Hier werden Teile der AS erneut für die Synthese von LIN und HNL genutzt. Die Enzyme werden zur Speicherung in den Vakuolen phloemassoziierter (PAZ) und phloemnaher (PEZ) Zellen abgelegt. Die Zwischenspeicherung ermöglicht eine gleichmäßige Versorgung der jungen Blätter mit AS und reduziertem Stickstoff. Bei Gewebeerletzung gehen die sonst schwerlöslichen Speicherproteine in Lösung über, was die Aktivitätszunahme von LIN und HNL bedingt. Zellen die aufgrund der Entfernung zum Phloem nicht mit großen Mengen an AS versorgt werden exprimieren ausschließlich LIN oder HNL die sekretiert wird und katalytisch aktiv ist. HNL liegt in Assoziation mit der Plasmamembran vor. Sollten nicht AS sondern LIN im Phloem transportiert werden, so könnte dieses ebenfalls zur Zwischenspeicherung in die Vakuolen der PAZ und PEZ gelangen.

Verwendete Abkürzungen: AS = Aminosäure; EZ = Epidermiszelle; PAZ = Phloem assoziierte Zelle; PEZ = Phloemnahe Epidermiszelle; PSC = Proteinspeicherzelle; PZ = Phloemzelle; SE = Siebelement; V = Vakuole; VSP = Vegetatives Speicherprotein; ZK = Zellkern; ZW = Zellwand

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

Kapitel 4: Die Aktivierung von Linamarase und Hydroxynitrillyase erfolgte durch sekundenschnelle Erhöhung der Löslichkeit

Zusammenfassung

Linamarasen (LIN) und Hydroxynitrillyasen (HNL) katalysieren die verletzungsbedingte Blausäurefreisetzung (HCN) aus den Geweben cyanogener Pflanzen. HCN kann, wenn die Freisetzung schnell genug erfolgt, als Repellent fungieren. Bei *H. brasiliensis* erfahren sowohl LIN als auch HNL in Reaktion auf Zerstörung des Blattgewebes lokal eine sekundenschnelle Aktivierung. Diese ermöglicht eine beschleunigte HCN-Freisetzung. Die Aktivierung der beiden Enzyme wird, wie hier erstmalig gezeigt werden kann, durch eine Erhöhung der Löslichkeit realisiert. LIN und HNL sind, neben der apoplastischen Lokalisierung, zu großen Teilen in unlöslicher, inaktiver Form offenbar innerhalb einiger Blattzellen abgelegt. Erst in Reaktion auf mechanische Gewebeverletzung geht dieses Protein in Lösung über und wird damit aktiviert. Der Prozess erfolgt anscheinend ausschließlich innerhalb von lebenden Zellen.

4.1 Einleitung

Wichtigkeit von Enzymaktivitätsregulierung

Die Regulierung der Aktivität von Enzymen ist für alle Lebewesen, vom Einzeller bis zur höheren Pflanze und zum Menschen, von zentraler Bedeutung. Wären beispielsweise Verdauungsenzyme wie das Trypsin bereits am Ort der Synthese aktiv, so würden sich die entsprechenden Organe selbst zersetzen. In den Samen vieler Pflanzen finden sich Speicherproteine als Reservestoff. Oft werden diese zusammen mit den für die spätere Mobilisierung erforderlichen Proteasen abgelegt (BEWLEY und BLACK 1994). Wären die Proteasen bereits bei der Einlagerung der Speicherproteine aktiv, wäre eine Samenentwicklung unmöglich. Im Falle von *Escherichia coli* kann nur dann Galactosidase nachgewiesen werden, wenn auch Lactose vorhanden ist. Eine ständige Bereitstellung des Enzyms würde eine enorme Energieverschwendung bedeuten.

Ebenen der Enzymaktivitätsregulierung

Für die Veränderung von Enzymaktivitäten in Organen, Geweben oder einzelnen Zellen gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

1. Eine Veränderung der Proteinmenge, wie beispielsweise im Falle der Galactosidase aus *E. coli*.
2. Eine Aktivierung von bereits vorhandenem Enzym, wie bei Trypsin oder den Proteasen im Samengewebe.

Veränderungen der Enzymmenge

Die Veränderung der Enzymmenge kann durch Erhöhung bzw. durch Verringerung der Expression erreicht werden. Ein entsprechender Regulationsmechanismus wurde 1961 von JACOB und MONOD für *E. coli* beschrieben. Bei *E. coli* wird, wenn keine Lactose zur Verfügung steht, die Transkription des Galactosidasegens durch einen Repressor inhibiert. In der Folge verfügt die Zelle auch nicht über Galactosidaseaktivität. Ist hingegen Lactose verfügbar, so lagert sich diese an den Repressor an. Der Repressor löst sich daraufhin vom Operator und die Transkription des Galactosidasegens beginnt. So lange, bis die Lactose abgebaut ist verfügt die Zelle dadurch über Galactosidase. Erst wenn keine Lactose mehr vorhanden ist, lagert sich der Repressor erneut am Operator an, woraufhin die Enzymaktivität wieder verschwindet (JACOB und MONOD 1961).

1991 konnten PEARCE et al. erstmalig zeigen, dass Blätter der Tomate *Lycopersicon esculentum*, als Reaktion auf Gewebeverletzung ein 18 Aminosäuren (AS) großes Peptid produzieren - das Systemin. Es handelte sich um das erste bei Pflanzen beschriebene Peptidhormon. Systemin bewirkt u.a. die Synthese von Methyljasmonat (MeJa) (TAIZ und ZEIGER 2000). MeJa wiederum ist an der Induktion verschiedener abwehrrelevanter Gene, wie beispielsweise dem der Phenylalaninamoniolyase (PAL), beteiligt (REPKA et al. 2004). Im Falle der Lima-Bohne *Phaseolus lunatus* konnte, als Reaktion auf Insektenbefall, eine erhöhte β -Glucosidase-(BGLU)-Aktivität im Blattgewebe nachgewiesen werden (BALLHORN et al. 2006). Auch in diesem Fall scheint eine Protein *de novo* Synthese zu erfolgen. Anders als im Falle der Systemin-Bildung handelt es sich jedoch nicht um eine systemische Reaktion. Die Akkumulation ist auf die verletzungsnahen Zellbereiche beschränkt (BALLHORN et al. 2006).

Neben der Modulation der Neusynthese, kann die Enzymmenge auch mit Hilfe der Abbaugeschwindigkeit reguliert werden. Ein verlangsamter Turnover führt zu einer erhöhten Proteinmenge und damit zu gesteigerter Enzymaktivität. Umgekehrt kann der Turnover natürlich auch beschleunigt sein (VOET et al. 2002).

Veränderungen der spezifischen Enzymaktivität

Eine Aktivierung von bereits vorhandenem Enzym kann durch Veränderungen bezüglich der Tertiär- und Quartär-Struktur erfolgen. Dies findet im Falle der β -Glucosidase PYK 10 (bzw. BGLU 23) aus

Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* statt. PYK 10 wird in sogenannten ER-Bodies (ER: Endoplasmatisches Retikulum) der Wurzelzellen als inaktives Monomer gespeichert. Hebt man die Zellintegrität durch Homogenisierung auf, so kommt das Enzym mit PBP1 in Kontakt, einem im Cytosol befindlichen Protein. PBP1 unterstützt die Polymerisation von PYK 10, die zur Aktivierung des Enzymes führt (NAGANO et al. 2005). Polymerisiertes PYK 10 ist im Gegensatz zum Monomer unlöslich. Dennoch stellt das Polymer die aktive Form des Enzyms da.

Eine Polymerisation von BGLU ist auch für *Zea mays* beschrieben. Pflanzen des Genotyps H95 weisen im Extrakt nur etwa 10 % der BGLU-Aktivität auf, die bei dem Wildtyp zu finden ist. Die niedrige Enzymaktivität ist auf ein 35 kDa großes Protein, den sogenannten β -Glucosidase-Aggregationsfaktor (BGAF) zurückzuführen. BGAF bindet spezifisch an BGLU, wodurch große, weitestgehend unlösliche Polymere entstehen. Allerdings sind sowohl die löslichen Dimere als auch die unlöslichen Polymere katalytisch aktiv (ESEN und BLANCHARD 2000).

Keimlinge von *Triticum aestivum* verfügen über größere Mengen zweier BGLUs, die als TaGlu1a und TaGlu1b bezeichnet werden. TaGlu1a und TaGlu1b lagern sich zu Hexameren zusammen, die sowohl aus beiden als auch ausschließlich einer der BGLUs bestehen können. Für die Oligomerisierung ist der N-Terminus von zentraler Bedeutung. Nur das Hexamer weist katalytische Aktivität auf. Niedrigere Oligomerisierungsstufen und Monomere, die ebenso vorkommen, sind inaktiv. Selbiges gilt auch für BGLU aus *Secale cereale* (SUE et al. 2006).

Polymerisation von BGLU wurde darüber hinaus auch für *Linum usitatissimum* (FIELDES und GERHARDT 1994) sowie für *Avena sativa* (NISIUS 1988; GUS-MAYER et al. 1994; ESEN und BLANCHARD 2000) beschrieben.

Oligomerbildung und Polymerisation scheinen in Zusammenhang mit BGLU-Aktivität bei vielen Arten von zentraler Bedeutung zu sein.

Oligomerbildung bei *H. brasiliensis* LIN

Von LIN aus *H. brasiliensis* ist bekannt, dass sie ebenfalls eine Vielzahl von Oligomeren bildet (SELMAR et al. 1987). Abhängig von Proteinmenge und Elektrophoresetechnik lassen sich bis zu 14 Banden detektieren. Die Oligomere können zwar elektrophoretisch getrennt werden, gehen aber dynamisch ineinander über und bringen daher, nach Auftrennung, jede Oligomerform wieder hervor (SELMAR et al. 1987). Eine vergleichbare Oligomerisierung der BGLU wurde auch bei *Manihot esculenta* beobachtet (SERMSUVITYAWONG 1995). Möglicher Weise ist, wie bei Weizen und Roggen, nur eines der Oligomere katalytisch aktiv. In diesem Fall könnte die verletzungsbedingte Aktivierung, die sowohl beim Kautschukbaum als auch bei Cassava zu beobachten ist (siehe Seite 23 *H. brasiliensis* und Seite 368 *M. esculenta*), durch eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen den Oligomeren bedingt sein. Ob an der Oligomerbildung, wie bei *A. thaliana* ein Interaktionspartner oder wie bei *Z. mays* ein

Aggregationsfaktor beteiligt ist, oder ob eine posttranslationale Modifikation der Monomere erfolgt, ist nicht bekannt.

Oligomerbildung bei *H. brasiliensis* HNL

Von HNL aus *H. brasiliensis* ist bekannt, dass sie, bei niedrigen Salzkonzentrationen, als Dimer vorliegen kann (HASSLACHER et al. 1996). Selbiges könnte auch für *M. esculenta* HNL gelten (WHITE et al. 1998). Allerdings wurden von dieser auch Trimere (HUGHES et al. 1994) und Tetramere (CHUESKUL und CHULAVATNATOL 1996; WAJANT und PFIZENMAIER 1996; WHITE et al. 1998) beschrieben. Ein Auftreten verschiedener Oligomere in ein und derselben Probe, wie bei der LIN, ist jedoch nicht bekannt. Dass auch im Falle von HNL der Aktivierungsvorgang in Zusammenhang mit der Oligomerbildung steht, erscheint daher eher unwahrscheinlich.

Viele Pflanzen verfügen in ihren Blättern, Früchten oder Wurzeln über latent vorliegende Polyphenoloxidasen (PPO). Das Enzym wird als latent bezeichnet, weil es erst nach einer entsprechenden Vorbehandlung katalytische Aktivität aufweist (SELLÉS-MARCHART et al. 2007). Die Vorbehandlungen umfassen sowohl eine Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) zum Protein, als auch eine Inkubation mit Trypsin. Im intakten Gewebe ist PPO oft in den Plastiden lokalisiert (MAYER 2006) und liegt dort membrangebunden vor (LIEBEREI und BIEHL 1978). PPO aus Kakaosamen erfährt bei Verlust der Zellintegrität durch mechanische Verletzung oder auch durch leichtes Trocknen eine minutenschnelle Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Derselbe Effekt ist auch zu beobachten, wenn man Chloroplasten von *Spinacia oleracea* altern lässt, oder wiederholtem Einfrieren und Auftauen aussetzt (LIEBEREI und BIEHL 1978). Die mit dem Verlust der Zell- bzw. Organellintegrität einhergehende Zerstörung der Membranen könnte zu einem Herauslösen der PPO und damit zur Aktivierung führen. Möglicher Weise ist außerdem, wie im Falle von *Vicia faba*, eine proteolytische Prozessierung erforderlich, sollte beispielsweise die für die Membranbindung erforderliche Domäne das aktive Zentrum verdecken (SELLÉS-MARCHART et al. 2007). Wahrscheinlicher ist aber, dass die Membranbindung an sich die Latenz bedingt, z.B. dadurch, dass diese den Zutritt zum Aktiven Zentrum blockiert. Auch HNL ist möglicher Weise membrangebunden (BALLHORN et al. 2007). Sollte dies der Fall sein, wäre ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus, wie er für PPO aus Kakaosamen und Spinatblättern angenommen werden kann, denkbar.

Posttranslationale Modifikation von Proteinen

Bezüglich der Aktivitätsregulierung von Enzymen ist fernerhin posttranslationale Modifikation von zentraler Bedeutung. Eine gut beschriebene posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung. Sie ist beispielsweise an der Aktivierung der PEP-Carboxylase (PEP: Phosphoenolpyruvat) beteiligt

(JIAO und CHOLLET 1991). Ein weiteres Beispiel für eine Aktivierung durch Phosphorylierung ist die Kaskade der mitogen aktivierten Proteinkinasen (TAIZ und ZEIGER 2000).

Von großer Wichtigkeit hinsichtlich der posttranslationalen Modifikation von Proteinen ist fernerhin das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO). NO kann sowohl mit Metalloenzymen als auch mit Proteinen die Sulfhydrylgruppen aufweisen reagieren (STAMLER 1994). Im Gegensatz zur Phosphorylierung ist die als Nitrosylierung bezeichnete Proteinmodifikation nicht von Enzymen Abhängig. Sie ist aber ebenso reversibel (MANNICK und SCHONHOFF 2002). Bei Tieren bedingt eine Nitrosylierung der Guanylatcyclase die sekundenschnelle Aktivierung des Enzyms (MURAD 1986). Auch was Pflanzen anbelangt ist die Nitrosylierung offenbar eine Form der posttranslationalen Proteinmodifikation, die eine flexible und präzise Modulation der jeweiligen Proteinfunktion in Reaktion auf Umweltsignale ermöglicht (ARASIMOVICZ und FLORYSZAK-WIECZOREK 2007). Im Falle von *L. esculentum* konnte eine verletzungsbedingte NO-Synthese beobachtet werden (HUANG et al. 2004). Aufgrund der hohen Reaktivität des Moleküls sind direkte NO-Effekte lokal begrenzt (LINDERMAYR et al. 2005).

Neben der Bildung von NO löst Gewebeverletzung die Bildung von ROS aus was wiederum zur Synthese von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führt. H_2O_2 bewirkt die Oxidation von Cysteinresten. Auf diese Weise können, ähnlich wie bei der Nitrosylierung, Proteinfunktionen und Enzymaktivitäten moduliert werden (ROMERO-PUERTAS et al. 2004; LAMOTTE et al. 2005).

LIN- und HNL-Aktivierung bei *H. brasiliensis*

Von der Oligomerbildung über die Membranassoziation hin zu posttranslationalen Modifikationen gibt es somit eine Vielzahl von Mechanismen, die mit der Aktivierung von LIN und HNL aus *H. brasiliensis* (siehe Seite 36 und 42) in Zusammenhang stehen könnten. Ausgeschlossen werden kann aufgrund der Schnelligkeit des Aktivierungsprozesses (siehe Seite 39) lediglich eine Veränderung auf Transkriptionsebene. Es stellt sich daher die Frage ob die Enzymaktivierung durch Phosphorylierung, Nitrosylierung oder in Gegenwart von H_2O_2 erfolgt und ob posttranslationale Modifikation direkt die Aktivierung bedingt, oder ob diese über eine Veränderung des Oligomerisationsverhaltens bzw. der Membranassoziation erfolgt.

Somit ergeben sich für dieses Kapitel folgende Fragestellungen und Zielsetzungen:

1. Führt Gewebeverletzung auch bei Blättern von *H. brasiliensis* zu einer lokal begrenzten NO-Synthese?
2. Bewirkt NO die Aktivierung von LIN und HNL?
3. Werden LIN und HNL verletzungsbedingt phosphoryliert?
4. Bewirkt H_2O_2 die Aktivierung von LIN?

5. Zeigt HNL ein der bei LIN beobachtetem vergleichbares Oligomerisationsverhalten?
6. Ist für die Oligomerisation ein mit BGAF oder PBP 1 vergleichbares Protein erforderlich?
7. Führt ein verändertes Oligomerisationsverhalten zur Aktivierung der LIN?

4.2 Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Zur Anzucht der im Rahmen der Untersuchungen beprobten *H. brasiliensis* Pflanzen finden sich genaue Angaben im Material und Methoden Teil des ersten Kapitels.

Mechanische Gewebeverletzung und Probennahme

Die mechanische Verletzung des Blattgewebes erfolgte mit Hilfe einer Präpariernadel. Das Blattgewebe aus den verletzten sowie den Kontrollbereichen wurde mittels Korkbohrer ausgestanzt und sofort auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®). Sowohl die Überstände (Enzymextrakte) als auch die Pellets wurden für die Bestimmung der BGLU und HNL Aktivität herangezogen.

Eine detaillierte Beschreibung der Probenaufbereitung findet sich im Material und Methoden Teil des ersten Kapitels.

Test auf NO-Freisetzung in Zusammenhang mit Gewebeverletzung

Die Detektion von NO erfolgte mit Hilfe von DA-2 DA (Diaminfluoreszeindiacetat; Calbiochem). DAF-2 DA ist zellpermeabel und fluoresziert nach Reaktion mit NO. Zunächst wurde eine 10 µM Gebrauchslösung in 10 mM Tris-KCl-Puffer (pH 7,2) angesetzt. Von dieser wurden 50 µl auf einen Objektträger gegeben. Anschließend wurde verletztes Blattgewebe (s.o.) mittels Korkbohrer ausgestanzt und auf den Objektträger aufgebracht. Die Analyse und Dokumentation erfolgte nach 5 und nach 10 Minuten am Konfokal-Lasermikroskop. Für die Anregung wurde Licht der Wellenlänge 488 nm genutzt. Als Lichtquelle diente ein Argonlaser. Die Fluoreszenz wurde im Wellenlängenbereich von 505 bis 530nm aufgezeichnet.

Um zu prüfen ob die dokumentierte Fluoreszenz auch auf die Reaktion von DAF-2 DA mit NO zurückzuführen ist, wurde ein Teil der Proben nach Gewebeverletzung für 5 Sekunden in eine Inhibitorlösung getaucht. Als Inhibitor diente Carboxyphenyl-Tetramethylimidazol-Oxid (CPTIO; Calbiochem). Die Gebrauchslösung hatte eine Konzentration von 200 µmol * l⁻¹. CPTIO fungiert zum Einen als NO-Fänger, inhibiert aber auch, nach Reaktion mit NO, dessen enzymatische Synthese. Nach dem Eintauchen in die Inhibitorlösung wurden die Proben auf einen Objektträger überführt, auf dem 50 µl DAF-2 DA-Lösung mit CPTIO vorgegeben waren. Die Dokumentation erfolgte wie zuvor beschrieben.

Inkubationen mit NO Donatoren

Für die Inkubation mit NO-Donatoren wurden ganze Blätter, Blatthomogenate (s.o.) und Enzymextrakte (s.o.) verwendet. Als NO-Donatoren dienten Natriumnitroprussid (SNP), Nitroso-

Acetyl-Penicillamin (SNAP) und S-Nitrosoglutathion (GSNO). Sie wurden den Homogenaten sowie den Enzymextrakten in Konzentrationen von $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bis $1 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ zugesetzt. Anschließend wurden diese unter regelmäßigem Schütteln bei Raumtemperatur (RT) für 0,5 bis 6 Stunden inkubiert. Die Unterschiede bezüglich der Inkubationszeiten sind den Abweichungen hinsichtlich der Zerfallsgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Donatoren geschuldet. So ist SNP erst nach Ablauf von 6 Stunden mehrheitlich zerfallen. Bei SNAP sind hierzu etwa 2,5 Stunden nötig. GSNO zerfällt zwar langsam, nitrosiliert aber auch selbst Cysteinreste, wobei diese nicht mit den durch NO nitrosilierten identisch sind. Daher kann bei Verwendung von GSNO eine Inkubationszeit von 30 Minuten ausreichend sein (FLORYSAK-WIECZOREK et al. 2006). Die Inkubationen erfolgten sämtlich bei Tageslicht, da die Donatoren anderenfalls nur sehr langsam oder gar nicht zerfallen (FLORYSAK-WIECZOREK et al. 2006).

Bei Verwendung ganzer Blätter wurde ausschließlich SNP als NO-Donor genutzt. Zunächst wurde eine $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Lösung angesetzt. Von dieser wurden 50 bis 100 ml in eine Petrischale gegeben. Anschließend wurde ein ganzes Blatt mit der Unterseite auf der Lösung platziert. Die Petrischale wurde mit einem Deckel verschlossen und für 6 Stunden bei RT und Tageslicht inkubiert. Nachdem die Blattunterseiten kurz mit Papier abgetupft worden waren, wurden Teile der Spreite mittels Korkbohrer ausgestanzt und sofort auf Eis homogenisiert (siehe Kapitel 1).

Alle Proben, auch die Enzymextrakte, wurden für 20 Minuten mit 16.000g zentrifugiert. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität im Überstand bestimmt (siehe Kapitel 1).

Inkubation mit Wasserstoffperoxid

Für die Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurden ausschließlich Enzymextrakte verwendet. Zu diesen wurden unterschiedliche Mengen an H_2O_2 gegeben, so dass der Gehalt in den Ansätzen zwischen 0,125 und 5 % lag. Anschließend wurden die Proben für 2,5 Stunden auf dem Schüttler bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert (Eppendorf® Thermo-Schüttler). Nach Zentrifugation mit 16.000g für 20 Minuten wurde die BGLU-Aktivität in den Überständen bestimmt (siehe Kapitel 1).

Inkubation mit Inositolphosphaten

Für die Inkubationen mit einem Mix unterschiedlicher Inositolphosphate (IPs) wurden Blatthomogenate verwendet. Zu diesen wurden unterschiedliche Mengen an IP-Lösung gegeben, so dass die Konzentrationen zwischen 5 und $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ lagen. Danach wurden die Proben für 2,5 Stunden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Schüttler inkubiert (Eppendorf® Thermo-Schüttler). Abschließend wurden sie mit 16.000g für 20 Minuten zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge fresco®) und die BGLU- sowie HNL-Aktivität im Überstand ermittelt (siehe Kapitel 1).

Inkubation mit GABA

Die Inkubationen mit GABA erfolgten analog zu den IP-Versuchen. Dabei wurden die Konzentrationen in den Ansätzen auf $25 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ bis $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingestellt.

Inkubation mit Methyljasmonat

Für die Methyljasmonat (MeJa)-Inkubationen wurden ganze Blätter verwendet. Das MeJa wurde zunächst mit 20 % Ethanol vermischt und anschließend in einen Zerstäuber gefüllt. Jedes der Blätter wurde mit einer identischen Menge an MeJa besprüht und anschließend für 5 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle dienten Blätter, die mit 20%iger Ethanollösung besprüht wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Teile der Spreiten mittels Korkbohrer ausgestanzt und sofort auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate für 20 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert und die BGLU-Aktivität im Überstand bestimmt (siehe Kapitel 1).

Begasung von *H. brasiliensis* Blättern mit Chloroform

Chloroform ist flüchtig und bewirkt aufgrund seiner Einlagerung in Biomembranen eine schnelle und gleichmäßige Zerstörung selbiger. Es eignet sich daher gut, um beispielsweise im Rahmen von Versuchen zur Kinetik der Blausäurefreisetzung, diese einzuleiten (siehe BALLHORN et al. 2005 und 2006). Chloroform wurde daher auch genutzt um bei C-Stadien Blättern von *H. brasiliensis* eine vollständige Dekompartimentierung zu erreichen, ohne das Gewebe mechanisch zu beschädigen. Für die Begasung wurden ganze Blätter in Petrischalen gelegt und je 2,5 ml Chloroform hinzugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Blätter nicht mit dem flüssigen Chloroform in Kontakt kamen. Daraufhin wurden die Schalen verschlossen und die Blätter bei Rt inkubiert, bis die Blaufärbung des ebenfalls in den Schalen befindlichen Feigl-Anger-Papiers (siehe Kapitel 1), die HCN-Freisetzung und damit die Aufhebung der Zellintegrität anzeigte. Die Blätter wurden aus den Schalen entnommen und BGLU- sowie HNL-Aktivität im Gewebe bestimmt. Außerdem wurden Teile der Spreiten mittels Präpariernadel verletzt und anschließend ebenfalls beprobt. Als Kontrolle dienten Blätter, die keiner Chloroformbehandlung ausgesetzt wurden.

Zellwandabtau nach Homogenisierung des Blattmaterials

Für den Verdau der Zellwände wurden die Blattscheiben aus den beprobten Blattflächen direkt in einem Enzymmix homogenisiert, der aus 1 % Pectinase, 1 % Cellulase, 1 % Driselase und 1 % Meicelase bestand. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 25 °C auf dem Schüttler (Eppendorf® Thermo-Schüttler) inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze die ausschließlich Blatthomogenat oder den Enzymmix enthielten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 20 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert und die BGLU-Aktivität im Überstand gemessen (siehe Kapitel 1).

Isolierung von BGLU aus Blattgewebe von *H. brasiliensis*

Die Isolierung der LIN aus Blattgewebe von *H. brasiliensis* erfolgte mit Hilfe einer Antikörpersäule, wie in KADOW (2006) beschrieben. Detaillierte Informationen finden sich im Material und Methoden-Teil des 2. Kapitels.

Probenvorbereitung für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Probenvorbereitung für die gelelektrophoretischen Analysen wurde ähnlich wie auch bei der Herstellung der Enzymextrakte verfahren. Zunächst wurden intakte und verletzte Bereiche der Blattspreiten mit Hilfe eines Korkbohrers ausgestanzt. Die Verletzung des Blattgewebes erfolgte mittels Präpariernadel. Es wurden sowohl Flächen des mittleren als auch des hohen Verletzungsgrades beprobt (siehe Kapitel 1). Die Blattscheiben wurden sofort in 1,5 ml Eppendorf®-Tubes überführt, in denen 100 µl eiskalte Pufferlösung, sowie eine Spatelspitze Polyvinylpyrrolidon (PVPP) vorgegeben waren. Sollten die Enzymextrakte für Westernblots (WB) oder Zymogramme (ZG) verwendet werden, so erfolgte die Extraktion in Phosphatpuffer (67 mmol * l⁻¹ Phosphat) mit einem pH Wert von 6,4. Sollte hingegen eine densitometrische Bestimmung der Proteinmengen von BGLU und HNL im Gel vorgenommen werden, so wurde ein Phosphatpuffer mit pH 4 verwendet. Der niedrige pH-Wert bedingt die Denaturierung der meisten Blattproteine. BGLU und HNL sind hingegen weniger stark bis kaum betroffen (WHITE et al. 1998), was die Quantifizierung erheblich vereinfacht. Für die Homogenisierung der Proben wurde ein Pistill verwendet, das anschließend mit 100 µl des jeweiligen Puffers gespült wurde. Danach wurden die Proben bei 4 °C für 20 Minuten mit 16.000 g zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge Fresco®). Die Überstände wurden in neue Eppendorf®-Tubes überführt und für 1 Stunde bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben über Nacht lyophilisiert, in 50 µl Ladepuffer (1x; Nativ oder SDS; s.u.) wieder aufgenommen und gelelektrophoretisch analysiert. Hierzu wurden je 25 µl der Proben auf das Gel aufgetragen.

Polyacrylamid Gelelektrophorese und Westernblot

Für das Gießen von SDS- und nativen Polyacrylamidgelen (PAGE; LAEMMLI 1970) wurden MiniGel-Kammern der Firma BioRad® (USA) verwendet. Die einzelnen Bestandteile der Gele wurden dem folgenden Pipettierschema (Tabelle 4.2.1) entsprechend in einem 50 ml Falcontube gemischt und in die Gelkammer überführt. Für die Anfertigung von nativen Gelen wurde das SDS weggelassen.

Tabelle 4.2.1: Pipettierschema für native und SDS-Gele

Zusammensetzung für ein BioRad MiniGel (Trenngel):

Gel [%]	d H ₂ O [ml]	40 % Acryl [ml]	*Puffer [ml]	10 % SDS [µl]	10 % APS [µl]	TEMED [µl]
5	3,07	0,63	1,25	50	25	2,5
12,5	2,11	1,57	1,25	50	25	2,5

* Tris-HCl 1,5 mol/l pH 8,8

Zusammensetzung für ein BioRad MiniGel (Sammelgel):

Gel [%]	d H ₂ O [ml]	40 % Acryl [ml]	*Puffer [ml]	10 % SDS [µl]	10 % APS [µl]	TEMED [µl]
5	1,5	0,312	0,62	25	12,5	2,5

* Tris-HCl 0,5 mol/l pH 6,8

Von den jeweiligen Proben (s.o.) wurden 25 µl auf das Gel aufgetragen. Bei SDS-Gele erfolgte vorab noch eine Inkubation der Aliquots für 5 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden abzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer der Firma BioRad (USA). Handelte es sich um SDS Gele wurde die Spannung für 30 Minuten auf 75 Volt eingestellt und anschließend für weitere 1,5 Stunden auf 120 Volt erhöht. Im Falle von nativen Gelen erfolgte die Auftrennung bei 4°C und mit einer konstanten Stromstärke von 16 Milliampere über Nacht.

Laufpuffer SDS-Gel 10x:

30 g Tris; 144 g Glycin; 10 g SDS (mit destilliertem Wasser 1 Liter aufgefüllt)

SDS Loading Buffer 5x:

1,54 g DTT; 2 g SDS; 8 ml Tris-HCL (1 mol/l pH 6,8); 10 ml Glycerol; eine Spatelspitze Bromphenolblau (mit destilliertem Wasser auf 20 ml auffüllen)

Der Puffer wurde in Aliquots zu 1,5 ml bei -24 °C gelagert.

Laufpuffer natives Gel 10x:

30 g Tris; 144 g Glycin (mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen)

Nativer Loading Buffer 5x:

1,54 g DTT (alternativ); 8 ml Tris-HCL (1 mol/l pH 6,8); 10 ml Glycerol; eine Spatelspitze Bromphenolblau (mit destilliertem Wasser auf 20 ml auffüllen)

Proteinfärbung mittels Colloidal-Coomassie

War eine Quantifizierung der Proteinmengen vorgesehen, erfolgte die Färbung der Gele bzw. Proteine mit Hilfe von Coomassie Brilliant BlueG-250. Hierzu wurden die Gele zunächst für eine Stunde in einer Fixierlösung aus 40 % Methanol und 10 % Essigsäure inkubiert. Dabei wurde die Fixierlösung 3-mal gewechselt.

Für die Herstellung der Färbelösung wurden zunächst zwei Stocklösungen A und B angefertigt. A bestand aus 2 % Phosphorsäure und 10 % Ammoniumsulfat in destilliertem Wasser. Bei Lösung B handelte es sich um 5 % Coomassie Brilliant BlueG-250 in destilliertem Wasser. Um die Färbelösung zu erhalten, wurden 98 % von Lösung A mit 2 % der Lösung B gemischt. Anschließend wurde die Färbelösung über Nacht gerührt. Vor Gebrauch wurde ein Aliquot der Lösung mit 20 % Methanol vermischt und anschließend zu dem jeweiligen Gel gegeben. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln für 2 bis 8 Stunden. Abschließend wurde das Gel für 2 Stunden in einer 20 %igen Methanollösung entfärbt und zur Dokumentation sowie für weitere Auswertungen gescannt (HP Scanjet G4010). Sollte der Proteingehalt verschiedener Proben miteinander verglichen werden, so wurden diese immer auf ein und dasselbe Gel aufgetragen, um Abweichungen, die sich im Rahmen des Scannens ergeben können, zu vermeiden.

Enzymaktivitätsfärbung

Zur Erstellung der BGLU-Zymogramme wurden die Gele nach Abschluss der elektrophoretischen Trennung zunächst für 1 Stunde bei RT in Citratpuffer (50 mmol * l⁻¹ Citrat; 100 mmol * l⁻¹ Phosphat; pH 5,6) inkubiert. Die Lösung wurde während des Zeitraumes 4-mal gewechselt. Anschließend wurden 200 µl Substratlösung hinzugegeben. Als Substrat diente X-Glu (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside), welches in DMSO aufgenommen wurde. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und unter ständigem Schütteln über Nacht. Abschließend wurden die Gele zur Dokumentation sowie für weitere Auswertungen gescannt (HP Scanjet G4010). Sollte die Enzymaktivität verschiedener Proben miteinander verglichen werden, so wurden diese immer auf ein und dasselbe Gel aufgetragen, um Abweichungen, die sich im Rahmen des Scannens ergeben können, zu vermeiden.

Bestimmung der Bandenintensitäten

Für die Bestimmung der Bandenintensitäten wurde das Programm ImageJ verwendet. In dieses konnten die Bilder der gescannten Gele direkt eingelesen werden. Um zunächst die Präzision der gewählten Analysenmethode zu prüfen, wurden definierte Mengen eines Proteinmarkers auf ein Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel gescannt und die mittels ImageJ ermittelten Bandenintensitäten mit dem tatsächlichen Proteingehalt bzw. dem aufgetragenen Markervolumen verglichen. Bezüglich der einzelnen miteinander verglichenen Banden ergab sich hierbei ein

Bestimmtheitsmaß von 0,97 bis 0,99 (siehe Abbildung 4.2.1). Die Methode wurde daher für die Analyse der PAGE ausgewählt.

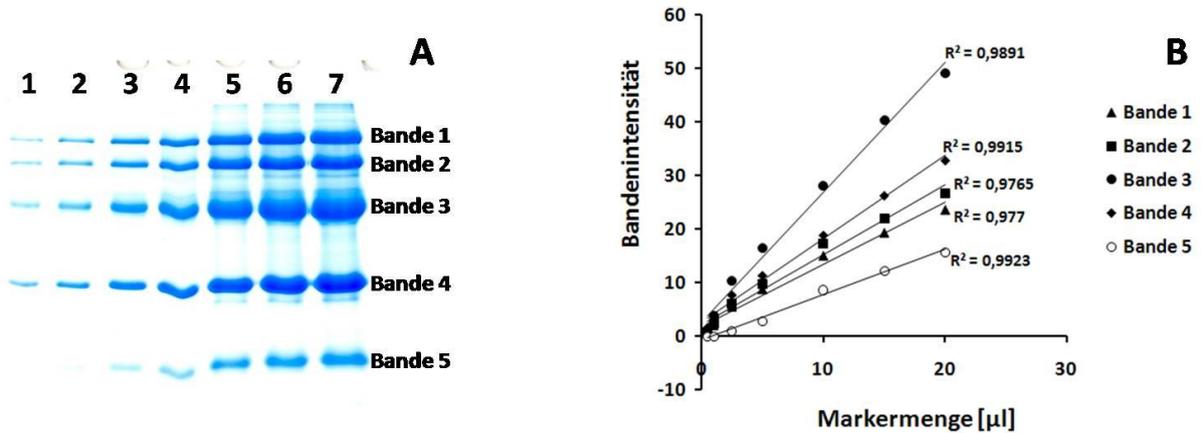


Abbildung 4.2.1: Genauigkeit der Analyse von Proteinmengen im PAGE mittels ImageJ

Für die Untersuchung wurden zunächst definierte Mengen eines Markers (Amersham Biosciences®) auf ein Polyacrylamidgel (A) aufgetragen. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels Coomassie Brilliant BlueG-250. Das Gel wurde gescannt (HP Scanjet G4010) und die Intensität der Banden mit Hilfe von ImageJ bestimmt. Die Intensität wurde gegen die Markeremenge aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt (B). Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt Auskunft über die Genauigkeit der Analyse. Der Wert für R^2 sollte nach Möglichkeit über 0,9 liegen.

A. Ergebnis des Gel-Scans; Bahn 1: 0,5 µl Marker; Bahn 2: 1 µl Marker; Bahn 3: 2,5 µl Marker; Bahn 4: 5 µl Marker; Bahn 5: 10 µl Marker; Bahn 6: 15 µl Marker; Bahn 7: 20 µl Marker

Immunodetektion phosphorierter Proteine

Gele, die für das Immunoblotting verwendet werden sollten, wurden immer doppelt angesetzt. So konnte eines der Gele mittels Colloidal-Coomassie (s.o.) gefärbt werden, was einen direkten Vergleich zum Blot ermöglichte. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele zunächst für 30 Minuten in Blotlösung inkubiert. Diese bestand aus 1x SDS-Laufpuffer (s.o.), der zusätzlich 20 % Methanol enthielt. Als Membran wurde Nitrocellulose (NC) verwendet. Alle Komponenten des Blotsandwiches wurden vor dem Zusammensetzen ebenfalls in Blotlösung eingeweicht und in dieser luftblasenfrei zusammengesetzt. Das Blotsandwich setzte sich wie folgt zusammen: Außen befand sich zunächst ein Schwamm auf den 3 Lagen Filterpapier folgten. Auf dem Papier wurde die NC-Membran platziert. Daraufhin folgte das Gel, wobei darauf geachtet wurde, dass sich zwischen Gel und Membran keinerlei Lufteinschlüsse befanden. Auf das Gel wurden 4 weitere Lagen Filterpapier gelegt. Abschließend folgte ein weiterer Schwamm. Das so erhaltene Sandwich wurde mit einem zur Blotapparatur gehörenden Halter (Mini Protean 2 BioRad®) verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 Milliampere für 1 Stunde. Anschließend wurde die Membran sofort in eine Blocklösung überführt. Diese bestand aus PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline Solution; pH 7), der 5 % BSA enthielt. Nach einstündiger Inkubation während derer die Lösung 1-mal gewechselt wurde,

wurde ein Phospho- Serin/ -Threonin /-Tyrosin-spezifischer Antikörper (Phospho-AK; Sigma Aldrich) in einer 1 zu 10.000 Verdünnung hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Phospho-AK erfolgte bei RT über einen Zeitraum von 2 Stunden. Anschließend wurde die Membran 4x in PBS-BSA-Lösung für jeweils 10 Minuten gewaschen. Beim ersten Waschschrift enthielt die Lösung zusätzlich 0,05 % Tween, um unspezifisch anhaftenden AK besser lösen zu können. Der sekundär AK (Sigma Aldrich) war mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Er wurde in einer 1 zu 100 Verdünnung verwendet. Der Blot wurde in der entsprechenden Lösung für eine Stunde bei Rt inkubiert. Anschließend wurde die Membran, wie zuvor beschrieben, gewaschen. Daraufhin folgten noch zwei Waschschriffe a 10 Minuten in PBS Lösung.

Für die Färbung des Blots mittels Nitroblautetrazolium und Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat (NBT BCIP) wurden zunächst die folgenden Stammlösungen angesetzt:

- a. 25 mg BCIP in destilliertem Wasser
- b. 50 mg NBT in 70 % Dimethylformamid
- c. $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Magnesiumchlorid in destilliertem Wasser
- d. $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumchlorid in destilliertem Wasser
- e. $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris-HCl pH 8,9

Zum Erstellen der Gebrauchslösung wurden 200 μl von Lösung a, 200 μl von Lösung b, 150 μl von Lösung c, 600 μl von Lösung d, und 6 ml von Lösung e mit destilliertem Wasser auf 30 ml aufgefüllt. In der so erhaltenen Färbelösung wurde der Blot so lange inkubiert, bis einzelne Banden deutlich hervortraten.

Massenspektroskopische Analyse der Proteinbanden

Die Massenspektroskopischen Analysen, sowie die Auswertung der Daten wurden am Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) in Hamburg von Herrn Buck durchgeführt.

Vorhersage potentieller Phosphorylierungsstellen

Die Vorhersage potentieller Phosphorylierungsstellen erfolgte auf Basis der Aminosäure-Sequenz unter Verwendung des Programmes NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/).

4.3 Ergebnisse

NO-Synthese in verletztem Blattgewebe von *H. brasiliensis*

Im Rahmen dieser und der folgenden Versuche wurden Blätter der bereits zuvor untersuchten *H. brasiliensis* Pflanzen 1, 2, 3, 4, und 5 verwendet. Genutzt wurde auch Blattmaterial weiterer Pflanzen, die mit den Nummern 6, 7, 8, 9 und 10 bezeichnet werden. Bezüglich der Tests zur NO-Freisetzung wurden ausschließlich C-Stadien beprobt. Die entsprechenden Blattflächen wurden direkt nach Verletzung ausgestanzt und auf einen Objektträger mit DAF-2 DA Lösung aufgebracht. Die NO-Synthese wurde innerhalb von 5 Minuten am Konfokal-Lasermikroskop analysiert und dokumentiert. Als Kontrolle dienten sowohl Blattscheiben, die in Pufferlösung ohne DAF-2 DA inkubiert wurden, als auch solche bei denen der Puffer zusätzlich den NO-Scavenger cPTIO enthielt.

Es zeigte sich, dass im Bereich um die Verletzung herum bereits nach 5 Minuten eine detektierbare Menge an NO freigesetzt wurde. Nach 10 Minuten scheint diese noch einmal geringfügig erhöht. Da aber immer verschiedene Einstiche dokumentiert wurden ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Auffällig ist die Variation bezüglich der NO-Menge zwischen den einzelnen Verletzungen (siehe Abbildung 4.3.1). Sie könnte auch der Grund, für das nach 10 Minuten scheinbar stärkere Signal sein.

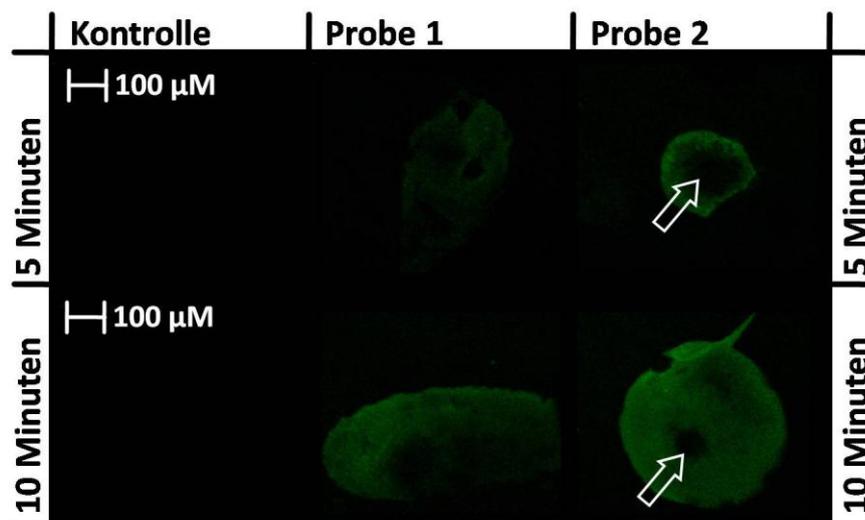


Abbildung 4.3.1: Verletzungsbedingte NO-Freisetzung aus Blattgewebe von *H. brasiliensis*

Für die Versuche wurden Blätter des C-Stadiums verwendet. Teile der Spreiten wurden mit einer Präpariernadel verletzt und ausgestanzt. Die Blattscheiben wurden sofort auf einen Objektträger mit DAF2 DA-Lösung überführt und analysiert. Die Parallelproben 1 und 2 stammten von derselben Pflanze. Weiße Pfeile markieren den Bereich des Einstiches.

Es muss allerdings festgehalten werden, dass eine vollständige Inhibition der NO-Synthese mittels cPTIO nicht gelang (Daten nicht gezeigt). Zwar kann eine verletzungsbedingte Autofluoreszenz ausgeschlossen werden, da im Falle der Kontrollen ohne DAF-2 DA keinerlei Fluoreszenz festzustellen

war (siehe Abbildung 4.3.1). DA-2 DA kann aber unter Umständen auch mit anderen Molekülen als NO reagieren. Kreuzreaktionen können daher nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Auf der anderen Seite erwies sich die Infiltration der *H. brasiliensis* Blätter in der Regel als schwierig. So war bei Inkubation verletzter Blattscheiben in Toluidin-Blau-Lösung auch nach 24 Stunden oftmals nur eine marginale Färbung des Gewebes festzustellen (siehe Abbildung 4.3.2). Zwar ist cPTIO zellpermeabel, die offensichtlich schlechte Benetzbarkeit der Blätter könnte aber dazu geführt haben, dass das kurze Eintauchen der Blattscheiben in die Inhibitorlösung nicht genügte um ausreichend cPTIO für ein Abfangen des gesamten NOs zur Verfügung zu stellen und die Synthese effektiv zu inhibieren. Auch die Inkubationslösung auf dem Objektträger enthielt cPTIO. Doch dieses konnte bestenfalls ähnlich schnell wie das ebenfalls enthaltene DAF-2 DA in das Blattgewebe gelangen.

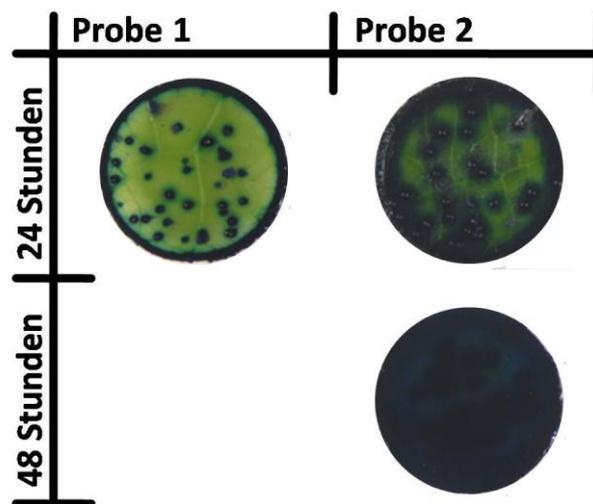


Abbildung 4.3.2: Infiltration verletzter Blattscheiben von *H. brasiliensis* mit Toluidin-Blau

Gewebe von Blättern des C-Stadiums wurden mit einer Präpariernadel verletzt. Die verletzten Bereiche der Spreite wurden ausgestanzt und in Toluidin-Blau-Lösung überführt. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation wurden die Blattscheiben am Binokular analysiert. Probe 1 und Probe 2 stammen von unterschiedliche Pflanzen.

LIN- und HNL-Aktivität nach NO-Behandlung

Um zu überprüfen ob NO überhaupt Einfluss auf die Aktivität der LIN bzw. BGLU hat wurden zunächst sowohl ganze Blätter als auch Blatthomogenate und Enzymextrakte mit dem NO-Donor SNP inkubiert. SNP wurde in einer Konzentration von $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden im Licht, um einen kompletten Zerfall des SNP zu gewährleisten.

Im Überstand der Proben von Pflanze 5, die sofort nach Homogenisation vermessen wurden, konnte eine BGLU-Aktivität von $0,26 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: 0 Wert) festgestellt werden (siehe Abbildung 4.3.3 A). Nachdem der Überstand unter regelmäßigem Schütteln für 6 Stunden bei

Raumtemperatur (Rt) inkubiert worden war, hatte sich die BGLU-Aktivität um einen Faktor von 1,7 auf $0,49 \pm 0,08 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: KT Ü = Kontrolle Überstand) erhöht. Selbiges war festzustellen, wenn das gesamte Homogenat für die Inkubation bei Rt verwendet wurde. In diesem Fall stieg die BGLU-Aktivität im anschließend gewonnen Überstand um den Faktor 1,9 auf $0,54 \pm 0,07 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: KT Hg = Homogenat). Die Zugabe von SNP zu den Inkubationen änderte hingegen nichts an der BGLU-Aktivität. Im Falle der Verwendung des Überstandes betrug sie $0,49 \pm 0,09 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: SNP Ü) und bezüglich des gesamten Homogenates $0,54 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: SNP Hg). Die BGLU-Aktivität unterscheidet sich damit nicht von den jeweiligen Kontrollwerten.

Bei Verwendung ganzer Blätter wurden diese mit der Unterseite auf SNP-haltige Pufferlösung in einer Petrischale gelegt. Nach Verschließen der Petrischale wurden die Blätter ebenfalls für 6 Stunden bei RT inkubiert. Die Kontrollblätter, die auf Pufferlösung ohne SNP lagen, wiesen nach Ablauf der Inkubationszeit eine BGLU-Aktivität von $0,26 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: KT gB = ganzes Blatt) auf. In Blättern die mit SNP inkubiert wurden betrug sie $0,36 \pm 0,03 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: SNP gB). Dies entspricht einem Aktivierungsfaktor (AF) von knapp 1,4. Bei Inkubation ganzer Blätter scheint die BGLU-Aktivität damit in Gegenwart von NO geringfügig erhöht zu sein. Eine Aktivitätserhöhung, wie sie im Falle mechanischer Verletzung auftritt ist jedoch nicht festzustellen.

SNP wird oft in einer Konzentration von $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ verwendet (FLORYSZAK-WIECZOREK et al. 2006). Allerdings berichten die Autoren auch, dass die NO-Donorkonzentration in einigen Experimenten entscheidend dafür war, ob eine Reaktion seitens des Gewebes festgestellt werden konnte oder nicht. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit unterschiedlichen Donorkonzentrationen wiederholt. Da auch GSNO Cysteinreste nitrosilieren kann, es sich bei diesen aber offensichtlich um Cysteinreste handelt, die keine NO-bedingte Nitrosilierung erfahren (LINDERMAYR et al. 2005), wurden zusätzliche Inkubationen mit GSNO durchgeführt. Die SNAP- bzw. GSNO-Konzentrationen wurden in den jeweiligen Ansätzen auf 10, 100, 500 und $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingestellt. Genutzt wurde jeweils das gesamte Homogenat, nicht der Überstand. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden wies die Kontrolle (Probenbezeichnung: Intakt) eine BGLU-Aktivität von $1,46 \pm 0,43 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 2) auf. Mechanische Verletzung des Gewebes bewirkte eine Erhöhung der Aktivität auf $10,63 \pm 0,18 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Probenbezeichnung: Zerstört), was einem AF von 7,3 entspricht (siehe Abbildung 4.3.3 B). Inkubation mit SNAP und GSNO hatte, unabhängig von der Konzentration, in allen Proben eine Verringerung der BGLU-Aktivität zur Folge. So betrug sie bei $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ SNAP $1,10 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ und bei derselben Konzentration an GSNO $1,01 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bezüglich der AFs ergaben sich Werte von 0,8 (SNAP) und 0,7 (GSNO). Bei $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ SNAP bzw. GSNO lag die Enzymaktivität bei $0,99 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (SNAP) und $0,91 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (GSNO). Auch eine Erhöhung der

Donorkonzentrationen auf $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ änderte nichts. Die BGLU-Aktivität betrug lediglich $0,99 \pm 0,03 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (SNAP) bzw. $0,97 \pm 0,02 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (GSNO) (siehe Abbildung 4.3.3 B). Offenbar haben weder NO noch GSNO Einfluss auf die BGLU- bzw. LIN-Aktivität.

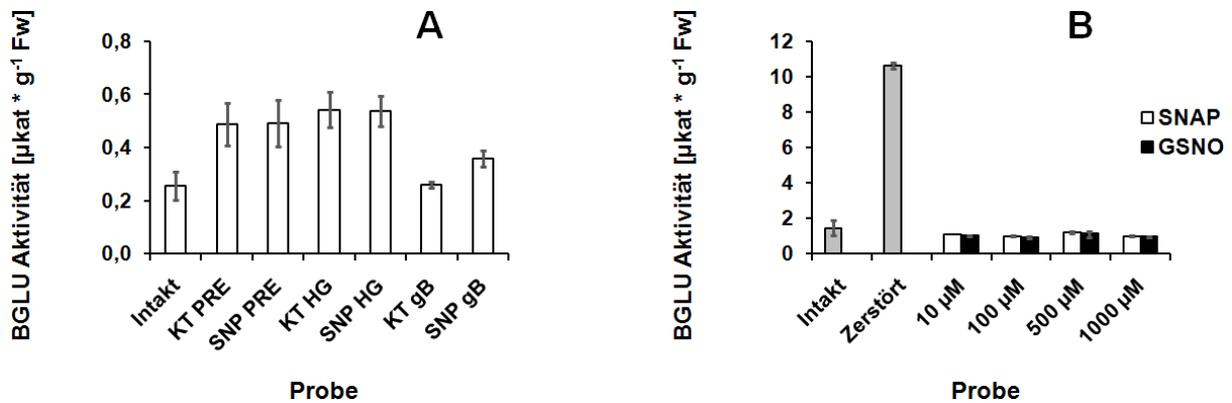


Abbildung 4.3.3: Einfluss von NO auf die Aktivität der BGLU aus *H. brasiliensis*

Ganze Blätter, Blatthomogenate und Proteinrohextrakte von *H. brasiliensis* wurden mit unterschiedlichen Mengen der NO-Donatoren SNP, SNAP und GSNO inkubiert. Anschließend wurde die BGLU-Aktivität in den Proben gemessen.

A. Intakt: BGLU-Aktivität im Proteinrohextrakt aus intaktem Gewebe direkt nach der Extraktion; KT PRE: Proteinrohextrakt -SNP; SNP PRE: Proteinrohextrakt +SNP; KT HG: Homogenat -SNP; SNP HG: Homogenat +SNP; KT gB: ganzes Blatt -SNP; SNP gB: ganzes Blatt +SNP

B. Intakt: BGLU-Aktivität bei Extraktion von intaktem Gewebe; Zerstört: BGLU-Aktivität bei Extraktion von verletztem Gewebe; 10 - 1000 μM : BGLU-Aktivität nach Inkubation der Proteinrohextrakte mit SNAP bzw. GSNO der entsprechenden Konzentration

In Bezug auf HNL wurden zunächst sowohl ganze Blätter als auch Blatthomogenate mit NO-Donatoren inkubiert und auf mögliche Veränderungen der Enzymaktivität hin untersucht. Verwendet wurde eine SNP- bzw. GSNO-Konzentration von $500 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Im Kontrollansatz (Probenbezeichnung: KT = Kontrolle) betrug die HNL-Aktivität $2,9 \pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2). Inkubation des Homogenats mit SNP bedingte eine Abnahme der Enzymaktivität auf $2,3 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Probenbezeichnung: SNP Hg = Homogenat). Dies entspricht einem AF von 0,8. Selbiges zeigte sich bei Inkubation mit GSNO. Hier lag die HNL-Aktivität ebenfalls bei $2,3 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Probenbezeichnung: GSNO Hg). Auch wenn ganze Blätter mit SNP inkubiert wurden, nahm die HNL-Aktivität ab und betrug $2,4 \pm 0,5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Probenbezeichnung: SNP gB = ganzes Blatt) (siehe Abbildung 4.3.4 A).

Um, wie auch zuvor, ein Problem bezüglich der Donorkonzentration ausschließen zu können, wurden die Inkubationen mit 10, 100, 500 und 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ SNAP bzw. GSNO wiederholt. Im intakten Gewebe (Probenbezeichnung: Intakt) lag die HNL-Aktivität bei $0,89 \pm 0,35 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 3). Mechanische Verletzung des Gewebes hatte einen Anstieg auf $4,76 \pm 1,27 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ zur Folge, was einem AF von 5,4 entspricht (siehe Abbildung 4.3.4 B). Die Inkubation mit SNAP oder GSNO hatte

bei keiner der Konzentrationen einen vergleichbaren Anstieg der Enzymaktivität zur Folge. Zwar war sie im Gegensatz zur vorherigen Messung bei einigen Proben leicht erhöht, jedoch betrug der höchste gefundene AF lediglich 1,3 (Probe: SNAP 100 μM). Bei einer Donorkonzentration von 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ wurden HNL-Aktivitäten von $0,80 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (SNAP) und $0,81 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (GSNO) gemessen. Die Aktivitäten liegen hier somit erneut leicht unter dem Kontrollwert. Bei 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ SNAP bzw. GSNO betrug die Enzymaktivitäten $1,13 \pm 0,25 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (SNAP) und $0,93 \pm 0,07 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (GSNO). Auch bei einer Donorkonzentration von 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ wurden HNL-Aktivitäten von lediglich $0,99 \pm 0,13 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (SNAP) und $0,60 \pm 0,02 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (GSNO) gemessen (siehe Abbildung 4.3.4 B). Auch im Falle von HNL haben offensichtlich weder NO noch GSNO nennenswerten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Eine Aktivierung von LIN und HNL durch Nitrosilierung kann somit aller Wahrscheinlichkeit nach ausgeschlossen werden.

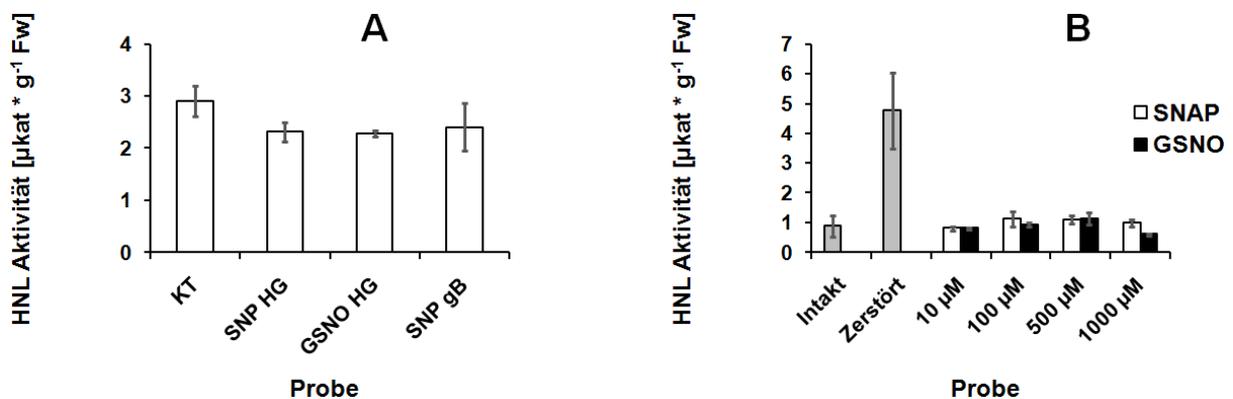


Abbildung 4.3.4: Einfluss von NO auf die Aktivität der HNL aus *H. brasiliensis*

Ganze Blätter, Blatthomogenate und Proteinrohextrakte von *H. brasiliensis* wurden mit unterschiedlichen Mengen der NO-Donatoren SNP, SNAP und GSNO inkubiert. Anschließend wurde die HNL-Aktivität in den Proben gemessen.

A. KT: HNL-Aktivität im Homogenat -SNP; SNP HG: Homogenat +SNP; GSNO HG: Homogenat +SNP; SNP gB: ganzes Blatt +SNP

B. Intakt: HNL-Aktivität bei Extraktion von intaktem Gewebe; Zerstört: HNL-Aktivität bei Extraktion von verletztem Gewebe; 10 - 1000 μM : HNL-Aktivität nach Inkubation der Proteinrohextrakte mit SNAP bzw. GSNO der entsprechenden Konzentration

LIN-Aktivität nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid

Nicht nur in Gegenwart von NO kann eine Modifikation von Cysteinresten erfolgen. Auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann diese, hier mittels Oxidation, verändern und so Einfluss auf Proteinfunktionen und Enzymaktivitäten nehmen. Wie auch NO kann H_2O_2 als Reaktion auf Gewebeverletzung synthetisiert werden (siehe Seite 134). Analog zur Inkubation der *H. brasiliensis* Blatthomogenate mit NO-Donatoren, wurden daher auch Versuche mit H_2O_2 durchgeführt. Die Homogenate wurden, nach Zugabe der jeweiligen H_2O_2 Menge, für 2,5 Stunden bei RT und unter regelmäßigem Schütteln inkubiert.

Das Kontrollhomogenat aus unverletztem Blattgewebe der Pflanze 6 wies nach Ablauf der Inkubationszeit eine BGLU-Aktivität von $0,69 \pm 0,02 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ auf (siehe Abbildung 4.3.5). Mechanische Verletzung mittleren Grades (siehe Kapitel 1) bewirkte einen Anstieg auf $2,73 \pm 0,12 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Bei Zugabe von 0,125 % H_2O_2 zu den Homogenaten wurde, im Falle des unverletzten Gewebes, eine BGLU-Aktivität von $0,87 \pm 0,01 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Sie ist somit gegenüber der Kontrolle um einen Faktor von 1,3 erhöht. Bei einer H_2O_2 Menge von 0,25 % lag die Aktivität dann bei $0,77 \pm 0,04 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$, was keiner nennenswerten Aktivitätszunahme mehr entspricht. Mit steigendem H_2O_2 Gehalt war eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität festzustellen. Bei 5 % betrug sie lediglich $0,22 \pm 0,02 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$, was einem AF von 0,3 entspricht. Interessanter Weise konnte auch im Falle der Homogenate, bei denen schon eine BGLU-Aktivierung durch mechanische Verletzung stattgefunden hatte, nach Inkubation mit 0,125 % H_2O_2 eine leichte Aktivitätserhöhung festgestellt werden. Die BGLU-Aktivität betrug $3,85 \pm 0,25 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$, der AF somit 1,4. Auch bei 0,25 % H_2O_2 war noch ein Anstieg gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Hier wurde eine Aktivität von $3,59 \pm 0,20 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Der AF beträgt also 1,3. Bei höheren Wasserstoffperoxidgehalten war auch im Falle der Homogenate aus verletztem Blattgewebe eine deutliche Abnahme der BGLU-Aktivität festzustellen. Bei 5 % H_2O_2 sank sie auf $0,89 \pm 0,14 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Der AF beträgt hier ebenfalls 0,3.

Wasserstoffperoxid kann somit, wenn in geringen Mengen vorhanden, eine leichte Erhöhung der BGLU- bzw. LIN-Aktivität bewirken. Dieser Effekt scheint aber unabhängig von der bei mechanischer Verletzung auftretenden Aktivierung zu sein, da er bei Homogenaten aus unverletztem wie auch verletztem Blattgewebe in gleichem Maße zu beobachten ist. Größere Mengen an Wasserstoffperoxid führen zu einer Abnahme der Enzymaktivität.

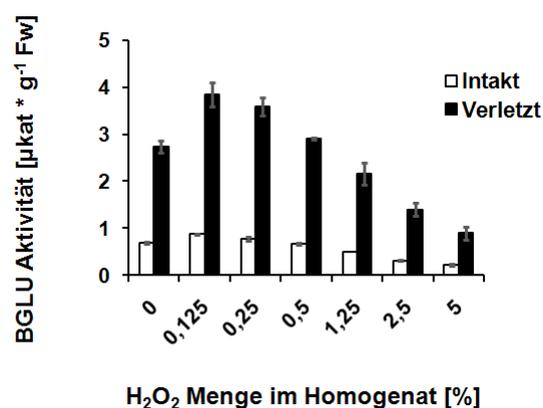


Abbildung 4.3.5: Einfluss von H_2O_2 auf die Aktivität der BGLU aus *H. brasiliensis*

Homogenate aus intakten und verletzten Blättern von *H. brasiliensis* wurden mit unterschiedlichen Mengen (siehe X-Achse) an Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend wurde die BGLU-Aktivität in den Proben bestimmt.

Untersuchung von LIN und HNL auf verletzungsbedingte Phosphorylierung

Die Phosphorylierung ist eine häufige posttranslationale Modifikation von Proteinen. Mittels Phosphorylierung werden in vielen Fällen Proteinfunktionen moduliert und Enzymaktivitäten verändert (siehe Seite 134). Es ist daher denkbar, dass eine Phosphorylierung auch die Aktivierung von LIN und HNL bedingt.

Zunächst wurde anhand der Sequenzen überprüft ob die beiden Proteine überhaupt potentielle Phosphorylierungsstellen aufweisen. Die Sequenz der LIN wurde im Rahmen der Arbeiten zum zweiten Kapitel aufgeklärt, die HNL-Sequenz findet sich in der Datenbank des NCBI unter der Accession Nummer U40402. Die Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen erfolgte mit Hilfe des Programmes NetPhos 2.0. Bezüglich LIN ergab sich eine Gesamtzahl von 34 potentiellen Phosphorylierungsstellen. Bei 17 von diesen handelte es sich um Serinreste, bei 5 um Threoninreste und bei 12 um Tyrosinreste (siehe Tabelle 4.3.1). Dem Programm NetPhos 1.0 zu Folge ist eine Serinphosphorylierung durch PKC am wahrscheinlichsten. PKC wird durch DAG aktiviert, welches in Zusammenhang mit der IP_3 Synthese entsteht (siehe Seite 22 und 23). Eine schnelle IP_3 Akkumulation in Zusammenhang mit Gewebeerletzung wurde beschrieben (Artikel). Möglicher Weise wird somit PKC verletzungsbedingt aktiviert und könnte u.a. für die Phosphorylierung von LIN sorgen. Allerdings ist aktive PKC, zumindest bei Tieren, mit der cytosolischen Seite der Plasmamembran assoziiert (siehe Seite 23). LIN ist hingegen im Apoplasten und offenbar auch in den Vakuolen einiger Blattzellen lokalisiert (siehe Seite 119 und 120).

Tabelle 4.3.1: Potentielle Phosphorylierungsstellen der LIN aus *H. brasiliensis*

Die potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden mit Hilfe des Programmes NetPhos 2.0 ermittelt. Sie wurden anhand der AS-Sequenz des Proteins berechnet.

Serin			Threonin			Tyrosin		
Position	Sequenzmotiv	Score	Position	Sequenzmotiv	Score	Position	Sequenzmotiv	Score
40	EDFSSSYFP	0.599	63	EGEATTKGR	0.957	172	LEDKYGGFL	0.820
41	DFSSSYFPD	0.730	64	GEATTKGRG	0.609	185	VYDYEYAN	0.615
54	GTATSAYQI	0.537	318	TYPRTVRDL	0.736	216	SGFSYDDGV	0.729
70	GRGPSVWDT	0.996	377	HITETPYDY	0.946	244	ATEPYIVAH	0.665
87	ILDGSGNDV	0.890	531	IYEVTSRNS	0.897	354	YTSYYAKPN	0.783
117	GFRMSISWS	0.993				379	TETPYDYDG	0.925
126	RVIPSGRRR	0.956				396	SSWFYIFPK	0.541
210	NEPWSLSGF	0.533				413	TKDTYNNPV	0.953
215	LSGFSYDDG	0.996				474	FAWSYLDNF	0.505
286	YEPLSNEPA	0.900				492	FGLYYVDYK	0.886
341	FLRGSYDFL	0.732				495	YYVDYKDNL	0.852
473	YFAWSYLDN	0.961				528	SNKIYEVT S	0.839
506	YPKDSAKWF	0.993						
517	FLKHSPKPK	0.995						
524	KPLQSNKIY	0.605						
532	YEVTSRNSR	0.577						
535	TSRNSRKVG	0.997						

HNL weist insgesamt 15 potentielle Phosphorilierungsstellen auf. Davon sind 4 Serinreste, 3 Threoninreste und 8 Tyrosinreste (siehe Tabelle 4.3.2). Als wahrscheinlichste Phosphorilierung führt das Programm NetPhos 1.0, die von Cystein durch PKA an. PKA wird in Gegenwart von cAMP aktiviert. Ob cAMP in Zusammenhang mit Gewebeverletzung akkumuliert wird ist nicht bekannt. PKA ist aber im Cytosol lokalisiert (siehe Seite 22 und 23), was zumindest auch für einen Teil der HNL zu gelten scheint (siehe Seite 124).

Tabelle 4.3.2: Potentielle Phosphorilierungsstellen der HNL aus *H. brasiliensis*

Die potentiellen Phosphorilierungsstellen wurden mit Hilfe des Programmes NetPhos 2.0 ermittelt. Sie wurden anhand der AS-Sequenz des Proteins berechnet.

Serin			Threonin			Tyrosin		
Position	Sequenzmotiv	Score	Position	Sequenzmotiv	Score	Position	Sequenzmotiv	Score
41	DLAASGVDP	0.983	131	DWKDTTYFT	0.818	57	SFDEYSEPL	0.959
53	EEIGSFDEY	0.726	137	YFTYTKDGK	0.663	93	AADKYCEKI	0.778
115	EHCPSYVVD	0.602				116	HCP SYVVDK	0.864
196	EGYGSIKKI	0.952				133	KDTTYFTYT	0.680
						158	RENLYTLCG	0.849
						166	GPEEYELAK	0.647
						194	TKEGYGSIK	0.966
						201	IKKIYVWTD	0.648

Aufgrund dieser Befunde wurde sowohl LIN als auch HNL auf eine verletzungsbedingte Phosphorilierung untersucht. Hierzu wurden Proteinextrakte aus intaktem und verletztem Blattgewebe zunächst gelelektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde anschließend für einen Western-Blot verwendet. Die Detektion phosphorilierten Proteins erfolgte mit Hilfe eines Serin- / Threonin- / Tyrosin-Phosphat-spezifischen Antikörpers (Phospho-AK) (Sigma Aldrich). Der Sekundär-AK (Sigma Aldrich) war mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Die Färbung des Blots erfolgte dementsprechend mittels NBT-BCIP. Interessanter Weise bedingt die mechanische Gewebeverletzung in der Tat die Phosphorilierung mindestens eines Proteins (siehe Abbildung 4.3.6). Die entsprechende Bande ist mit einem Stern markiert. Allerdings handelte es sich bei dem Protein weder um LIN noch um HNL. An den Positionen der beiden Enzyme fand sich keinerlei Signal. Eine Phosphorilierung von LIN oder HNL in Zusammenhang mit mechanischer Verletzung findet offenbar nicht statt. Eine Aktivierung der beiden Enzyme durch Phosphorilierung kann somit höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden.

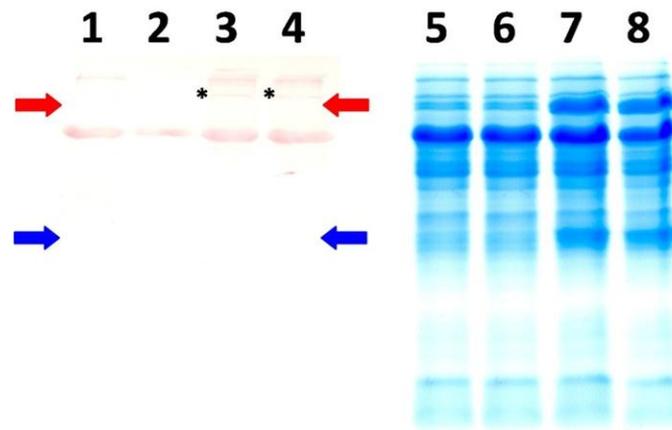


Abbildung 4.3.6: AK-Detektion phosphorilierter Proteine in *H. brasiliensis* Blattextrakten aus intaktem und verletztem Gewebe

Rohproteinextrakte aus intaktem und verletztem Blattgewebe von *H. brasiliensis* wurde auf zwei Polyacrylamidgele aufgetragen. Eines der Gele wurde für die Proteinfärbung mittels Coomassie verwendet (Bahn 5 - 8). Das zweite wurde für einen Western-Blot genutzt. Auf der Blot-Membran wurden anschließend phosphorilierte Proteine mittels Antikörper detektiert. Die Färbung erfolgte unter Verwendung von NBT-BCIP (Bahn 1 - 4).

Bahn 1 und 2: Protein aus intaktem Blattgewebe; Bahn 3 und 4: Protein aus verletztem Blattgewebe; Bahn 5 und 6: Protein aus intaktem Blattgewebe; Bahn 7 und 8: Protein aus verletztem Blattgewebe; Rote Pfeile markieren den Bereich in dem sich BGLU befindet, blaue Pfeile den in dem HNL zu finden ist. Die Sterne markieren eine Proteinbande, die nach Gewebeverletzung eine Phosphorylierung aufweist.

BGLU-Aktivität nach Inkubation mit Inositolphosphaten

Überprüft wurde auch ob IP_3 selbst, oder aber andere IPs, einen direkten Einfluss auf die Aktivität von BGLU und HNL haben. Hierzu wurden, analog zu den Messungen mit NO-Donatoren, Blatthomogenate für 2,5 Stunden unter Zugabe von IP-Mix inkubiert. Zusätzlich wurden Blattscheiben mit IP-Lösung infiltriert und ebenfalls für 2,5 Stunden in dieser inkubiert. Die IP-Konzentration in den Inkubationsansätzen wurde auf 5, 10 und 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eingestellt. Für die Infiltration der Blattscheiben wurde IP-Lösung der Konzentration 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ verwendet.

Die BGLU-Aktivität im Kontrollansatz von Pflanze 7 betrug $1,12 \pm 0,11 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.9). Inkubation bei einer IP-Konzentration von 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ resultierte in einer Aktivität von $1,06 \pm 0,10 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ und einem AF von 0,9. Bei erhöhter IP-Konzentration ergaben sich ähnliche Werte. Diese betragen $0,88 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und $0,96 \pm 0,13 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), was AFs von 0,8 und 0,9 entspricht (siehe Abbildung 4.3.7).

Bezüglich der mit IP-Lösung infiltrierten Blattscheiben wurde ein BGLU-Aktivität von $0,83 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Die Kontrolle hingegen, die lediglich mit Puffer infiltriert wurde, wies einen Wert von $1,06 \pm 0,13 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.7).

Wenn überhaupt, dann lässt sich eine BGLU-Aktivitätsabnahme in Zusammenhang mit IPs feststellen. In jedem Fall haben sie keinerlei direkten Einfluss auf den Aktivierungsprozess des Enzyms.

Die HNL-Aktivität im Kontrollhomogenat (Pflanze 7) betrug $1,09 \pm 0,19 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Inkubation in Gegenwart von IPs hatte Werte von $0,82 \pm 0,08 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $0,83 \pm 0,08 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und $0,64 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) zur Folge. Dies entspricht AFs von 0,8 (5 und $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und 0,6 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (siehe Abbildung 4.3.7).

Die mit Pufferlösung infiltrierten Blattscheiben wiesen eine HNL-Aktivität von $1,13 \pm 0,14 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ auf. Bei Infiltration mit IP-haltiger Pufferlösung wurde eine Enzymaktivität von $0,86 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen (siehe Abbildung 4.3.7). Der AF beträgt auch hier 0,8. Sollten IPs Einfluss auf die HNL-Aktivität haben, dann bewirken sie eine Aktivitätsabnahme. Letztere könnte allerdings auch mit anderen Komponenten der IP-Lösung in Zusammenhang stehen, die jene, bedingt durch die HPLC Trennung, enthielt. Unabhängig davon lässt sich kein direkter Einfluss von IPs auf den Aktivierungsprozess der HNL feststellen.

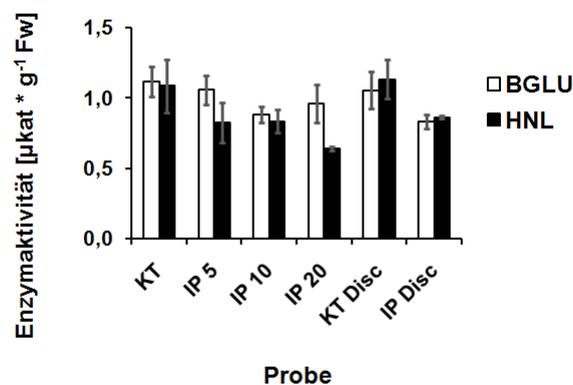


Abbildung 4.3.7: BGLU- und HNL-Aktivität nach Inkubation mit Inositolphosphaten

Proteinrohextrakte aus Blättern von *H. brasiliensis* wurden in Inositolphosphatlösungen (IP) inkubiert. Außerdem wurden Blattscheiben mit IP-Lösung infiltriert. Nach 2,5 stündiger Inkubation wurden BGLU- und HNL-Aktivität bestimmt.

KT: Proteinrohextrakt -IPs; IP 5, 10 und 20: Proteinrohextrakt +IPs (Konzentration in den Ansätzen 5, 10 und $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); KT Disc: Blattscheibe -IPs; IP Disc: Blattscheibe +IPs (Konzentration der Infiltrationslösung $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

BGLU-Aktivität nach Behandlung der Blätter mit Methyljasmonat (MeJa)

Gewebeverletzung führt bei *L. esculentum* zur Synthese von MeJa. In Zusammenhang mit MeJa sind allerdings hauptsächlich Expressionsveränderungen abwehrrelevanter Gene beschrieben (siehe Einleitung). Trotzdem sollte überprüft werden ob MeJa nicht doch auch einen Einfluss auf die BGLU-Aktivität im Blattgewebe von *H. brasiliensis* hat. Hierzu wurden intakte Blätter mit einer MeJa-Ethanol-Lösung besprüht und für Zeiträume von 5, 10 sowie 20 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienten Blätter die mit Ethanol-Lösung ohne MeJa besprüht wurden. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität in unbehandelten Blättern gemessen.

Die BGLU-Aktivität in unbehandeltem Gewebe betrug $0,25 \pm 0,10 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 5; Probenbezeichnung: 0 Wert). Bei Blättern die mit Ethanol-Lösung besprüht wurden war die Aktivität identisch ($0,25 \pm 0,06 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$; Probenbezeichnung: KT). Auch das Sprühen mit MeJa führte bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten zu keiner nennenswerten Veränderung. In den Proben wurde eine Enzymaktivität von $0,24 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen. Nach 10 Minuten Inkubationszeit betrug sie $0,31 \pm 0,09 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$, was einem AF von 1,3 entspricht. In Proben, die für 20 Minuten inkubiert wurden stieg die BGLU-Aktivität auf $0,54 \pm 0,10 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.8). Der AF beträgt somit knapp 2,2.

Offenbar scheint die Gegenwart von MeJa eine Erhöhung der BGLU-Aktivität zur Folge zu haben. Um den Befund zu erhärten wären allerdings weitere Messwiederholungen erforderlich. Auf diese wurde verzichtet, da weder die Höhe der Aktivierung noch der dafür erforderliche Zeitraum auf einen Zusammenhang mit der verletzungsbedingten Aktivierung von LIN schließen ließen.

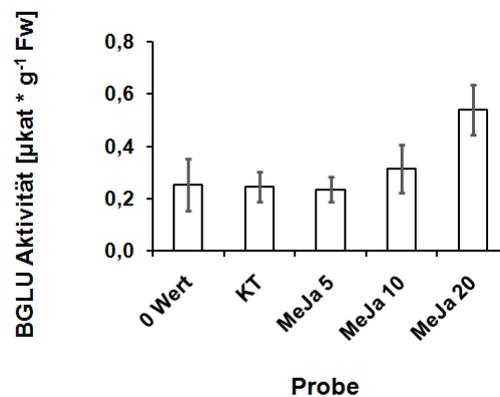


Abbildung 4.3.8: BGLU-Aktivität nach Behandlung der Blätter mit MeJa

Intakte Blätter von *H. brasiliensis* wurden mit identischen Mengen an MeJa-Lösung besprüht. Nach 5 bis 20-minütiger Inkubation wurde die BGLU-Aktivität im Gewebe gemessen.

0 Wert: BGLU-Aktivität im frischen, intakten Blattmaterial; KT: BGLU-Aktivität nach besprühen mit Ethanol und 20-minütiger Inkubation; MeJa 5: 5-minütige Inkubation mit MeJa; MeJa 10: 10-minütige Inkubation mit MeJa; MeJa 20: 20-minütige Inkubation mit MeJa

BGLU-Aktivität nach Inkubation mit GABA

Neben MeJa können Pflanzen als Reaktion auf Gewebeverletzung auch GABA akkumulieren (siehe Seite 21). Die Akkumulation erfolgt schnell und bereits auf leichte Verletzungen hin, wie sie durch die Bewegung von Insekten über Blätter hinweg hervorgerufen werden kann (siehe Theoretischer Hintergrund). Aus diesem Grund sollte geprüft werden ob GABA möglicher Weise einen direkten Einfluss auf die Aktivität der BGLU hat. Hierzu wurden Blatthomogenate mit unterschiedlichen Mengen einer GABA-Stammlösung versetzt, so dass sich GABA-Konzentrationen von $25 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $250 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ergaben. Die Inkubationszeit betrug 2,5 Stunden.

Die anschließende BGLU-Aktivitätsbestimmung ergab einen Kontrollwert von $1,00 \pm 0,19 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (Pflanze 2). In den GABA-haltigen Ansätzen betrug die Aktivität $0,99 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($25 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$), $0,95 \pm 0,17 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($250 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$), $1,02 \pm 0,18 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) sowie $1,05 \pm 0,13 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ ($2,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) (siehe Abbildung 4.3.9). Eine Aktivierung von BGLU in direktem Zusammenhang mit GABA ist also nicht gegeben.

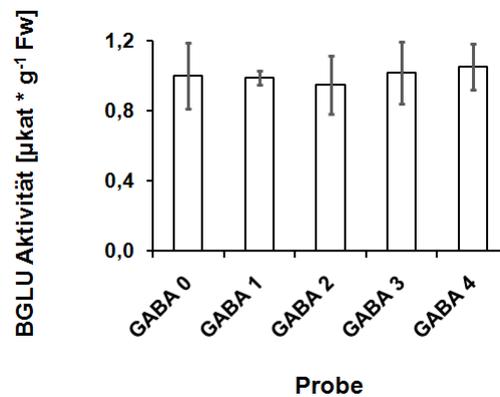


Abbildung 4.3.9: BGLU-Aktivität nach Inkubation mit GABA

Proteinrohextrakte aus Blättern von *H. brasiliensis* wurden mit γ -Aminobuttersäure-Lösung (GABA) versetzt. Nach 2,5-stündiger Inkubation wurde die BGLU-Aktivität bestimmt.

GABA 0: Proteinrohextrakt -GABA; GABA 1: Proteinrohextrakt +GABA (GABA-Konzentration in den Ansätzen $25 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$); GABA 2: Proteinrohextrakt +GABA ($250 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$); GABA 3: Proteinrohextrakt +GABA ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$); GABA 4: Proteinrohextrakt +GABA ($2,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$); Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen. Bei dem angegebenen Fehlerwert handelt es sich um die Standardabweichung.

Oligomerbildung und Enzymaktivität bei LIN und HNL aus *H. brasiliensis*

Von vielen an Abwehrreaktionen beteiligten BGLUs ist bekannt, dass erst eine Oligomerisierung oder aber eine Polymerisation die Aktivierung des jeweiligen Enzyms bedingt (siehe Einleitung). LIN aus *H. brasiliensis* bildet eine Vielzahl von Homooligomeren unterschiedlichsten Polymerisierungsgrades (siehe Seite 133). Diese könnte in Zusammenhang mit der verletzungsbedingten Aktivierbarkeit des Enzyms stehen. Wäre beispielsweise nur eines der Oligomere katalytisch aktiv, so könnte eine Gleichgewichtsverschiebung hin zu dieser Form die Aktivitätszunahme bedingen. Darüber hinaus sind an den Polymerisationsreaktionen häufig Aggregationsfaktoren beteiligt (siehe Seite 132). Ob dies auch für LIN aus *H. brasiliensis* gilt, sollte zunächst überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde das Enzym mittels Antikörper (AK)-Säule immunoaffinitätschromatographisch aus Blattproteinrohextrakt isoliert. Dabei wurde den Angaben von KADOW (2006) entsprechend verfahren. Teile des gereinigten Enzyms wurden auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die drei sich ergebenden Banden (siehe Abbildung 4.1.1) wurden massenspektroskopisch analysiert. Insgesamt konnten 7 Fragmente identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.10 A). 5 davon entsprachen LIN. Ihre Position im LIN-Molekül ist in Teil B der Abbildung wiedergegeben. Eines der Fragmente konnte einer β -Mannosidase

zugeordnet werden. Das siebte Fragment entsprach einer Galactosyltransferase. Ein Aggregationsfaktor konnte hingegen nicht gefunden werden. Dies ist zwar kein direkter Beweis dafür, dass an der Oligomerbildung kein Aggregationsfaktor beteiligt ist, der Befund lässt aber darauf schließen, dass bei *H. brasiliensis*, ähnlich wie auch bei *T. aestivum* (siehe Seite 132), die Oligomerisierung auf Wechselwirkungen zwischen den LIN-Monomeren beruht.

A

Fragment	Sequenz	Protein
1	ILDGSNGDVAVDFYNR	LIN <i>Hevea</i>
2	DIVYDYYEYANLLFEFGDR	LIN <i>Hevea</i>
3	LGEYGFQNALSLVR	β -Mannosidase
4	TFWYEPLSNE	LIN <i>Hevea</i>
5	LDFMFGLWMDPMTYGTYP	LIN <i>Hevea</i>
6	YSWYEPLSNETTYFLR	Galactosyltransferase
7	GSYDFLGLQYYTSYYAK	LIN <i>Hevea</i>

B

MVMATKHSLQLLAMLI FLI SLLALTKPTMADDD IPEDFSS SYFPDDFIFGTAT SAYQIEGEA
 TTKGRGPSVWDTFSKE TPERILDGSNGDVAVDF YNRFKED IANVKNMGFKGFRMSISWSRVI
 PSGRRREGV NKEGIEF YNNVING IIS NGLPEFVT IFHWDTPQALEDKYGGFSLRDIYDYDE
 YANLLFEFGDR VKYWMTFNEPWLSGFS YDDGVFAP GRCSSWVNRQC RAGNSATEP YIVAH
 HLLLSHA AVVKLYREKFKP IHGGQIG ITLFTFWYEP L SNEPADVEAAKIALDFMFGLWMDPM
 TYGTYPRTVRDL VGDR LPKFTDAESK FLRGSYDFLGLQYYTSYYAKPNAI VDPNRIRYKTDN
 HITETP YDYDGNLIGP QAYSSWFYIF PKG IRHLINYT KDT YNPNVI YITENGVDNINNETQP
 IEALQDEF RINYYRKHLWNLG SLKNYS VNVKGYFAWSYLDNFEWN IGYTSRFGLYYVDYK
 DNLKRYPKD SAKWFTK FLKHSPKKPL QSNKIYE VTSRNSRKVGGKYYIM

Abbildung 4.3.10: Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse der mittels AK gereinigten LIN aus *H. brasiliensis* Blättern

Zunächst wurde aus Blattmaterial von *H. brasiliensis* ein Proteinrohextrakt hergestellt. Aus diesem wurde die LIN immunoaffinitätschromatographisch isoliert. Das gereinigte Enzym wurde auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie gefärbt, aus dem Gel herausgeschnitten und massenspektroskopisch analysiert (UKE Hamburg).

A. AS-Sequenz und Zuordnung der identifizierten Fragmente

B. Positionen der zur LIN gehörenden Fragmente im Protein. Die Einzelnen Fragmente sind hellgrau unterlegt. Der N-Terminus ist dunkelgrau unterlegt.

Da sowohl LIN als auch HNL verletzungsbedingt aktiviert werden und der Aktivierungsprozess eine Vielzahl von Parallelen aufweist (siehe Kapitel 1), wäre es denkbar, dass der Aktivierungsmechanismus bei beiden Enzymen derselbe ist. Sollte die Aktivierung bezüglich der LIN also auf einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen den unterschiedlichen Oligomeren beruhen, dann sollte man bei HNL ein vergleichbares Oligomerisationsverhalten erwarten. HNL aus Maniok scheint sowohl als Dimer als auch als Trimer und Tetramer vorzukommen (siehe Seite 133). Offensichtlich wurden die unterschiedlichen Formen aber nie in ein und demselben Gel gefunden. Um zu überprüfen ob selbiges auch für die HNL aus *H. brasiliensis* gilt, wurde heterolog exprimiertes

Protein (zur Verfügung gestellt von der TU Harburg) auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Auch bei hohen Proteinkonzentrationen konnte keine Assoziation zu unterschiedlichen Oligomeren beobachtet werden (siehe Abbildung 4.3.11). Eine Aktivierung von HNL durch Gleichgewichtsverschiebungen zwischen verschiedenen Oligomeren erscheint daher unwahrscheinlich. Es sollte aber darauf hingewiesen werden, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich heterolog exprimierte HNL bezüglich der Assoziation zu Oligomeren anders verhält, als es das Protein aus Blattgewebe tut. Außerdem könnten sich die Aktivierungsmechanismen von LIN und HNL natürlich auch unterscheiden.

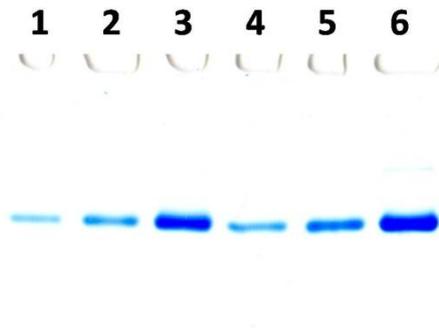


Abbildung 4.3.11: Laufverhalten von heterolog exprimierter *H. brasiliensis*-HNL im nativen Polyacrylamidgel

HNL aus *H. brasiliensis* wurde in *Pichia pastoris* exprimiert. Das Protein wurde von der TU Harburg zur Verfügung gestellt. Von beiden Proben wurden unterschiedliche Mengen auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie.

Bahn 1 - 3: Probe 1 (1,5 / 3 / 6 µg Protein); Bahn 4 - 6: Probe 2 (2,5 / 5 / 10 µg Protein)

Die Aktivierung der BGLU bzw. LIN geht, auch wenn der Proteinrohextrakt längere Zeit bei Raumtemperatur inkubiert wird, nicht verloren (siehe Abbildung 4.3.3). Es muss sich dementsprechend um eine stabile Veränderung des Proteins bzw. des Oligomerisationsverhaltens handeln. Wäre nur eines der Oligomere katalytisch aktiv, so könnte dies mit Hilfe eines Zymogramms leicht nachgewiesen werden. Problematisch ist hierbei allerdings, dass in dem Moment in dem das Gel aus der Gelkammer genommen wird, jedes Oligomer wieder alle Oligomerformen hervorbringt (siehe Seite 132). Dementsprechend weist jede der Proteinbanden Aktivität auf (4.3.12). Es kann aber nicht gesagt werden ob diese Aktivität auf eine bestimmtes oder aber auf alle Oligomere zurückzuführen ist. Aktivierte BGLU sollte, vorausgesetzt die Aktivierung geht während der Gelelektrophorese nicht verloren, im Zymogramm einen gegenüber der Kontrolle erhöhten Substratumsatz aufweisen. Wäre die Aktivierung durch die verstärkte Bildung einer Oligomerform bedingt, so müsste diese Bande mehr Protein enthalten und damit trotz des Hervorbringens aller Oligomere eine Aktivitätszunahme aufweisen. Um dies zu prüfen wurden Blattextrakte aus intaktem und verletztem Gewebe auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die BGLU-Aktivität wurde

mittels X-Glu (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside) nachgewiesen. Zunächst zeigte sich, dass alle Banden, die bei Colloidal-Coomassie(CC)-Färbung zu erkennen sind, auch BGLU-Aktivität aufweisen. Darüber hinaus findet sich Enzymaktivität in den Taschen (siehe Abbildung 4.3.12 A). Bei Proteinextrakten aus verletztem Gewebe nimmt nicht die Intensität einer Bande zu, sondern es weisen vielmehr alle einen verstärkten Substratumsatz auf. So betrug die Intensität der obersten Bande (Bande 1) bei Proteinextrakt aus unverletztem Gewebe $6,83 \pm 1,56$. Bedingt durch mechanische Verletzung stieg sie auf $29,57 \pm 4,49$. Bei der mittleren Bande (Bande 2) erhöhte sie sich von $5,59 \pm 0,37$ (intakt) auf $20,92 \pm 1,16$ (verletzt). Im Falle der unteren Bande (Bande 3) betrug die Intensität bezüglich des unverletzten Gewebes $0,73 \pm 0,04$. Gewebeverletzung hatte einen Anstieg auf $3,30 \pm 0,32$ zur Folge (siehe Abbildung 4.3.12 B). Dies entspricht Aktivitätszunahmen um die Faktoren 4,3 (Bande 1), 3,7 (Bande 2) und 4,5 (Bande 3). Die BGLU Aktivität ist also nicht nur in allen drei Fällen erhöht, sondern darüber hinaus auch etwa im gleichen Maße. Stünde die Aktivierung in Zusammenhang mit einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen den Oligomerformen, so hätte lediglich eine der Banden eine deutliche Aktivitätszunahme aufweisen dürfen.

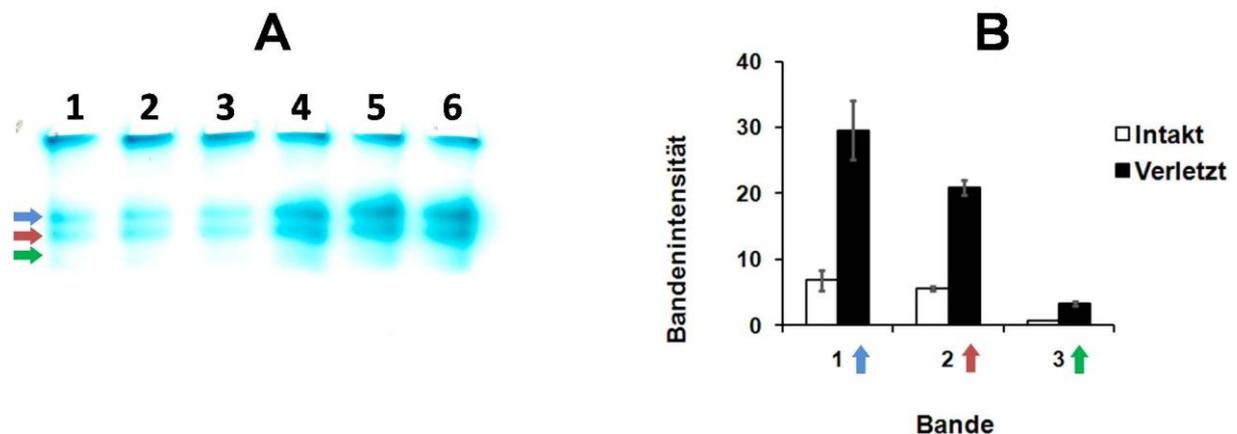


Abbildung 4.3.12: BGLU-Zymogramm von Blattextrakten aus intaktem und verletztem Gewebe

Proteinrohextrakt aus intakten und verletzten *H. brasiliensis*-Blättern wurde auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. BGLU-haltige Proteinbanden wurden mittels X-Glu (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside) detektiert. Die Inkubation in der Substratlösung erfolgte über Nacht.

A. Gescanntes Gel; Bahn 1 - 3: Proteinrohextrakt aus intaktem Blattgewebe; Bahn 4 - 6: Proteinrohextrakt aus verletztem Blattgewebe; Die Pfeile markieren die bei der densitometrischen Auswertung des Gels berücksichtigten Banden.

B. Ergebnis der densitometrischen Analyse des Gels. Die Banden (in Teil A mit Pfeilen markiert) sind von Oben nach Unten durchnummeriert: blauer Pfeil = Bande 1, roter Pfeil = Bande 2, grüner Pfeil = Bande 3. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageJ.

Um den Befund abzusichern, sollten zusätzlich die Proteinmengen in den einzelnen Banden bestimmt werden. Denn sollte eines der Oligomere im Rahmen der Enzymaktivierung verstärkt gebildet

werden, dann sollte die entsprechende Bande auch mehr Protein enthalten. Die übrigen müssten dementsprechend eine Abnahme aufweisen.

Um die jeweiligen Proteinmengen abschätzen zu können wurde das Gel zunächst Coomassie-gefärbt und anschließend densitometrisch ausgewertet. Das Gel lässt erkennen, dass Gewebeverletzung bei allen drei Oligomerformen zu einer Proteinzunahme führt (siehe Abbildung 4.3.13 A). Teil B der Abbildung zeigt das Ergebnis der Übertragung zweier Bahnen des Gels in eine graphische Darstellung (ImageJ). Die Intensität der Bande 1 betrug bei Extraktion von intaktem Blattgewebe $1,58 \pm 0,34$. Bei mechanischer Verletzung des Gewebes stieg sie auf $10,49 \pm 0,29$. Ähnlich verhielt es sich im Falle von Bande 2. Bezüglich des intakten Gewebes wurde eine Bandenintensität von $1,36 \pm 0,13$ festgestellt. Mechanische Verletzung bedingte einen Anstieg auf $9,54 \pm 0,11$. Auch Bande 3 wies eine verletzungsabhängige Intensitätszunahme auf. Die Proteinmenge bzw. Intensität stieg von ursprünglich $0,34 \pm 0,08$ (intaktes Gewebe) auf $2,36 \pm 0,22$ (verletztes Gewebe) (siehe Abbildung 4.3.13 C). Dies entspricht einer Zunahme der jeweiligen LIN-Menge um den Faktor 6,6 (Bande 1), 7,0 (Bande 2) bzw. 6,9 (Bande 3).

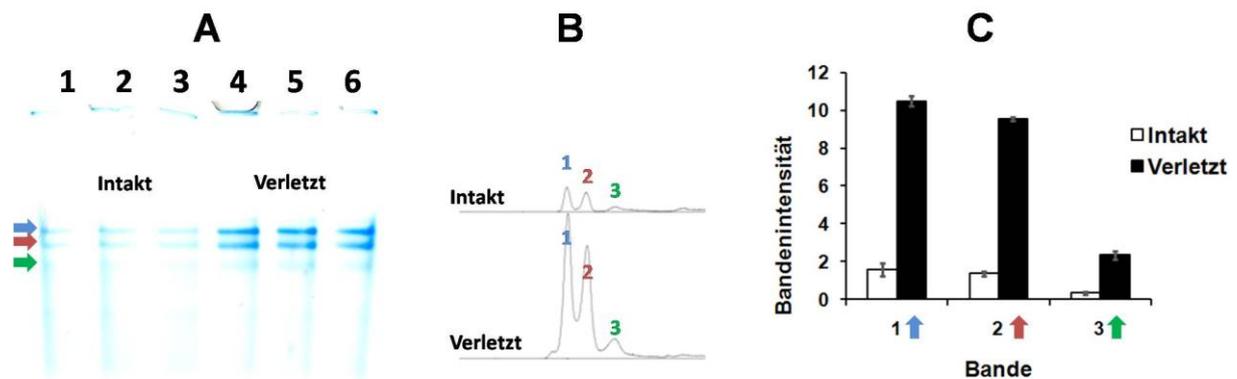


Abbildung 4.3.13: Densitometrische Bestimmung der LIN-Oligomer-Mengen in Proteinextrakten aus unverletztem und verletztem Blattgewebe

Proteinrohextrakt aus intakten und verletzten *H. brasiliensis*-Blättern wurde auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie gefärbt. Für die densitometrische Auswertung mittels ImageJ wurde das Gel gescannt.

A. Gescanntes Gel; Bahn 1 - 3: Proteinrohextrakt aus intaktem Blattgewebe; Bahn 4 - 6: Proteinrohextrakt aus verletztem Blattgewebe; Die Pfeile markieren die bei der densitometrischen Auswertung des Gels berücksichtigten Banden.

B. Übertragung der unter Verwendung von ImageJ ermittelten Bandenintensitäten in eine graphische Darstellung. Die Banden (in Teil A mit Pfeilen markiert) sind von Oben nach Unten durchnummeriert: blauer Pfeil = Bande 1, roter Pfeil = Bande 2, grüner Pfeil = Bande 3.

C. Ergebnis der densitometrischen Analyse des Gels. Die Banden (in Teil A mit Pfeilen markiert) sind von Oben nach Unten durchnummeriert: blauer Pfeil = Bande 1, roter Pfeil = Bande 2, grüner Pfeil = Bande 3.

Die LIN-Menge ist also bei allen drei Banden etwa im gleichen Maße erhöht. Stünde die Aktivierung in Zusammenhang mit einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen den Oligomerformen, so hätte lediglich eine der Banden eine deutliche Proteinmengenzunahme aufweisen dürfen. Es scheint aber vielmehr so zu sein, dass insgesamt mehr LIN vorhanden ist. Zumindest von allen detektierbaren Oligomeren. Denkbar wäre daher auch, dass nicht eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen den Oligomeren zur Aktivierung der LIN führt, sondern dass eine Oligomerisation von Monomeren die LIN-Aktivitätszunahme bedingt. Um dies zu prüfen, wurden Proteinextrakte auf ein denaturierendes Gel aufgetragen, so dass der Gesamtgehalt an LIN verglichen werden konnte. Dokumentiert wurde auch HNL. Um die densitometrische Auswertung zu erleichtern erfolgte die Proteinextraktion bei pH 4. Der niedrige pH-Wert hatte zwar eine geringfügige Abnahme der LIN- und HNL-Aktivität zur Folge (Daten nicht gezeigt), bewirkte aber gleichzeitig die Denaturierung eines großen Teils der übrigen Blattproteine (siehe Abbildung 4.3.14 A). Für die Extraktion wurde sowohl intaktes Gewebe als auch solches, das einen mittleren Grad an Verletzung aufwies (Entspricht hier 75 Einstichen), sowie stark verletztes Gewebe (Entspricht 150 Einstichen) verwendet. Es wurden sowohl C- als auch D-Stadien beprobt. Neben der jeweiligen Proteinmenge wurde auch die BGLU- und HNL-Aktivität in den Proteinrohextrakten bestimmt.

Es zeigte sich, dass im Falle der C-Stadien sowohl die Menge an LIN als auch die an HNL im Überstand des Blattextraktes verletzungsbedingt erhöht ist (siehe Abbildung 4.3.14 A und B). Bei Extrakten aus intaktem Blattgewebe betrug die Bandenintensität $0,99 \pm 0,21$ (LIN) und $0,53 \pm 0,02$ (HNL). Die Enzymaktivität lag bei $0,92 \pm 0,05 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (BGLU bzw. LIN) und $1,84 \pm 0,13 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (HNL). Verletzung des Blattgewebes bis zu einem mittleren Grad, bewirkte was LIN anbelangt, einen Anstieg der Bandenintensität auf $2,75 \pm 0,39$. Diese ging mit einer Erhöhung der Enzymaktivität auf $1,79 \pm 0,21 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ einher. Dies entspricht einem Faktor der Proteinmengenzunahme (PF) von 2,8 und einem AF von 2,0. Im Falle von HNL fiel die Proteinmengenzunahme geringer aus. Die Bandenintensität lag bei $0,77 \pm 0,10$. Auch die Enzymaktivität stieg nur geringfügig auf $2,01 \pm 0,11 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Der PF liegt somit bei 1,5 der AF bei 1,1. Bei einem hohen Grad der Gewebeverletzung erhöhte sich die Intensität der Banden auf $7,60 \pm 0,86$ (LIN) und $2,44 \pm 0,50$ (HNL), die Enzymaktivität auf $5,26 \pm 0,17 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (BGLU bzw. LIN) und $4,33 \pm 0,82 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (HNL) (siehe Abbildung 4.3.14 C und D). Der PF liegt bei 7,7 (LIN) bzw. 4,6 (HNL) der AF bei 5,7 (LIN) bzw. 2,4 (HNL). Sowohl im Falle der LIN als auch bei HNL bewirkt mechanische Gewebeverletzung somit eine Zunahme der jeweiligen Proteinmenge im Überstand, sowie eine in ihrem Verlauf ähnliche Aktivitätserhöhung.

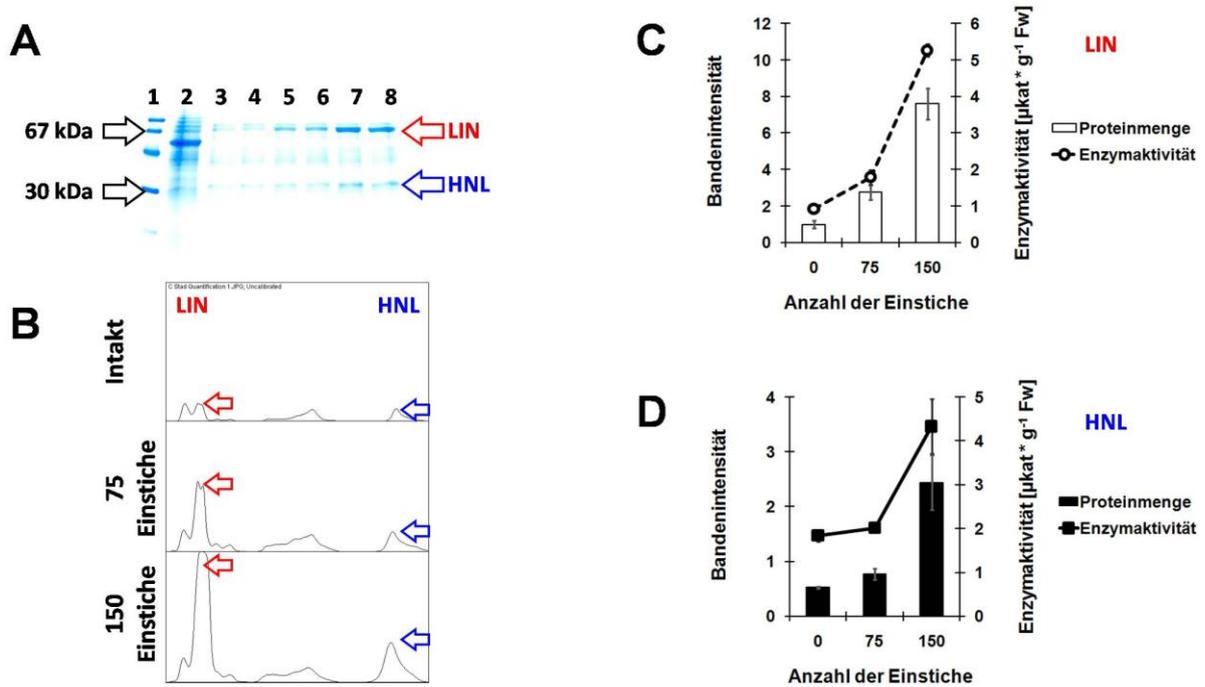


Abbildung 4.3.14: Verletzungsbedingte Erhöhung der Proteinmenge und der Aktivität von LIN bzw. BGLU und HNL in Blättern des C-Stadiums

Proteinrohextrakt aus intakten und verletzten *H. brasiliensis*-Blättern des C-Stadiums wurde auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie. Für die densitometrische Auswertung mittels ImageJ wurde das Gel gescannt. Außerdem wurden Aliquots der Proteinrohextrakte für die Bestimmung von BGLU- und HNL-Aktivität verwendet. Die Anzahl der Einstiche gibt den Grad der Gewebeerletzung wieder.

A. Gescanntes Gel; Bahn 1: Marker (Amersham Biosciences®); Bahn 2: Proteinrohextrakt aus intaktem Blattgewebe (pH 6,4); Bahn 3 - 4: Proteinrohextrakt aus intaktem Blattgewebe (pH 4); Bahn 5 - 6: Proteinrohextrakt aus leicht verletztem Blattgewebe (pH 4); Bahn 7 - 8: Proteinrohextrakt aus stark verletztem Blattgewebe (pH 4); Rote Pfeile markieren den Bereich der LIN-Banden, blaue den der HNL-Banden.

B. Übertragung der unter Verwendung von ImageJ ermittelten Bandenintensitäten in eine graphische Darstellung (Bahn 3, 5 und 7). Rote Pfeile markieren den LIN-Peak, blaue den der HNL-Peak.

C. Ergebnisse der densitometrischen Analyse des Gels und der Bestimmung der BGLU- bzw. LIN-Aktivität.

D. Ergebnisse der densitometrischen Analyse des Gels und der Bestimmung der HNL-Aktivität.

Selbiges gilt auch für das D Stadium. Bezüglich der Proteinmenge ist sowohl was LIN als auch was HNL anbelangt eine verletzungsbedingte Zunahme zu beobachten (siehe Abbildung 4.3.15 A und B). Bei Proteinextrakt aus intaktem Gewebe betrug die Intensität der Banden $2,30 \pm 0,47$ (LIN) und $1,48 \pm 0,14$ (HNL). Die Enzymaktivität lag bei $1,04 \pm 0,03 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (BGLU bzw. LIN) bzw. $1,23 \pm 0,23 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (HNL). Ein mittlerer Grad der Gewebeerletzung hatte Bandenintensitäten von $5,18 \pm 0,79$ (LIN) und $2,62 \pm 0,03$ (HNL) zur Folge. Die Enzymaktivitäten stiegen auf $2,14 \pm 0,01 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (BGLU bzw. LIN) und $2,65 \pm 0,07 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (HNL). Die PFs betragen somit 2,3 (LIN) und 1,8 (HNL), der AF in beiden Fällen 2,1. Bei starker Gewebeerletzung erhöhten sich die Bandenintensitäten auf $12,58 \pm 4,61$ (LIN) und $8,36 \pm 1,87$ (HNL), die Enzymaktivitäten auf $5,83 \pm 0,71$ (BGLU bzw. LIN) und

6,24 ± 0,67 (HNL) (siehe Abbildung 4.3.15 C und D), was PFs von 5,5 (LIN) und 5,6 (HNL), sowie AFs von 5,6 (LIN) und 5,1 (HNL) entspricht. Die Aktivitätserhöhung von LIN und HNL erfolgt also durch einen sekundenschnellen Anstieg der löslichen Enzymmenge.

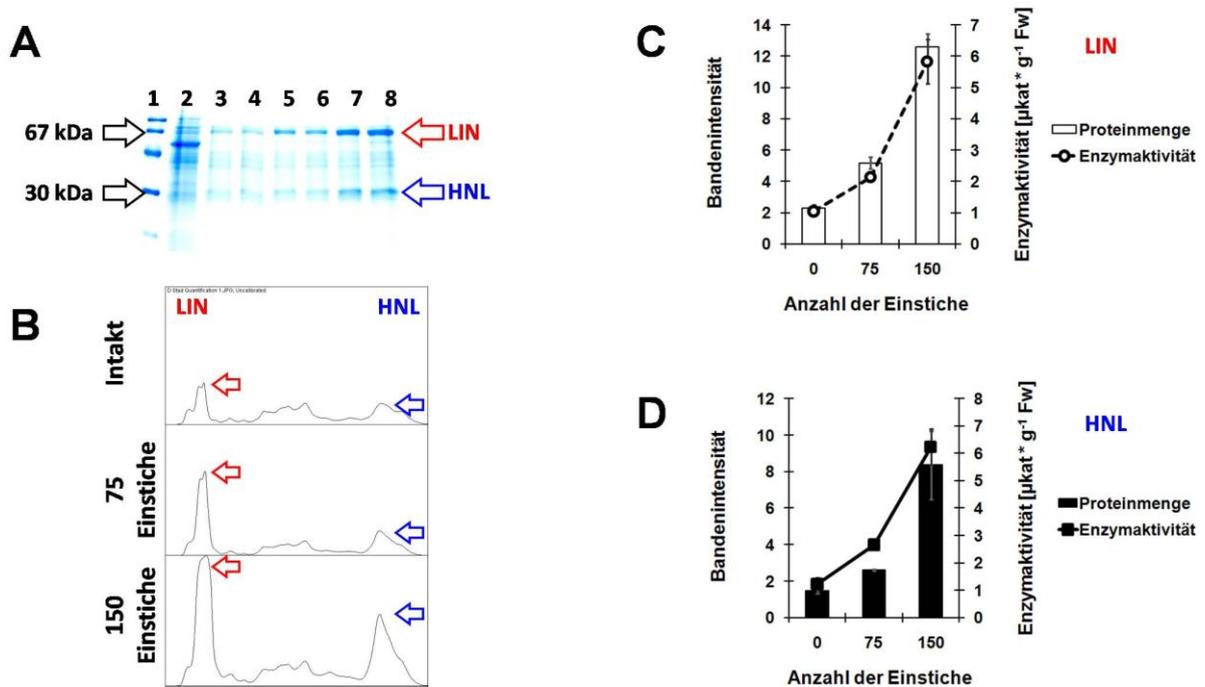


Abbildung 4.3.15: Verletzungsbedingte Erhöhung der Proteinmenge und der Aktivität von BGLU und HNL in Blättern des D Stadiums

Proteinrohextrakt aus intakten und verletzten *H. brasiliensis*-Blättern des D-Stadiums wurde auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie. Für die densitometrische Auswertung mittels ImageJ wurde das Gel gescannt. Außerdem wurden Aliquots der Proteinrohextrakte für die Bestimmung von BGLU- und HNL-Aktivität verwendet. Die Anzahl der Einstiche gibt den Grad der Gewebeerletzung wieder.

A. Gescanntes Gel; Bahn 1: Marker (Amersham Biosciences®); Bahn 2: Proteinrohextrakt aus intaktem Blattgewebe (pH 6,4); Bahn 3 - 4: Proteinrohextrakt aus intaktem Blattgewebe (pH 4); Bahn 5 - 6: Proteinrohextrakt aus leicht verletztem Blattgewebe (pH 4); Bahn 7 - 8: Proteinrohextrakt aus stark verletztem Blattgewebe (pH 4); Rote Pfeile markieren den Bereich der LIN-Banden, blaue den der HNL-Banden.

B. Übertragung der unter Verwendung von ImageJ ermittelten Bandenintensitäten in eine graphische Darstellung (Bahn 3, 5 und 7). Rote Pfeile markieren den LIN-Peak, blaue den der HNL-Peak.

C. Ergebnisse der densitometrischen Analyse des Gels und der Bestimmung der BGLU- bzw. LIN-Aktivität.

D. Ergebnisse der densitometrischen Analyse des Gels und der Bestimmung der HNL-Aktivität.

Massenspektrometrische Identifikation der LIN- und HNL-Banden

Zur Überprüfung, ob es sich bei den untersuchten Banden auch um LIN und HNL handelt, wurden diese massenspektroskopisch analysiert. Im Falle der LIN-Probe konnten alle identifizierten Fragmente auch der LIN zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.3.16 A). Teil B der Abbildung gibt die jeweilige Lokalisation der Fragmente im Protein wieder. In der HNL-Probe fand sich neben 5

Fragmenten die zur HNL gehörten noch eines, das einer Carboanhydrase entsprach (siehe Abbildung 4.3.16 C). Teil D der Abbildung gibt die jeweilige Lokalisation der Fragmente im Protein wieder. Trotzdem dürfte die Zunahme der Proteinmenge auf HNL zurückzuführen sein, da zum einen die Mehrzahl der Fragmente dem Enzym zugeordnet werden konnte und zum anderen in den zugehörigen Inkubationsansätzen auch ein beschleunigter Umsatz von Acetoncyanhydrin gemessen wurde.

A

Fragment	Sequenz	Protein
1	RILDGSDVAVDFYNR	LIN <i>Hevea</i>
2	DIVDYDEYANLLFEFGDR	LIN <i>Hevea</i>
3	LDFMFLWMDPMTYGYPT	LIN <i>Hevea</i>
4	TFWYEPLSNE	LIN <i>Hevea</i>
5	FGLYYVDYK	LIN <i>Hevea</i>
6	GSYDFLGLQYYTSYYAK	LIN <i>Hevea</i>
7	ENLYTLCGPEEYELAK	HNL <i>Hevea</i>
8	TFLEALPPGEK	HNL <i>Hevea</i>
9	AEILQEV	HNL <i>Hevea</i>
10	TYFTYTKDGKE	HNL <i>Hevea</i>
11	QEVADT	HNL <i>Hevea</i>
12	EAVNVSLGNLLTYPFVDR	Carboanhydrase

B

MVMATKHSIQLLAMLI FLISLLALTKPTMADDD IPEDFSS SYFPDDFIFGTAT SAYQIEGEA
 TTKGRG P SVWDTFSKE TPERILDGSDVAVDFYNRFKED IANVKNMGFKGFRMS ISWSRVI
 PSGRRREGVNKEGIEF YNNVING IISNGLEPFVT IFHWDTPQALEDK YGGFLSRDIVDYDE
 YANLLFEFGDRVKYWMTFNEPWSLSGF SYDDGVFAPGRCS SWVNRQCRAGNSATEP YIVAH
 HLLLSHAAVVKLYREKFKP IHGGQIGITLFTFWYEP LSNPADVEAAKIALDFMFLWMDPM
 TYGYPTVRDLVGDR LPKFTDAESKFLRGSYDFLGLQYYTSYYAKPNAI VDPNRIRYKTDN
 HITETP YDYDGNLIGP QAYSSWFYIF PKGIRHLIN YTKDT YNNPVIYITENGVDNNNETQP
 IEALQDEFRI NYRKHNLWALGSLKNYS VNVKGYFAWSYLDNFENIGYTSRFGLYYVDYK
 DNLKRYPKDSAKWFTKFLKHSPKPLQSNKIYE VTSRNSRKVGKYYIM

C

MAFAHFVLIHTICHGAWIWHKLP LLEALGHKVTALDLAASGVDP RQIEEIGSFDEYSEPLL
 TFLEALPPGEKV ILVGESCGGLNIAIAADKYCEKIAAAVFHNS VLPDTEHCPSYVVDKIMEV
 FPDWKDTYFTYTKDGKEITGLKLGFTLLRENLYTLCGPEEYELAKMLTRKGS LFQNLAKR
 PFFTKEGYGSIKKIYVWTDQDEIFLPEFQLWQIENYKPKVYKVEGGDHKLQLTKTKEIAEI
 LQEVADTYN

Abbildung 4.3.16: Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse der BGLU- und HNL-Banden

Proteinrohextrakt aus intakten und verletzten *H. brasiliensis*-Blättern des C- und D-Stadiums wurde auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie. Die Banden die LIN und HNL entsprachen wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (UKE Hamburg).

A. Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der LIN- und HNL-Bande.

B. Einordnung der Fragmente aus Teil A in die AS-Sequenz von LIN.

C. Einordnung der Fragmente aus Teil C in die AS-Sequenz von HNL.

Katalytische Aktivität der schwer- bzw. unlöslichen LIN- und HNL-Fraktion

Da die Aktivierung und die damit verbundene Proteinmengen Zunahme von LIN und HNL sekundenschnell erfolgen, kann es sich nicht um Protein *de novo* Synthese handeln. Beide Enzyme müssen präformiert sein. LIN könnte, wie für Mais beschrieben (siehe Seite 132), in Teilen in polymerer Form vorliegen und daher unlöslich sein oder aufgrund der Größe bei der PAGE in der Tasche hängen bleiben. Denkbar wäre auch eine Assoziation an die Zellwände, wie sie für Linamarase aus Maniok gefunden wurde (McMahon et al. 1995). HNL ist möglicherweise membranassoziiert und könnte so bei der Zentrifugation teilweise im Pellet verbleiben. Auch eine Polymerisation, vielleicht sogar gemeinsam mit LIN, wäre möglich. In jedem Fall ist es von Interesse festzustellen, ob die Enzyme, sollten sie sich im Pellet befinden, katalytisch aktiv sind oder nicht. Bei *Z. mays* beispielsweise ist die als unlösliches Polymer vorliegende BGLU enzymatisch aktiv. Im Falle von *A. thaliana* ist ausschließlich das ebenfalls unlösliche Polymer aktiv, BGLU die als Monomer vorliegt hingegen nicht (siehe Seite 132). Daher wurden BGLU- bzw. LIN- und HNL-Aktivität im Überstand von Blatthomogenaten mit denen im Pellet verglichen. Bezüglich der BGLU wurde im Überstand aus Homogenat von intaktem Blattgewebe von Pflanze 8 eine Aktivität von $1,01 \pm 0,28 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Im Pellet betrug sie $0,20 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Gewebeverletzung hatte einen Anstieg auf $4,36 \pm 0,13 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ zur Folge (siehe Abbildung 4.3.17).

Für HNL waren die Ergebnisse ähnlich. Im Überstand des Blatthomogenates aus intaktem Gewebe lag die Enzymaktivität bei $1,33 \pm 0,08 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Im Pellet wurden $0,86 \pm 0,34 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Mechanische Verletzung bewirkte eine Erhöhung auf $8,82 \pm 0,21 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.17).

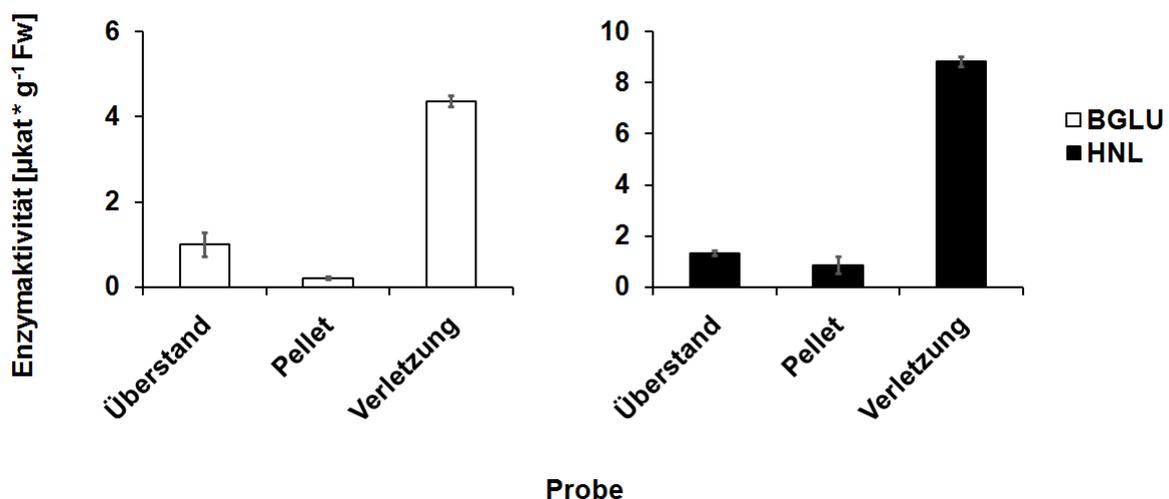


Abbildung 4.3.17: BGLU- und HNL-Aktivität in Überstand und Pellet von Blatthomogenaten

Proteinrohextrakt aus *H. brasiliensis*-Blättern wurde für die Bestimmung der BGLU- bzw. LIN- und HNL-Aktivität verwendet. Die bei der Zentrifugation der Homogenate anfallenden Pellets wurden in einer identischen Menge Phosphatpuffer aufgenommen und ebenfalls für die Enzymaktivitätsmessungen genutzt.

Sowohl LIN als auch HNL liegen somit teilweise als inaktives Protein vor. Erst mechanische Gewebeverletzung führt zur Aktivierung. Ob die inaktive Form der beiden Proteine tatsächlich im Pellet befindet bleibt zu klären.

Löslichkeit der inaktiven LIN- und HNL-Fraktion

Zunächst wurde daher versucht, inaktive LIN und HNL durch aufkochen des Pellets in SDS-Ladepuffer, in den Überstand zu bringen. Im Falle der LIN war auch nach 30 Minuten bei 95°C keine Erhöhung der Proteinmenge zu erkennen. Bei HNL hingegen war ein Anstieg festzustellen (siehe Abbildung 4.3.18 A). Bezüglich des Überstandes des Blatthomogenates wurde, eine Bandenintensität von $0,44 \pm 0,06$ gemessen. Nach Aufkochen des Pellets betrug die Bandenintensität im Überstand $3,40 \pm 0,06$ (siehe Abbildung 4.3.18 B). Die Proteinmenge ist somit 7,8-mal höher als ohne das Aufkochen in SDS-haltigem Ladepuffer.

HNL liegt im Blatt offenbar zum Teil in unlöslicher Form vor. Der unlösliche Teil des Proteins ist katalytisch nicht aktiv (siehe Abbildung 4.3.17). Erst mechanische Verletzung bedingt den Übergang der HNL in eine lösliche Form, was gleichzeitig die Aktivierung des Enzyms bewirkt.

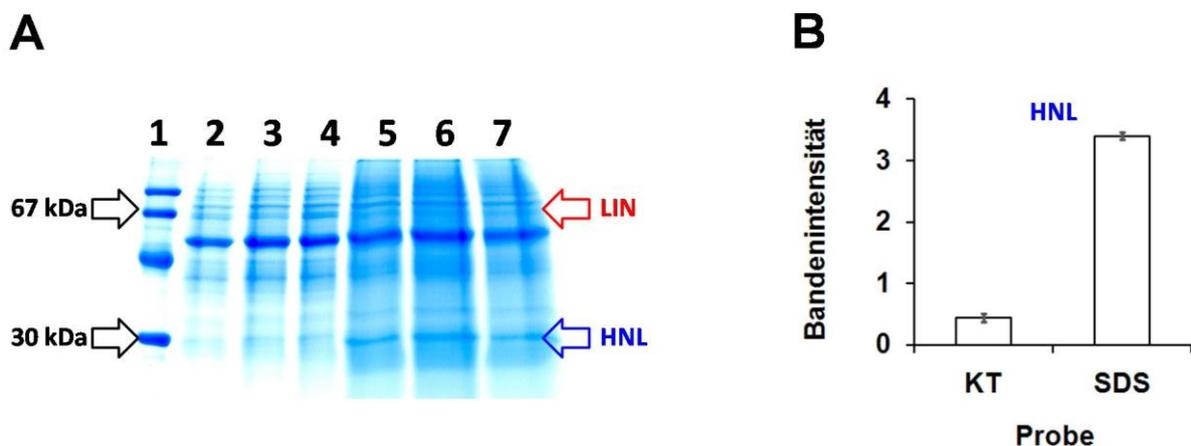


Abbildung 4.3.18: Densitometrische Bestimmung der HNL-Mengen in Überstand und Pellet von Blatthomogenaten

Homogenat von *H. brasiliensis*-Blättern wurde zum einen für die Gewinnung von Proteinrohextrakt verwendet und zum anderen mit SDS-Ladepuffer vermengt und für 30 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zum Proteinrohextrakt wurde eine identische Menge an Ladepuffer gegeben. Die Proben wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie. Das Gel wurde am Scanner dokumentiert.

A. Gescanntes Gel; Bahn 1: Marker (Amersham Biosciences®); Bahn 2 - 4: Proteinrohextrakt; Bahn 5 - 7: Homogenat +SDS +95 °C; Die LIN entsprechende Bande ist mit einem roten Pfeil markiert, die HNL entsprechende mit einem blauen.

B. Ergebnis der densitometrischen Auswertung der HNL-Bande mittels ImageJ. KT: Kontrolle bzw. Proteinrohextrakt, entspricht HNL in Bahn 2 - 4; SDS: Homogenat +SDS +95 °C, entspricht HNL in Bahn 5 - 7

LIN konnte hingegen nicht durch Aufkochen in SDS-Ladepuffer aus dem Pellet gelöst werden. Möglicherweise ist inaktive LIN nicht gänzlich unlöslich, sondern bleibt, aufgrund von Polymerbildung, in den Taschen des Gels hängen. In der Tat wurde bei allen Zymogrammen BGLU- bzw. LIN-Aktivität auch in den Taschen gefunden (siehe Abbildung 4.3.12 A). Zwar sollte dieser Teil der LIN inaktiv sein, da sonst keine Aktivitätserhöhung in den Überständen feststellbar wäre, jedoch könnte ein beginnender Zerfall der Polymere eine Teilaktivierung bedingen. Um zu überprüfen, ob die Geltaschen größere Mengen an LIN enthielten, wurden diese massenspektrometrisch analysiert. Trotz der Komplexität der Probe konnten einige Fragmente identifiziert und zugeordnet werden. So z.B. der ATP-Synthase und der RUBISCO-Aktivase (siehe Tabelle 4.3.3). LIN hingegen wurde nicht gefunden. Das Ergebnis belegt zwar nicht, dass keine LIN in den Geltaschen vorhanden ist, zumal im Zymogramm Aktivität zu finden ist, macht es aber unwahrscheinlich, dass sich in den Taschen größere Mengen des Enzyms befinden. Da mechanische Verletzung aber zu einem PF von 5,5 führen kann (siehe Abbildung 4.3.17 C), müsste von einer sehr hohen Menge an LIN ausgegangen werden.

Tabelle 4.3.3: Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse des Geltascheninhalts nach PAGE von Proteinrohextrakten

Proteinrohextrakte aus Blättern von *H. brasiliensis* wurden auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie gefärbt. Der proteinhaltige Teil der Geltaschen wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (UKE Hamburg). Fragmente die einem Protein zugeordnet werden konnten sind in der Tabelle wiedergegeben.

Fragment	Protein
1	Chlorophyll-a/b-Bindeprotein
2	Chlorophyll-a/b-Bindeprotein
3	Serinhydroxymethyltransferase
4	Serinhydroxymethyltransferase
5	Serinhydroxymethyltransferase
6	RUBISCO-Aktivase
7	ATP-Synthase

Prüfung einer möglichen Zellwandassoziation von LIN

McMAHON et al. (1995) beschreiben eine Zellwandassoziation der Linamarase aus *M. esculenta*. Möglicherweise gilt dies auch für die LIN des Kautschukbaumes. In diesem Fall müsste die Assoziation aber der Art sein, dass ein Aufkochen in SDS, nicht zum Lösen dieser ausreicht. Um zu prüfen ob die LIN tatsächlich zellwandassoziiert vorliegt, wurden Blatthomogenate mit Pektinase sowie mit einem Enzymcocktail für den Zellwandabbau behandelt und anschließend auf

Veränderungen der LIN-Aktivität untersucht. Eine gelelektrophoretische Analyse war aufgrund der Proteine aus dem Enzymcocktail nicht möglich.

Die BGLU- bzw. LIN-Aktivität im sofort nach Extraktion des Blattgewebes vermessenen Überstand lag bei $0,35 \pm 0,02 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 9). Über Nacht Inkubation bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Schüttler hatte eine leichte Aktivitätserhöhung auf $0,55 \pm 0,03 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ zur Folge. Zugabe von Pektinase führte zu einer BGLU-Aktivität von $0,52 \pm 0,11 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bei Inkubation mit dem Enzymmix für den Zellwandabbau wurde anschließend eine Aktivität von $0,28 \pm 0,04 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ bzw. $0,28 \pm 0,16 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Doppelte Enzymmixkonzentration) gemessen. Mechanische Verletzung des Gewebes hatte hingegen eine BGLU-Aktivität von $1,78 \pm 0,59 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ zur Folge (siehe Abbildung 4.3.19).

Durch Teilverdau der Zellwand kann also keine zusätzliche BGLU-Aktivität freigesetzt werden. Dass im Falle der Verwendung des Enzymmix die BGLU-Aktivität sogar abnimmt könnte darauf zurückzuführen sein, dass der hohe Hintergrund, der sich durch die Aktivität der Enzyme des Mix ergab, zu einer Unterschätzung bezüglich der BGLU führte.

Die Ergebnisse sprechen gegen die Überlegung, dass LIN in Assoziation mit der Zellwand vorliegt und dass diese in Zusammenhang mit der Aktivierung steht. Allerdings wäre auch denkbar, dass ein unspezifisches losschneiden nicht zur Aktivierung führt, oder dass ein Teilverdau nicht ausreicht um nennenswerte Mengen des Enzyms von der Zellwand zu lösen.

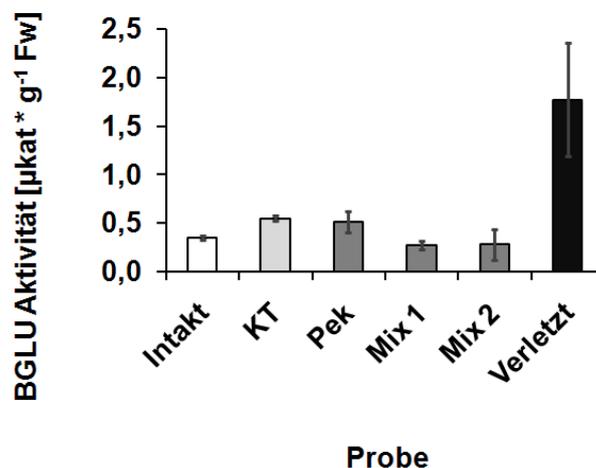


Abbildung 4.3.19: BGLU-Aktivität im Überstand von Blatthomogenaten nach Teilverdau der Zellwände

Homogenat von *H. brasiliensis*-Blättern wurde mit Pektinase oder einem Enzymmix für den Zellwandabbau versetzt und bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die BGLU-Aktivität im Überstand bestimmt. Als Kontrollen dienten Pektinase- und Enzymmix-Lösung, die ebenfalls über Nacht inkubiert wurden. Außerdem wurde Blatthomogenat ohne Enzymmix auf den Schüttler gestellt.

Intakt: BGLU-Aktivität direkt nach der Extraktion; KT: Homogenat -Pektinase -Enzymmix; Pek: Homogenat +Pektinase; Mix 1: Homogenat +Enzymmix; Mix 2: Homogenat +Enzymmix (doppelte Menge); Verletzt: BGLU-Aktivität bei Extraktion von verletztem Gewebe

Der Aktivierungsprozess könnte an enzymatische Reaktionsabläufe geknüpft sein

Für ein besseres Verständnis des Aktivierungsprozesses ist fernerhin von Bedeutung, ob an diesem Enzyme beteiligt sind. Wäre dies der Fall, so müsste die Aktivierung bei niedrigen Temperaturen verlangsamt sein. Um eine Enzymbeteiligung zu Prüfen wurde der Aktivierungsverlauf bei RT (Raumtemperatur) mit dem bei 5 °C verglichen.

Die BGLU- bzw. LIN-Aktivität des bei RT vermessenen Spreitenteils lag im unverletzten Gewebe bei $1,21 \pm 0,22 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (Pflanze 10). Verletzung führte innerhalb von 30 Sekunden zu einem Anstieg auf $10,51 \pm 1,13 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$, was einem AF von 8,7 entspricht. Nach 5 Minuten war die Aktivität auf $6,83 \pm 0,50 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gesunken. Im Falle der erst 10 Minuten nach Verletzung beprobten Blattflächen wurde eine BGLU-Aktivität von $4,73 \pm 0,71 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen. Der bei 5 °C beprobte Spreitenteil wies im unverletzten Gewebe eine Enzymaktivität von $1,06 \pm 0,13 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ auf. Bei mechanischer Verletzung stieg sie innerhalb von 30 Sekunden auf $7,10 \pm 1,11 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Der AF beträgt bei 5 °C somit 6,7. Nach Ablauf von 5 Minuten hatte sich auch hier die Aktivität verringert. Sie lag bei $4,71 \pm 0,61 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Im Gegensatz zu den bei RT durchgeführten Messungen war danach allerdings kein weiterer Aktivitätsverlust mehr zu beobachten. Nach 10 Minuten lag die BGLU-Aktivität bei $4,93 \pm 0,42 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.20 A).

Bezüglich der HNL-Aktivität waren die Befunde ähnlich. Intaktes, bei RT untersuchtes Gewebe wies eine Enzymaktivität von $1,10 \pm 0,39 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Sie stieg verletzungsbedingt innerhalb von 30 Sekunden auf $6,12 \pm 0,63 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Der AF beträgt also 5,5. Nach 5 Minuten war auch was die HNL-Aktivität anbelangt ein Rückgang zu beobachten. Sie sank auf $3,82 \pm 0,25 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Nach 10 Minuten betrug die Enzymaktivität noch $2,99 \pm 0,50 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Intaktes Gewebe derselben Spreite wies bei 5 °C eine HNL-Aktivität von $1,07 \pm 0,24 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ auf. Als Reaktion auf mechanische Verletzung stieg sie innerhalb von 30 Sekunden auf $4,59 \pm 0,87 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$, was einem AF von 4,3 entspricht. Nach 5 Minuten war sie wie auch bei den vorherigen Proben gesunken und lag bei $3,27 \pm 0,86 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Innerhalb der folgenden 5 Minuten war dann, ähnlich wie bei den 5 °C-Messungen zur BGLU, kein weiterer Aktivitätsverlust mehr zu beobachten. Die HNL-Aktivität stieg vielmehr leicht an und betrug nach 10 Minuten $3,67 \pm 0,86 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.20 B).

Die Kinetik der Aktivierung von LIN und HNL weist also offenbar eine temperaturabhängige Komponente auf. Erfolgte die Gewebeverletzung bei 5 °C so stieg die jeweilige Enzymaktivität weniger schnell an als dies bei RT der Fall war (s.o.). Der sich nach 5 Minuten bemerkbar machende Aktivitätsverlust könnte auf Proteasen und Verbräunungsreaktionen zurückzuführen sein. Warum dies in den vorherigen Messungen weniger stark ins Gewicht viel (siehe Kapitel 1) ist nicht bekannt. Interessant ist, dass der Aktivitätsverlust, sowohl was LIN als auch was HNL anbelangt, bei 5 °C verlangsamt ist. Innerhalb des zweiten 5-Minuten-Intervalls geht sogar keine Aktivität mehr verloren.

Es kann sich also nicht ausschließlich um verlangsamte Abbau- und Verbräunungsreaktionen handeln. Vielmehr scheint ein Zusammenhang mit einer, der niedrigen Temperatur wegen, noch nicht abgeschlossenen LIN- und HNL-Aktivierung zu bestehen. In diesem Fall würde die aufgrund der Verlangsamung auch noch nach 5 Minuten erfolgende Aktivierung den Aktivitätsverlust durch Proteolyse und Verbräunung ausgleichen.

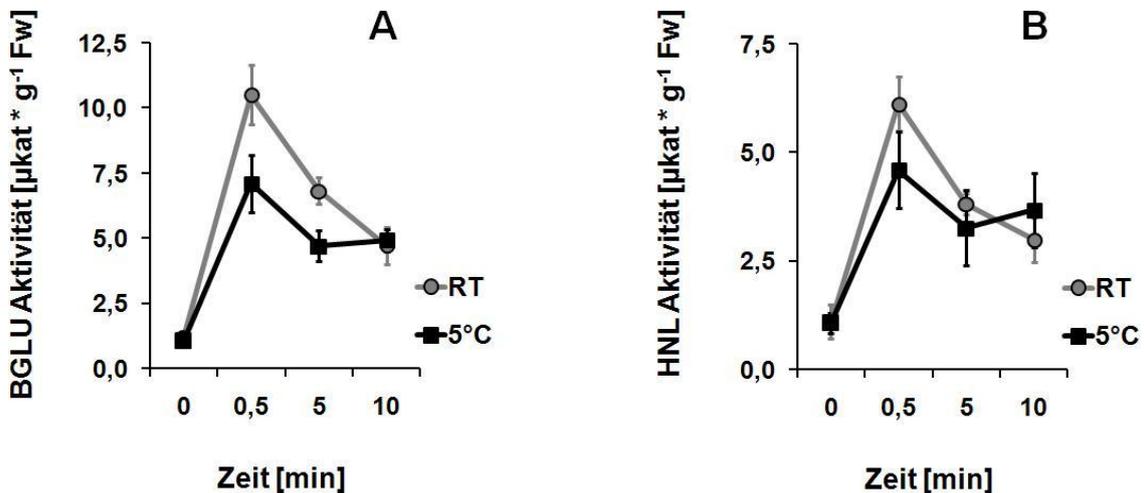


Abbildung 4.3.20: Temperaturabhängigkeit der BGLU- und HNL-Aktivierung

Blätter von *H. brasiliensis* wurden mittels Präpariernadel verletzt und die beschädigten Blattbereiche nach 30 Sekunden sowie 5 und 10 Minuten beprobt. Als Nullwert diente intaktes Blattgewebe. Die Probennahme erfolgte sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 5 °C. Anschließend wurden BGLU- und HNL-Aktivität in den Proteinrohextrakten bestimmt.

A. BGLU-Aktivität in den Proben

B. HNL-Aktivität in den Proben

Der Aktivierungsprozess könnte lebende Zellen erfordern

Der Befund legt nahe, dass an der Aktivierung von LIN und HNL, enzymatische Abläufe beteiligt sind. Diese könnten nach einfachem durchmischen beider Komponenten, wie beispielsweise bei der Aktivierung von PYK 10 aus *A. thaliana*, einsetzen. Dafür spräche, dass bei mehrstündiger Inkubation von *H. brasiliensis*-Blatthomogenaten bei RT in einigen Fällen ein Aktivitätsanstieg zu beobachten war (siehe Abbildung 4.3.3 A). Dies war allerdings nicht bei allen Proben der Fall. Zum Teil blieb die BGLU- bzw. LIN-Aktivität unverändert. Außerdem war die Aktivität höchstens verdoppelt und nie verzehnfacht wie bei mechanischer Verletzung (Daten nicht gezeigt). Dies könnte natürlich der starken Verdünnung im Rahmen der Homogenisierung des Blattgewebes geschuldet sein. Um daher zu prüfen, ob einfaches Mischen der beteiligten Komponenten ausreicht, um eine LIN- und HNL-Aktivierung zu erzielen, wurden ganze Blätter so lange mit Chloroform begast, bis Blausäurebildung den Verlust der Zellintegrität anzeigte. Anschließend wurde die Aktivität beider Enzyme bestimmt und mit der im intakten Gewebe verglichen.

Bezüglich BGLU wurde im intakten Gewebe eine Aktivität von $1,36 \pm 0,21 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen (Pflanze 2). Mechanische Verletzung bewirkte einen Anstieg auf $8,40 \pm 1,60 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bei Blattgewebe, das mit Chloroform (Chf) begast wurde lag die Aktivität bei $2,04 \pm 0,20 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Anschließend mechanische Verletzung bedingte eine BGLU-Aktivität von $2,13 \pm 0,33 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Ähnlich verhielt es sich bei HNL. Im intakten Gewebe wurde eine Aktivität von $2,4 \pm 0,1 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ festgestellt. Mechanische Verletzung bedingte einen Anstieg auf $6,0 \pm 1,0 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$. Bei Chloroformbegasung wurde eine HNL-Aktivität von $1,9 \pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ gemessen. Anschließend mechanische Gewebeverletzung hatte eine Enzymaktivität von $2,3 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Fw}$ zur Folge (siehe Abbildung 4.3.21).

Die Aktivierung von LIN und HNL ist somit offenbar nicht auf ein einfaches Durchmischen zweier Komponenten zurückzuführen. Auch die zusätzliche Gegenwart von Zelldebris, wie es bei mechanischer Gewebeverletzung entsteht, ist nicht ausreichend. Für die Enzymaktivierung scheinen vielmehr lebende Zellen benötigt zu werden. Dafür spricht auch, dass bei einem sehr hohen Grad der Gewebeverletzung (> 150 Einstiche) eine weniger starke Enzymaktivierung festzustellen ist (Daten nicht gezeigt). Dagegen spricht allerdings, dass nach längerer Inkubation von Proteinrohextrakten bei Raumtemperatur in einigen Fällen eine Aktivitätserhöhung festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 4.3.3 A). Dies ist bei Rohextrakten durchaus möglich, da mit biogenen Detergentien und proteolytischen Aktivitäten gerechnet werden muss.

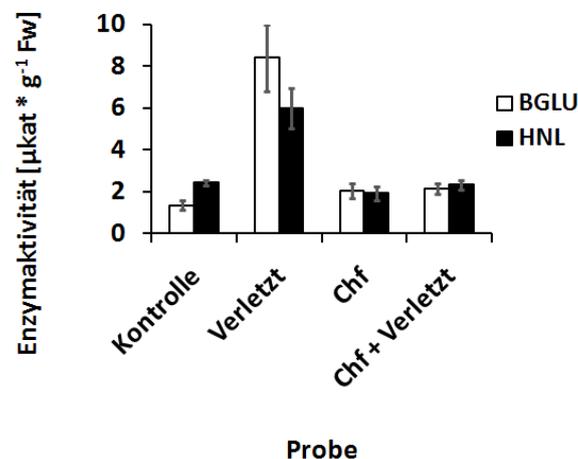


Abbildung 4.3.21: BGLU- und HNL-Aktivität im Blattgewebe nach Aufhebung der Zellintegrität durch Chloroformbegasung

Blätter von *H. brasiliensis* wurden so lange mit Chloroform (Chf) begast, bis die einsetzende Blausäurefreisetzung den Verlust der Zellintegrität anzeigte. Anschließend wurden Teile der Blattspreite mittels Präpariernadel noch mechanisch verletzt. Von beiden Blattbereichen wurden Proben genommen und die BGLU- und HNL-Aktivität in diesen bestimmt. Als Kontrolle diente intaktes und verletztes Blattgewebe, das zuvor nicht mit Chloroform begast worden war.

Kontrolle: BGLU- bzw. HNL-Aktivität bei Extraktion von intaktem Blattgewebe; Verletzt: Extraktion von verletztem Blattgewebe; Chf: Mit Chloroform begastes Blattgewebe; Chf + Verletzt: Mit Chloroform begastes und anschließend mechanisch verletztes Blattgewebe.

Ein Wundsignal könnte die Aktivierung einleiten

Sollten an der LIN- und HNL-Aktivierung intakte Zellen beteiligt sein, so müssten diese zunächst ein Signal empfangen, dass sie über die Gewebeverletzung informiert. Da dieses Signal apoplastisch entstehen müsste könnte es abwaschbar sein. Gewebeverletzung unter Flüssigkeit sollte daher zu einer verringerten, oder zu keiner Enzymaktivierung führen.

Im intakten Blattgewebe der beprobten Pflanze lag die BGLU-Aktivität bei $1,93 \pm 0,30 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Mechanische Verletzung hatte einen Anstieg auf $5,86 \pm 1,17 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ zur Folge. Erfolgte die Gewebeverletzung hingegen unter Flüssigkeit (200 μl Citratpuffer pH 5,6), so verringerte sich die BGLU-Aktivität leicht auf $1,60 \pm 0,25 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Die BGLU-Aktivität im Tropfen betrug $0,61 \pm 0,19 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Zusammen mit der im Gewebe gemessenen sind es $2,21 \pm 0,25 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$, was nahezu dem Nullwert entspricht (siehe Abbildung 4.3.22). Unter Flüssigkeit kommt es also nicht zu einer verletzungsbedingten Aktivierung der BGLU, was auf die Verdünnung des Verletzungssignals zurückzuführen sein dürfte.

Was HNL anbelangt betrug der Kontrollwert im unverletzten Gewebe $1,1 \pm 0,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Bei mechanischer Verletzung stieg der Wert auf $2,9 \pm 0,4 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Erfolgte die Gewebeverletzung unter Flüssigkeit, so viel der Anstieg geringer aus und die HNL-Aktivität betrug $1,2 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Die im Tropfen gemessene Aktivität lag bei $0,7 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Zusammen mit der im Gewebe gemessenen beträgt die HNL-Aktivität somit $1,9 \pm 0,2 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.22).

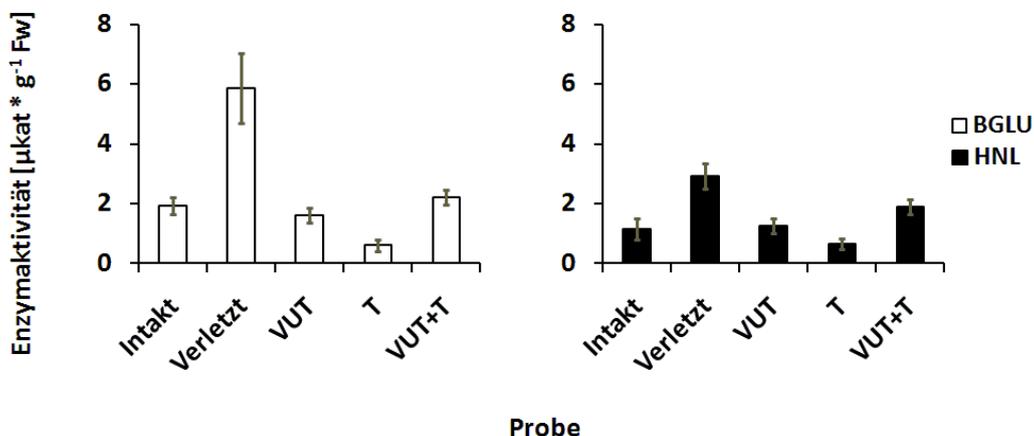


Abbildung 4.3.22: Aktivierung von BGLU und HNL bei Verletzung des Blattgewebes unter Flüssigkeit

Blätter von *H. brasiliensis* wurden mittels Präpariernadel verletzt. Die Verletzung erfolgte unter einem Flüssigkeitstropfen (Citratpuffer pH 5,6) definierten Volumens. Anschließend wurden die verletzten Blattflächen beprobt. Die Aktivität von BGLU und HNL wurde sowohl in den Proteinrohextrakten als auch in den Tropfen bestimmt.

Intakt: BGLU- bzw. HNL-Aktivität bei Extraktion von intaktem Gewebe; Verletzt: Verletztes Gewebe; VUT: Unter Flüssigkeitstropfen verletztes Gewebe; T: BGLU- bzw. HNL-Aktivität im Flüssigkeitstropfen; VUT+T: Die Enzymaktivitäten die im unter Flüssigkeit verletztem Gewebe und im zugehörigen Tropfen gefunden wurden, sind hier addiert.

Im Gegensatz zur LIN findet bei HNL also auch unter Flüssigkeit, eine allerdings geringere, Aktivitätserhöhung in Zusammenhang mit Gewebeerletzung statt. Diese könnte aber auch auf die oft problematische Extraktion des HNL-Proteins zurückzuführen sein. Bei wiederholter Extraktion ein und desselben Pellets können zumindest 1- bis 2-mal noch kleinere Mengen an HNL gelöst werden (GRÜTZMACHER 1989). Das Verletzen unter Flüssigkeit könnte somit auch zu einer geringfügig gesteigerten Extraktion bereits aktiven Enzyms, das anderenfalls noch dem Pellet angehaftet hätte, geführt haben.

Die LIN- und HNL-Aktivierung scheint innerhalb der Zellen zu erfolgen

Da für die Aktivierung von LIN und HNL offenbar lebende Zellen nötig sind, stellt sich die Frage, ob diese Zellen, nach Perzeption des Verletzungssignals eine Komponente modifizieren und in den Apoplasten abgeben, die dort die Aktivierung bewirkt, oder ob die Aktivierung innerhalb der intakten Zellen stattfindet. Sollte die Aktivierung im Apoplasten erfolgen, so müsste sich der Großteil der BGLU- und HNL-Aktivität abwaschen lassen. Würde sie aber in der Zelle stattfinden, so müsste die Enzymaktivität auch nach dem Waschschrift im Blattgewebe verbleiben. Zwar ist das Blattgewebe von *H. brasiliensis* schwierig zu infiltrieren (siehe Abbildung 4.3.2), jedoch zeigt die Abbildung auch, dass zumindest die verletzten Bereiche für externe Flüssigkeiten relativ gut zugänglich sind.

Im intakten Blattgewebe wurde eine BGLU-Aktivität von $1,73 \pm 0,35 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Bei Verletzung konnte ein Anstieg auf $8,62 \pm 0,64 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ festgestellt werden, was einem AF von 5 entspricht. Wurde der verletzte Blattbereich 1 Minute nach erfolgter Gewebeerletzung mit 200 μl Citratpuffer (pH 5,6) gespült betrug die BGLU-Aktivität im Blattgewebe $4,75 \pm 0,78 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Im Tropfen lag sie bei $1,61 \pm 0,28 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ und entsprach damit nahezu dem Kontrollwert. Gespültes Gewebe und Tropfen weisen eine Gesamtaktivität von $6,36 \pm 0,53 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ auf (siehe Abbildung 4.3.23), der AF beträgt also 4. Insgesamt fällt die Aktivitätszunahme bei Spülen des Gewebes damit zwar etwas geringer aus, in jedem Fall verbleibt der Großteil der BGLU-Aktivität aber im Gewebe. Der abwaschbare Teil entspricht der Enzymaktivität im Kontrollgewebe, also dem auch vor der Gewebeerletzung bereits löslichen Enzym.

Bezüglich HNL wurde im intakten Gewebe eine Enzymaktivität von $1,39 \pm 0,06 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ gemessen. Bei mechanischer Gewebeerletzung erhöhte sie sich auf $5,48 \pm 0,09 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$, was einem AF von 3,9 entspricht. Wurde der verletzte Blattbereich gespült, lag die Aktivität bei $2,71 \pm 0,32 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$. Im Tropfen betrug sie $2,17 \pm 0,40 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$, was im Gegensatz zu den BGLU Messungen deutlich über dem Nullwert liegt. Die Gesamtaktivität von gespültem Gewebe und Tropfen belief sich auf $4,88 \pm 0,32 \mu\text{kat} * \text{g}^{-1} \text{Fw}$ (siehe Abbildung 4.3.23). Der AF ist somit 3,5. Die Aktivierung verringert sich damit beim Spülen weniger deutlich als dies bei BGLU der Fall war. Außerdem übersteigt die abwaschbare HNL-Aktivität, die im Kontrollgewebe vorhandene. Ein

wesentlicher Teil der nach Verletzung zusätzlich vorhandenen HNL lässt sich allerdings nicht aus dem zerstörten Gewebe herauswaschen.

Sowohl LIN als auch HNL scheinen, was HNL anbelangt zumindest in Teilen, innerhalb der Zellen rund um eine Verletzung als Reaktion auf die Gewebeerstörung aktiviert zu werden.

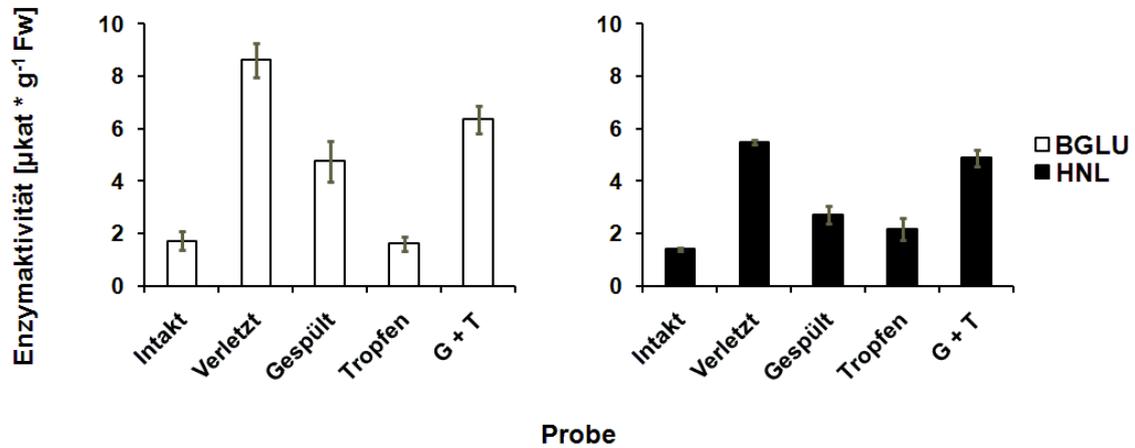


Abbildung 4.3.23: Abwaschbarkeit von aktivierter BGLU und HNL von verletzten Blattbereichen

Blattgewebe von *H. brasiliensis* wurde mittels Präpariernadel verletzt. Nach einer Minute Inkubationszeit wurden die verletzten Blattbereiche mit 200 µl Citratpuffer (pH 5,6) gespült. Anschließend wurden die verletzten Bereiche beprobt. BGLU- und HNL-Aktivität wurden sowohl im Proteinrohextrakt als auch in der zum Spülen verwendeten Pufferlösung bestimmt. Als Kontrolle diente intaktes sowie verletztes Blattgewebe, welches vor der Beprobung nicht gespült wurde.

Intakt: BGLU- bzw. HNL-Aktivität im Extrakt aus intaktem Gewebe; Verletzt: Verletztes Gewebe; Gespült: Verletztes und gespültes Gewebe; Tropfen: BGLU- bzw. HNL-Aktivität im zum Spülen verwendeten Tropfen; G + T: Die in verletztem und gespültem Gewebe sowie in der zum Spülen verwendeten Pufferlösung gefundenen Enzymaktivitäten sind hier addiert.

4.4 Diskussion

Der Aktivierungsmechanismus auf Molekülebene

Die verletzungsbedingte Aktivierung der LIN aus *H. brasiliensis* erfolgt dadurch, dass zuvor unlösliches, inaktives Enzym innerhalb weniger Sekunden in Lösung übergeht und dadurch aktiviert wird (siehe Abbildung 4.3.16 und 17). Die Aktivierung steht also nicht, wie zum Teil vermutet (VOß 2001), in Zusammenhang mit einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen unterschiedlichen, löslichen Oligomerformen. Trotzdem ist die spontane Zusammenlagerung der Monomere, die von SELMAR et al. (1987) detailliert beschrieben wurde, offenbar von zentraler Bedeutung für den Aktivierungsmechanismus. Die Oligomere können nämlich beträchtliche Größe erreichen. In den Experimenten von SELMAR et al. (1987) wurden Oligomere aus bis zu 26 Monomeren gefunden. Die Bildung größerer Aggregate führt, wie für *Z. mays* und *A. thaliana* beschrieben (siehe Seite 132), zur Unlöslichkeit der BGLU-Komplexe. Allerdings scheinen die Polymere, im Gegensatz zu *Z. mays* und *A. thaliana* (siehe Einleitung) im Falle des Kautschukbaumes, katalytisch inaktiv zu sein. Andernfalls ließe sich die Tatsache, dass im Pellet kaum BGLU- bzw. LIN-Aktivität nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 4.3.19) nicht erklären. Depolymerisierung hingegen führt zu erhöhter Löslichkeit und zur Aktivierung des Enzyms (siehe Abbildung 4.4.1). Sie wird offenbar durch mechanische Verletzung des Blattgewebes hervorgerufen. Wie die Veränderung im Polymerisationsverhalten gesteuert wird ist nicht bekannt.

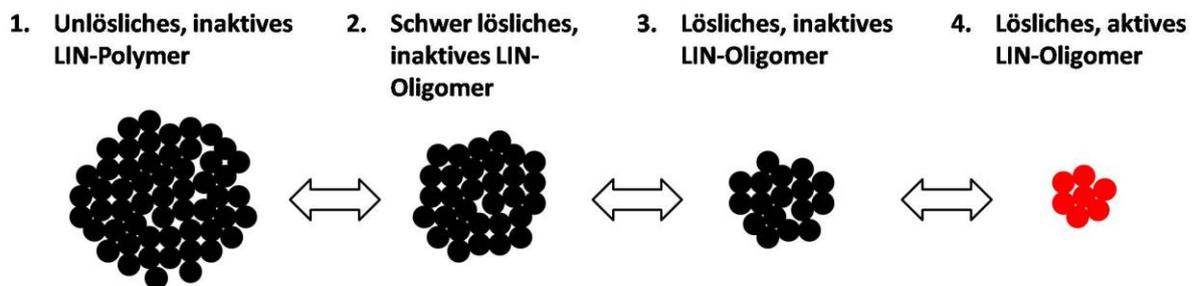


Abbildung 4.4.1: Modell zur BGLU-Aktivierung durch Verringerung des Polymerisationsgrades

LIN aus Blättern von *H. brasiliensis* lagert sich spontan zu Homooligomeren unterschiedlicher Größe zusammen (SELMAR et al. 1987). Diese scheinen mit zunehmender Größe sowohl ihre katalytische Aktivität als auch ihre Löslichkeit zu verlieren. Im intakten Blattgewebe liegt ein Großteil des Enzyms in Form der unlöslichen und inaktiven Polymere vor. Gewebeverletzung scheint zu einer Gleichgewichtsverschiebung hin zu kleineren und damit löslichen und aktiven Oligomeren zu führen. Wie die Gleichgewichtseinstellung reguliert wird ist nicht bekannt.

Auch bezüglich der HNL erfolgt die verletzungsbedingte Aktivierung dadurch, dass zuvor unlösliches Enzym innerhalb weniger Sekunden in Lösung übergeht (siehe Abbildung 4.3.16 und 17). HNL scheint im Falle von *H. brasiliensis* als Dimer vorzuliegen (siehe Einleitung). Was Maniok angeht wurde auch von Trimeren und Tetrameren berichtet (siehe Seite 133). Eine Polymerisation wie im Falle der

LIN konnte im Rahmen der hier vorgestellten Versuche aber nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 4.3.13). Ein Aktivierungsmechanismus, der dem der LIN vergleichbar ist, wäre daher wahrscheinlich nur möglich, wenn HNL sich mit anderen, polymerisierten Proteinen zusammenlagern würde. Interessanter Weise wird Mandelonitrillyase (MDL) in Kotyledonen von *Prunus serotina* gemeinsam mit Speicherproteinen in Protein-Bodies (PB) abgelegt (SWAIN et al. 1992). Selbiges könnte auch in den Blättern von *H. brasiliensis* der Fall sein. Mechanische Verletzung würde dann, Analog zur LIN, zu einer Auflösung der Polymerstruktur führen, was wiederum erhöhte Löslichkeit und die Aktivierung des Enzyms bedingen könnte (siehe Abbildung 4.4.2). Diese wäre im Vergleich zur LIN-Aktivierung allerdings höchstwahrscheinlich irreversibel, da eine spontane Interaktion von HNL mit anderen Proteinen bisher nicht beschrieben wurde.

Der Aktivierungsmechanismus auf Gewebeebene

LIN aus *H. brasiliensis*-Blättern ist zumindest in Teilen im Apoplasten lokalisiert (SELMAR 1987). Dies wird auch von Linamarase aus *M. esculenta* berichtet (McMahon et al. 1995). Inaktive LIN aus *H. brasiliensis* befindet sich aber offenbar in den Zellen, denn ein Abwaschen des aktivierten Enzyms von der Verletzung ist nicht möglich. Selbiges scheint auch für HNL zu gelten (siehe Abbildung 4.3.25). Von *Prunus serotina* ist bekannt, dass sowohl Prunasinhydrolase (PH) als auch MDL, in den Vakuolen phloemassoziierter Zellen gespeichert wird. Hierbei ist in den Vakuolen entweder PH oder MDL abgelegt. Zellen die beide Enzyme enthielten wurden nicht gefunden (SWAIN und POULTON 1994). Die hier vorgestellten Befunde legen nahe, dass selbiges auch für HNL und LIN aus *H. brasiliensis* gilt. LIN scheint als unlösliches Polymer in den Vakuolen zumindest einiger Blattzellen abgelegt zu sein. Bei Verletzung könnten diese Zellen ein Wundsignal perzipieren, was letztendlich zur Veränderung des Polymerisationsverhaltens und zur Aktivierung innerhalb der lebenden Zelle führt. Ein Teil der LIN müsste, wie von SELMAR et al. (1987) berichtet, apoplastisch lokalisiert und enzymatisch aktiv sein (siehe Abbildung 4.4.2).

HNL scheint ebenfalls als Polymer, allerdings wohl im Verbund mit anderen Proteinen, in den Vakuolen einiger Blattzellen vorzuliegen. Auch hier könnten diese Zellen ein Wundsignal perzipieren und die Auflösung der Polymere und damit auch die Aktivierung der HNL einleiten. Darüber hinaus könnte ein Teil der HNL, wie für Maniok beschrieben (WHITE et al. 1998) im Apoplasten lokalisiert sein. Möglicher Weise besteht eine Assoziation an die Plasmamembran (BALLHORN et al. 2007). Dafür sprächen die im Vergleich zur LIN hohen Enzymaktivitätsrückstände im Pellet (siehe Abbildung 4.3.19). Die Membranassoziation könnte, ähnliche wie bei einigen PPOs eine Latenz bedingen. In diesem Fall sollte aber die Zerstörung der Membranen alleine ausreichen, um die Assoziation zu lösen und das Enzym zu Aktivieren. Membranassoziierte HNL könnte die Grundaktivität im intakten Gewebe bedingen (siehe Abbildung 4.4.2).

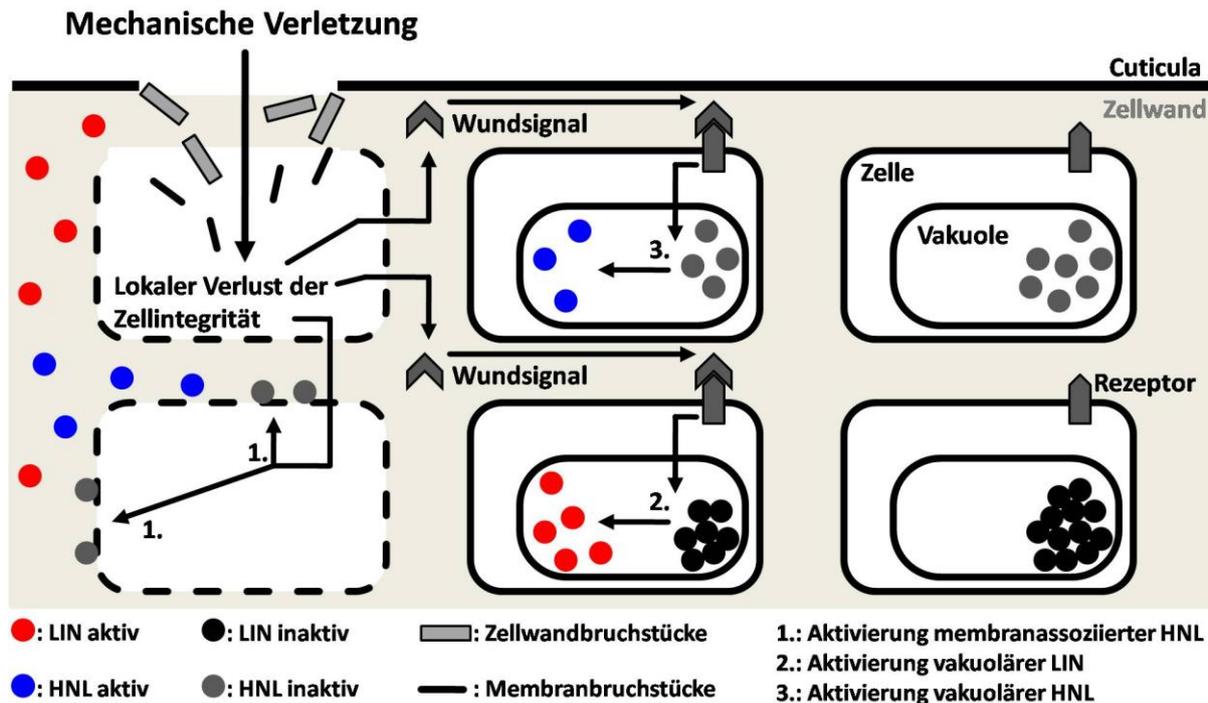


Abbildung 4.4.2: Modell zum Mechanismus der LIN- und HNL-Aktivierung in Zusammenhang mit mechanischer Gewebeverletzung

LIN könnte in Blättern von *H. brasiliensis* sowohl im Apoplasten als auch in den Vakuolen einiger Zellen vorkommen. Dabei scheint im intakten Gewebe lediglich das im Apoplasten befindliche Enzym löslich und katalytisch aktiv zu sein, während das in der Vakuole gespeicherte aufgrund der Bildung von Homopolymeren unlöslich und katalytisch inaktiv ist. Mechanische Gewebeverletzung könnte die Bildung eines Wundsignals hervorrufen, das, wenn es von den umliegenden, intakten Zellen perzipiert wird, die Aktivierung der vakuolär gespeicherten LIN bewirkt. Die Aktivierung käme durch Auflösung der Homopolymere zustande.

Ähnliches könnte für **HNL** gelten. Allerdings liegt hier der apoplastisch lokalisierte Teil des Enzyms möglicherweise in Assoziation mit der Plasmamembran vor. Solange diese Assoziation besteht könnte HNL latent sein. Darüber hinaus scheint HNL auch in den Vakuolen einiger Blattzellen vorzukommen und hier ebenfalls als unlösliches Polymer, allerdings in Verbund mit anderen Proteinen vorzuliegen. Gewebeverletzung würde zunächst zur Lösung der membranassozierten HNL vom Plasmalemma der zerstörten Zellen und damit zur Aktivierung führen. Außerdem könnte ein Wundsignal gebildet werden, das, wenn es von den umliegenden, intakten Zellen perzipiert wird, die Aktivierung der vakuolär gespeicherten HNL bewirkt. Die Aktivierung käme durch Auflösung der Heteropolymere zustande.

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

(II.) Diskussion und Ausblick

II. 1: Verletzungsbedingte Aktivierung von LIN und HNL

Wie hier gezeigt wird, erfahren Linamarase (LIN) und Hydroxynitrillyase (HNL) in Blättern des Kautschukbaumes *Hevea brasiliensis* eine sekundenschnelle Aktivierung in Reaktion auf Gewebeverletzung. Die Aktivierung der beiden an der Cyanogenese beteiligten Enzyme führt zu einer beschleunigten Blausäure-(HCN)-Freisetzung. LIN kommt im Blattgewebe nicht nur apoplastisch vor, sondern wird offensichtlich auch in der Vakuole leitbündelnaher Zellen der oberen Epidermis und leitbündelassoziierter Parenchymzellen gespeichert. HNL, die z.T. in Assoziation mit der Plasmamembran vorzuliegen scheint, findet sich in der Vakuole von Leitbündel nahen Zellen der unteren Epidermis. Die vakuoläre Lokalisation scheint in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung der beiden Enzyme zu stehen. LIN und HNL, die in der Vakuole gespeichert sind, liegen dort offenbar in unlöslicher und inaktiver Form vor. Erst Gewebeverletzung führt zu einer Erhöhung der Löslichkeit und damit auch zur Aktivierung, wie der Vergleich der Signalverteilung bei Immunofluoreszenzdetektion von LIN zwischen intaktem und zerstörtem Gewebe vermuten lässt (siehe Seite 115 und 116). Für eine Aktivierung innerhalb intakter Zellen spricht auch, dass insbesondere im Falle der LIN, ein Abwaschen der zusätzlichen Enzymaktivität nicht möglich ist (siehe Seite 160 und 161). Auf der anderen Seite findet aber offenbar eine Überschwemmung des verletzten Gewebereiches mit LIN und HNL statt (siehe Seite 112). Der Aktivierungsprozess scheint somit auch in zerstörten Zellen ablaufen zu können. Das dieses Protein beim Spülen nicht abgewaschen wurde könnte mit der schlechten Benetzbarkeit und Infiltrierbarkeit der Blätter zusammenhängen. In jedem Fall scheint der Aktivierungsprozess aber lebende Zellen zu benötigen, wie die Inkubationen mit Chloroform zeigten (siehe Seite 158). Diese könnten ein frei diffundierendes Signal generieren, das sowohl in die zerstörten Bereiche als auch in die Vakuolen der umliegenden Zellen gelangt und letztendlich den Aktivierungsprozess auslöst (siehe Abbildung II. 1). Möglicher Weise handelt es sich bei diesem Signal um eine der vielen reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS: Reactive Oxygen Species), die als Reaktion auf Gewebeverletzung entstehen. Die Moleküle könnten aufgrund ihrer Beweglichkeit in Geweben auch die Vakuolen intakter Zellen erreichen. Wegen der hohen Reaktivität ist ihr Wirkungsbereich aber sehr begrenzt, was sich mit der Beschränkung der LIN und HNL-Aktivierung auf den verletzten Gewebeteil deckt (siehe Seite 27).

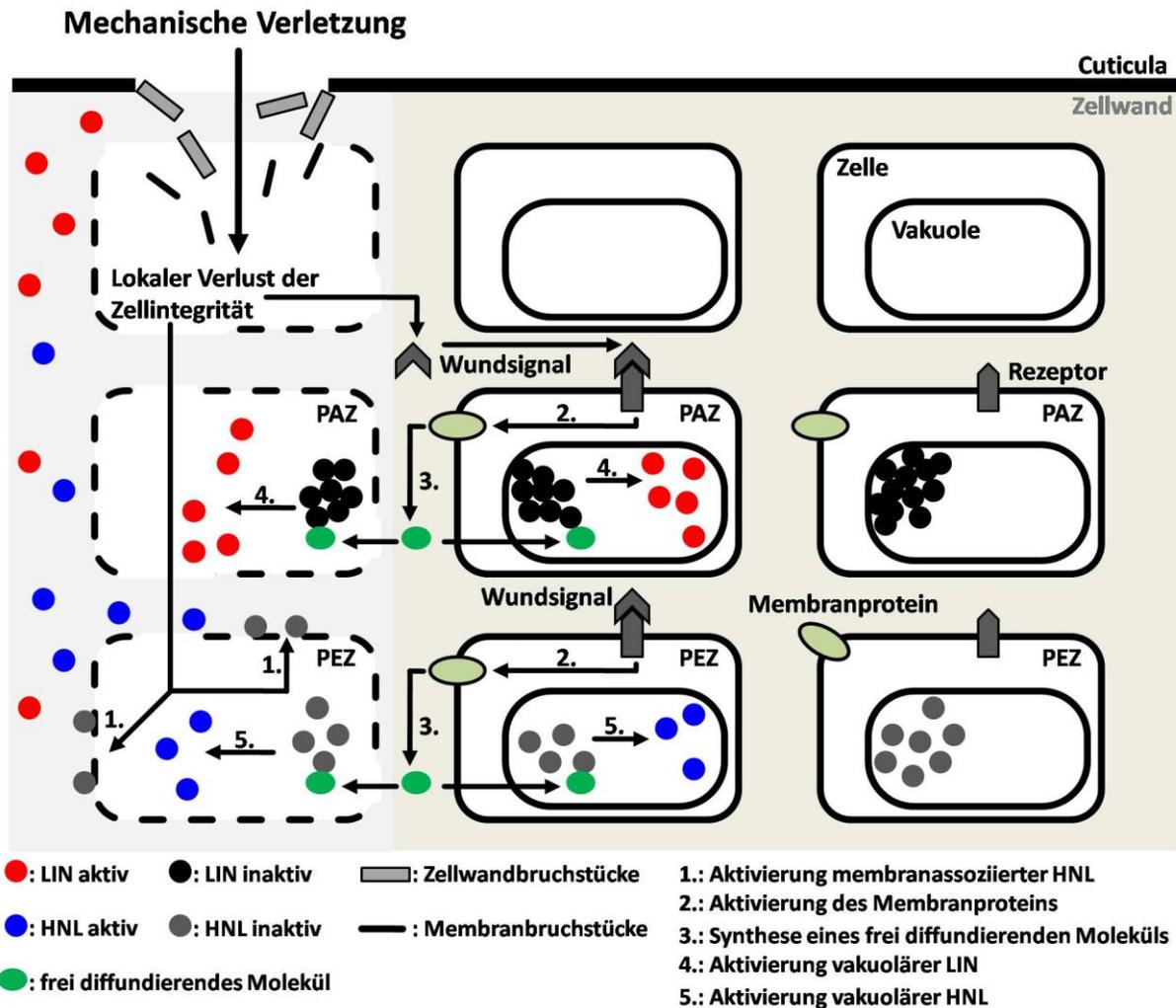


Abbildung II. 1.1: Erweitertes Modell zum Mechanismus der LIN- und HNL-Aktivierung

LIN kommt in Blättern von *H. brasiliensis* sowohl im Apoplasten als auch in den Vakuolen einiger Zellen vor. Dabei scheint im intakten Gewebe lediglich das im Apoplasten befindliche Enzym löslich und katalytisch aktiv zu sein, während das in der Vakuole gespeicherte, aufgrund der Bildung von Homopolymeren, unlöslich und katalytisch inaktiv ist. Mechanische Gewebeerletzung könnte die Bildung eines Wundsignals hervorrufen, das, wenn es von den umliegenden, intakten Zellen perzipiert wird, die Aktivierung eines (2.) membranständigen Proteins bewirkt, das wiederum die Synthese eines frei diffundierenden Moleküls katalysiert (3.). Dieses Molekül könnte sowohl in die zerstörten Bereiche als auch in die umliegenden, intakten Zellen gelangen und dort die Auflösung der LIN-Homopolymere hervorrufen, wodurch die Aktivierung zustande käme (4.).

Ähnliches könnte für HNL gelten. Allerdings liegt hier der apoplastisch lokalisierte Teil des Enzyms möglicherweise in Assoziation mit der Plasmamembran vor. Solange diese Assoziation besteht könnte HNL latent sein. Darüber hinaus scheint HNL auch in den Vakuolen einiger Blattzellen vorzukommen und hier ebenfalls als unlösliches Polymer, allerdings in Verbund mit anderen Proteinen, vorzuliegen. Gewebeerletzung würde zunächst zur Lösung der membranassozierten HNL (1.) vom Plasmalemma der zerstörten Zellen und damit zur Aktivierung führen. Außerdem könnte, analog zur LIN, ein frei diffundierendes Molekül gebildet werden, das die Auflösung der Heteropolymere und damit die Aktivierung von HNL, sowohl in den Vakuolen der PEZ als auch in den zerstörten Zellbereichen (5.) bewirkt.

PAZ: phloemassoziierte, LIN-speichernde Zelle; **PEZ:** phloemnahe, HNL-speichernde Epidermiszelle; hellgrauer Bereich = direkter Einfluss durch Verletzung; beige = indirekter Einfluss durch Verletzung

ROS können nur in Gegenwart ausreichender Mengen an Sauerstoff entstehen. Das bei Verletzung des Blattgewebes unter Flüssigkeit keine Enzymaktivierung festgestellt werden konnte (siehe Seite 159), ist somit möglicher Weise auch darauf zurückzuführen, dass eine ROS-Bildung aufgrund der schlechten Sauerstoffverfügbarkeit unmöglich war. Allerdings muss angemerkt werden, dass H_2O_2 , welches Enzymaktivitäten über die Oxidation von Cysteinresten beeinflussen kann, nicht an der Aktivierung von LIN beteiligt zu sein scheint (siehe Seite 137).

II. 2: Gewebespezifische Expression unterschiedlicher Linamarasen

H. brasiliensis verfügt offenbar nicht nur über eine Linamarase, sondern insgesamt über mindestens 4 Enzyme dieser Art. Es wäre möglich, dass diese, ähnlich wie bei *Manihot esculenta* (siehe McMAHON et al. 1995), gewebespezifisch exprimiert werden. Beim Maniok konnte in den Wurzelknollen nur eine, katalytisch weniger aktive, Linamarase nachgewiesen werden, während im Blattgewebe 3 Linamarasen vorhanden sind. Die Abweichende Enzymausstattung könnte in Zusammenhang mit der Speicherfunktion der Wurzelknollen stehen. Eine organspezifische Expression unterschiedlicher Linamarasen dürfte eine wichtige Einflussgröße (siehe Abbildung II. 2) in Bezug auf die pflanzliche Cyanogenese darstellen. Eine genaue Charakterisierung von Substratspezifität und Funktion dieser Enzyme ist daher in naher Zukunft wünschenswert.

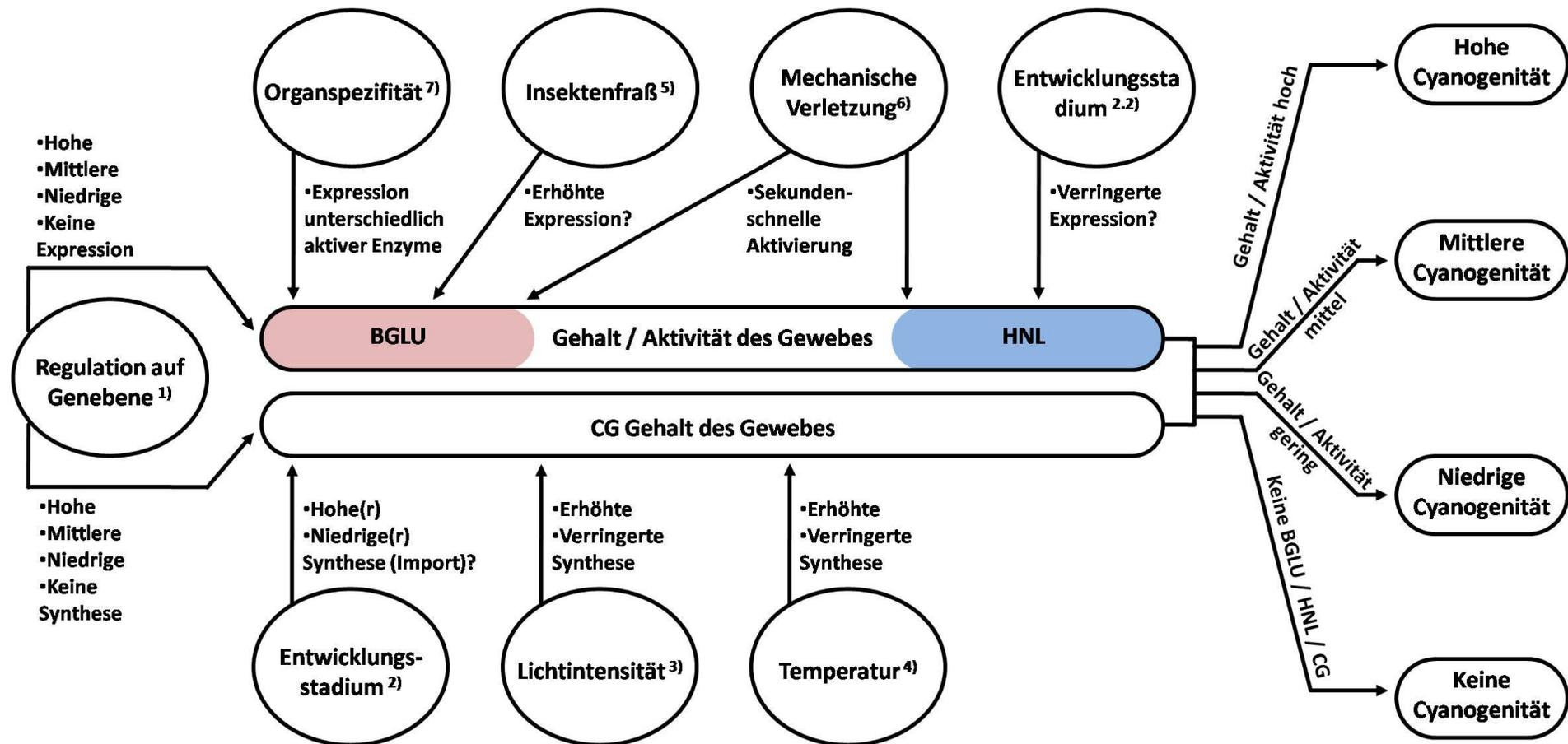


Abbildung II. 2.1: Einflussgrößen der pflanzlichen Cyanogenese (erweitert 2)

Die pflanzliche Cyanogenese wird durch eine Reihe endogener und exogener Faktoren beeinflusst. Das Schema gibt einen Überblick zu einigen der bisher beschriebenen Einflussgrößen. Faktoren wie im InsektenSpeichel enthaltene β -Glycosidasen, β -Glycosidase-Inhibitoren oder Proteasen wurden bewusst nicht berücksichtigt.

1: *Trifolium repens* (HUGHES 1981); 2.1: *H. brasiliensis* (LIEBEREI et al. 1985); *Phaseolus lunatus* (BALLHORN et al. 2005); 2.2: *H. brasiliensis* (SELMAR et al. 1989); *Sorghum bicolor* (HALKIER und MØLLER 1989); 3: *Linum* (TRION E 1960); 4: *Trifolium repens* (HUGHES 1981); 5: *Phaseolus lunatus* (BALLHORN et al. 2006); 6: *H. brasiliensis* und *M. esculenta* (VOß 2001; KADOW 2010); 7: *Manihot esculenta* (MCMAHON et al. 1995);

BGLU: β -Glucosidase; HNL: Hydroxynitrillyase; CG: Cyanogene Glucoside

II. 3: Expression, Speicherung und Mobilisierung von BGLU 1 und 3

Junges Blattgewebe wird bei *H. brasiliensis* zumindest in der Keimlingsphase über Linamarin mit reduziertem Stickstoff versorgt (SELMAR et al. 1988). Doch Linamarin scheint nicht die einzige Stickstoffquelle zu sein. In spezialisierten Zellen des sekundären Phloems von Spross und Wurzel werden große Mengen an Linamarase (BGLU 3) als vegetatives Speicherprotein abgelegt, das zu Beginn des Blattaustriebs mobilisiert wird (TIAN et al. 1998; TIAN et al. 2006 in NCBI). Junge *H. brasiliensis*-Blätter sind *Sink*-Gewebe und müssen ohnehin eine Vielzahl neuer Proteine synthetisieren. Trotzdem verfügen sie über einen hohen Gehalt an Linamarase. Es wäre daher denkbar, dass diese, wie auch die cyanogenen Glucoside, importiert wird. Zum einen, um den Fraßschutz junger Blätter zu gewährleisten, zum anderen um eine ausreichende Versorgung mit Stickstoff und Aminosäuren zu garantieren. Teile dieser Reserven würden in den Vakuolen phloemnaher Zellen zwischengelagert. Für diese Überlegung sprechen erste Befunde die mittels *in-situ*-reverser-Transkription (RT) erzielt wurden. Bei dieser Methode werden Blattstücke zunächst in Formaldehydlösung fixiert und anschließend für die *In-situ* Umschreibung von RNA in cDNA genutzt. Durch die Verwendung DIG-markierter dNTPs lässt sich die cDNA markieren. Bei Einsatz spezifische Primer, sollten nur solche Zellen markiert werden, die die Zielsequenz exprimieren. Das DIG kann später mit einem Antikörper detektiert werden, der beispielsweise wie hier mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, was eine Färbung mittels NBT-BCIP (zur NBT-BCIP-Färbung siehe Material und Methoden Kapitel 4) ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen, dass BGLU 1 offenbar vornehmlich in den Zellen der oberen Epidermis und des Palisadenparenchyms exprimiert wird (siehe Abbildung II.2 A - C). Im Bereich der Leitbündel hingegen, wo die vakuoläre Speicherung stattfindet, konnte keinerlei *BGLU 1*-mRNA detektiert werden. Allerdings muss zunächst die Spezifität der RT überprüft und die Qualität der Einbettung verbessert werden, um eindeutige Aussagen machen zu können.

Im Gegensatz zu den vorläufigen Befunden der gewebespezifischen Expression von BGLU 1, ist die *In-situ*-Aktivitätsfärbung im Bereich der Leitbündel besonders stark (siehe Abbildung II.2 D), was als Beleg für den Transport von BGLU 3 durch das Phloem angeführt werden könnte. Auf der anderen Seite haben die Leitbündel natürlich auch einen größeren Durchmesser, was zu dem Eindruck intensiverer Färbung führen kann. Darüber hinaus kann das von Außen applizierte Substrat im Bereich der Leitbündel besonders gut in das Gewebe eindringen. So ist am Rand der Blattscheibe, wo der Zutritt zum Palisaden- und Schwammparenchym ebenfalls erleichtert ist, das Gewebe der Intercostalfelder fast genauso intensiv gefärbt, wie das der Blattadern. Die scheinbar höhere Aktivität könnte also einfach auf eine bessere Substratverfügbarkeit zurückzuführen sein. Von Bedeutung in Zusammenhang mit dem Transport von Linamarase ist der Befund, dass bei *M. esculenta* eine

Verteilung des Enzyms über verschiedene Gewebe und Organe mittels des Netzwerkes der Latexgefäße erfolgen könnte (PANCORO und HUGHES 1992).

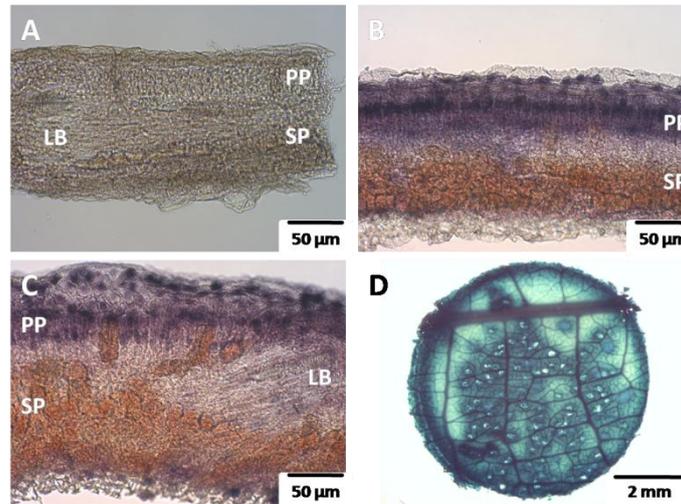


Abbildung II.3.1: Lokalisation der *LIN*-Expression und *in situ* BGLU-Aktivitätsfärbung im Blattgewebe

Zwecks Detektion der *LIN*-Expression wurden *H. brasiliensis*-Blattstücke zunächst in Formaldehydlösung fixiert. Von diesen wurden 30 - 50 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden für eine *in situ* Synthese von *LIN*-cDNA genutzt. Die hierbei eingebauten DIG-markierten dNTPs ermöglichten eine Detektion der cDNA mittels Antikörper (AK). Der sekundäre AK war mit alkalischer Phosphatase konjugiert, weshalb eine NBT-BCIP-Färbung erfolgen konnte. Die resultierende lila Färbung markiert die Orte der *LIN*-Expression.

Für die *in situ* BGLU-Aktivitätsfärbung wurden Blattscheiben in X-Glu inkubiert. Blattbereiche in denen sich aktive BGLU befindet werden hierdurch blau Markiert.

A: Kontrolle; **B** und **C:** Detektion der *LIN*-Expression; **D:** *in situ* BGLU-Aktivitätsfärbung; LB: Leitbündel; PP: Palisaden-parenchym; SP: Schwammparenchym

Gegen einen Transport von BGLU 3 in sich entwickelnde Blätter spricht, dass das Enzym dort bisher nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl ob der großen Mengen an Linamarase, die sich im Blattgewebe finden, der Nachweis nicht schwierig sein sollte. Außerdem wäre der Phloemtransport ganzer Proteine vermutlich problematisch. Darüber hinaus ist die Expression von *BGLU 1* in den Blattstadien B und C deutlich höher als beispielsweise die von *HNL*. Es ist somit insgesamt betrachtet wahrscheinlicher, dass BGLU 3 im Rahmen der Mobilisierung zunächst zu Aminosäuren abgebaut wird. Im Blatt erfolgt dann eine Neusynthese von BGLU 1, die sowohl der Zwischenspeicherung der Aminosäuren, als auch der Fraßfeindabwehr dient. Für die Speicherung würde ein großer Teil von BGLU 1 in die Vakuolen phloemnaher Zellen transportiert, wo das Enzym als inaktives Polymer vorliegt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Expression von *BGLU 1* in D-Stadienblättern zwar abnimmt, die Enzymaktivität, bezogen auf das Frischgewicht der Blätter aber offenbar zunimmt

(siehe Abbildung II.3). Der Befund könnte damit erklärt werden, dass in den D-Stadien, bei denen es sich um *Source*-Gewebe handelt, eine Mobilisierung vakuolär gespeicherter BGLU 1 einsetzt. Diese wird zur Speicherung während der Trockenperiode in Spross und Wurzel exportiert, oder dient der Versorgung eines neuen Austriebs. Ob hierzu ein Abbau zu Aminosäuren stattfindet lässt sich anhand der Daten nicht belegen. Bei der letztendlichen Klärung wo genau die Synthese der Linamarasen erfolgt, dürfte eine Verbesserung der *In-situ* RT-Detektion von Wichtigkeit sein. Dabei sollte Blatt- als auch Sprossachsengewebe untersucht werden. Um zu klären in welcher Form BGLU 3 aus den Speicherzellen des Phloems exportiert wird, können Analysen des Phloemsaftes vorgenommen werden.

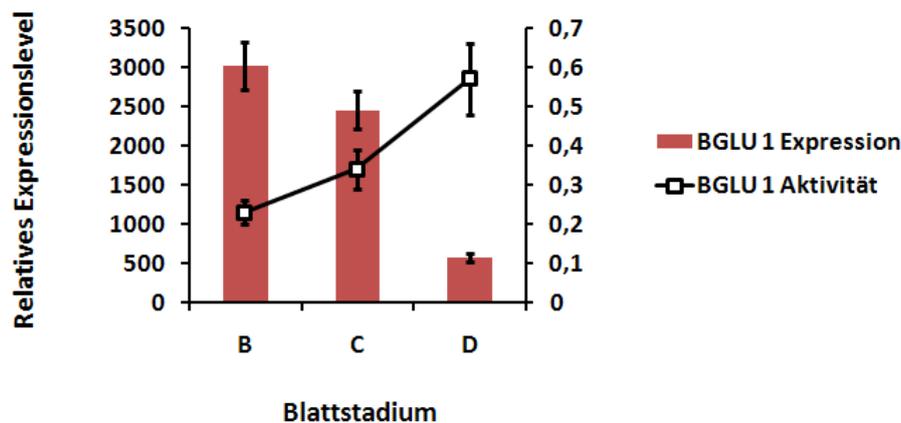


Abbildung II.3.2: Expression und Aktivität von BGLU 1 in Blättern von den Stadien B, C und D

Das relative Expressionslevel in den verschiedenen Blattstadien wurde mittels Real Time PCR festgestellt. Für die Bestimmung der BGLU-Aktivität wurden zunächst Proteinrohextrakte aus Blattgewebe der entsprechenden Stadien hergestellt. In diesen wurde anschließend, unter Verwendung von pNPG als Substrat, die Enzymaktivität ermittelt. Es sei darauf hingewiesen, dass für die beiden Bestimmungen unterschiedliche Blätter verwendet wurden.

Die begonnene heterologe Expression in *Pichia pastoris* sollte es künftig ermöglichen, die 5 aus *H. brasiliensis* bekannten BGLUs in größerer Menge in Reinform darzustellen. So könnte geklärt werden ob die Oligomerbildung bei BGLU 1 ausschließlich auf eine Interaktion zwischen den Monomeren zurückzuführen ist. Des Weiteren ließe sich untersuchen ob die Oligomerbildung auch zur Unlöslichkeit und zur Inaktivierung führen kann, womit der Aktivierungsprozess besser verstanden wäre. Für dessen Klärung könnten außerdem 3D-Strukturanalysen von BGLU 1 hilfreich sein.

Die heterologe Expression auch der übrigen BGLUs wird die Untersuchung der tatsächlichen Substratspezifitäten ermöglichen. Außerdem könnten die hier vorgestellten 3D-Modelle überprüft werden.

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

(III.) Anhang

III. 1: BGLU und HNL-Aktivitäten bei den *H. brasiliensis*-Pflanzen 1 - 5

Tabelle III. 1.1 : Übersicht der an Pflanze 1 - 5 gemessenen BGLU- und HNL-Aktivitäten

Die Tabelle fasst einige der in Proteinrohextrakten aus Blattgewebe gemessenen Enzymaktivitätswerte aus dem ersten Kapitel zusammen.

		Gewebe intakt		Gewebe verletzt	
Blattstadium	Pflanze	BGLU-Aktivität [$\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$]		BGLU-Aktivität [$\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$]	
C	1	$0,96 \pm 0,01$		$7,9 \pm 0,1$	
D	1	$0,94 \pm 0,09$		$7,3 \pm 0,9$	
C	2	$1,15 \pm 0,04$		$11,0 \pm 1,6$	
C	3	$0,41 \pm 0,06$		$4,2 \pm 0,9$	
C	4	$0,49 \pm 0,33$		$7,1 \pm 1,6$	
B	5	$0,29 \pm 0,04$		$3,9 \pm 0,9$	
C	5	$0,34 \pm 0,05$		$3,4 \pm 0,8$	
D	5	$0,57 \pm 0,09$		$3,7 \pm 0,7$	

		Gewebe intakt		Gewebe verletzt	
Blattstadium	Pflanze	HNL-Aktivität [$\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$]		HNL-Aktivität [$\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fw}$]	
B	1	$2,5 \pm 0,2$		$9,7 \pm 0,3$	
C	1	$2,4 \pm 0,3$		$6,5 \pm 0,3$	
D	1	$1,3 \pm 0,1$		$8,8 \pm 0,2$	
D	2	$3,0 \pm 1,4$		$30,4 \pm 7,7$	
C	3	$6,0 \pm 0,8$		$9,1 \pm 0,6$	
D	3	$1,4 \pm 0,4$		$7,1 \pm 0,8$	
B	4	$9,0 \pm 0,1$		$12,8 \pm 0,6$	

III. 2: Accession-Nummern der in dieser Arbeit aufgeführten AS-Sequenzen

A. thaliana BGLU1 ACCESSION NM_202245
A. thaliana BGLU2 ACCESSION NM_121664
A. thaliana BGLU3 ACCESSION NM_118331
A. thaliana BGLU4 ACCESSION NM_104701
A. thaliana BGLU7 ACCESSION NM_116139
A. thaliana BGLU8 ACCESSION NM_116140
A. thaliana BGLU9 ACCESSION NM_118920
A. thaliana BGLU10 ACCESSION NM_118921
A. thaliana BGLU11 ACCESSION NM_202017
A. thaliana BGLU12 ACCESSION NM_123591
A. thaliana BGLU13 ACCESSION NM_123831
A. thaliana BGLU14 ACCESSION NM_179734
A. thaliana BGLU15 ACCESSION NM_130008
A. thaliana BGLU16 ACCESSION NM_115876
A. thaliana BGLU17 ACCESSION NM_001125053
A. thaliana BGLU18 ACCESSION NM_001036098
A. thaliana BGLU19 ACCESSION NM_113032
A. thaliana BGLU21 ACCESSION NM_105298
A. thaliana BGLU22 ACCESSION NM_105299
A. thaliana BGLU23 ACCESSION NM_111760
A. thaliana BGLU24 ACCESSION NM_122734
A. thaliana BGLU25 ACCESSION NM_111235
A. thaliana BGLU27 ACCESSION NM_115875
A. thaliana BGLU28 ACCESSION NM_180085
A. thaliana BGLU29 ACCESSION NM_001125052
A. thaliana BGLU31 ACCESSION NM_122362
A. thaliana BGLU32 ACCESSION NM_122363
A. thaliana BGLU33 ACCESSION NM_201858
A. thaliana BGLU34 ACCESSION NM_103653
A. thaliana BGLU35 ACCESSION NM_104025
A. thaliana BGLU36 ACCESSION NM_104027
A. thaliana BGLU37 ACCESSION NM_180745
A. thaliana BGLU38 ACCESSION NM_180746
A. thaliana BGLU39 ACCESSION NM_148101
A. thaliana BGLU40 ACCESSION NM_102418
A. thaliana BGLU41 ACCESSION NM_124837
A. thaliana BGLU42 ACCESSION NM_001036898
A. thaliana BGLU43 ACCESSION NM_112689
A. thaliana BGLU44 ACCESSION NM_112690
A. thaliana BGLU45 ACCESSION NM_104863
A. thaliana BGLU46 ACCESSION NM_180637
A. thaliana BGLU47 ACCESSION NM_118296
H. brasiliensis BGLU 3 ACCESSION EF100816
H. brasiliensis BGLU 4 ACCESSION AF480476
H. brasiliensis BGLU 5 ACCESSION AY297039
M. esculenta Linamarase 1 ACCESSION AAB71381
M. esculenta Linamarase 2 ACCESSION S35175
P. serotina Prunasinhydrolase ACCESSION AAA93032
S. bicolor Dhurrinase ACCESSION U33817
T. repens Linamarase ACCESSION X56733 S46824

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

(IV.) Abkürzungsverzeichnis

Chemische Symbole und internationale Einheiten werden nicht aufgeführt.

ABA	Abscisinsäure
ABA-Gluc	Abscisinsäure-Glucoseester
Ac	Gen mit Funktion in der Synthese cyanogener Glucoside bei <i>Trifolium repens</i>
ACH	Acetoncyanhydrin
AF	Aktivierungs-Faktor
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATO	Alternative Terminale Oxidase
ATP	Adenosintriphosphat
BCAS	β -Cyanoalaninsynthase-Aktivität
BCIP	Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphat
BGAF	BGLU Aggregationsfaktor
BGLU	β -Glucosidase
BGLY	β -Glycosidase
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
CAZYS	Carbohydrate-Active Enzymes
CC	Colloidal-Coomassie
cDNA	copy DNA
CG	Cyanogene Glucoside
Chf	Chloroform
CHT	Cyanidhydratase
CP	Cytoplasma
CPTIO	Carboxyphenyl-Tetramethylimidazol-Oxid
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-Phenylphosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CT-Werte	Cycle-Threshold-Werte
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DA-2 DA	Diaminfluoreszeindiacetat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotide
ds	Doppelsträngig (double stranded)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.C.	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZ	Epidermiszelle
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FHL	Formamidhydrolase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Fw	Frischgewicht
GABA	γ -Aminobuttersäure
gB	Ganzes Blatt
GH	Glycosylhydrolase
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GT	Glycosyltransferasen
G2F	2-Deoxy-2-Fluoro-Glucose
Hb	<i>Hevea brasiliensis</i>
HbBGLU	<i>Hevea brasiliensis</i> β -Glucosidase
HCN	Blausäure (Hydrogen Cyanide)
HCNc	Cyanogene Kapazität
HCNp	Cyanogenes Potential
HRP	Horseradish Peroxidase
LD	Long Distance
<i>Hev b 1</i>	<i>Hevea brasiliensis</i> Latexallergen 1
Hg	Homogenat
HNL	Hydroxynitrillyase
IP	Inositolphosphat
Kb	Korkbohrer
KT	Kontrolle
Korr	Korrektur
LB	Leitbündel
Li	<i>Linamarase</i> -Gen bei <i>Trifolium repens</i>
LIN	Linamarase
Lin	Linamarin
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Max	Maximum
MDL	Mandelonitrillyase
MeJa	Methyljasmonat
Mess	Messwert
MilliQ	Millipore Reinstwasser
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat

N-Membran	Hybond-Nylon-Membran
NC-Membran	Nitrocellulosemembran
MTA	Microtubuliassoziertes Protein
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NBT	Nitroblautetrazolium
N ₂	Flüssiger Stickstoff
Os3BGlu7	<i>Oryza sativa</i> β -Glucosidase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PAZ	Phloemassozierte Zelle
PEP	Phosphoenolpyruvat
PBP1	PYK bindendes Protein 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PCS	Proteinspeicherzelle
PEK	Pectinase
PEZ	Phloemnahe Epidermiszelle
PF	Proteinmengenunahme
PH	Prunasinhydrolase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPG	para-Nitrophenyl- β -D-glucoopyranosid
POD	Peroxidasen
PP	Palisadenparenchym
PPO	Polyphenoloxydase
PR 1, 2 und 8	Pathogenesis Related Protein 1, 2 und 8
PRE	Proteinrohextrakt
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
PYK 10	BGLU 23 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
PZ	Phloemzelle
P66	Protein 66
RE	Relatives Expressionslevel
Ref	Referenz
RG	Rosetta-Gami
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
Rt	Raumtemperatur
RUBISCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SA	Salicylsäure
SALB	Südamerikanischen Blattfallkrankheit
SAR	Systemische erworbene Resistenz (Systemic Acquired Resistance)

SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Siebelement
SNAP	Nitroso-Acetyl-Penicillamin
SNP	Natriumnitroprussid
SP	Schwammparenchym
ss	Einzelsträngig (single stranded)
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Lösung
SUMO	Small Ubiquitinlike Modifier
T	Tropfen
TaGlu1a / b	<i>Triticum aestivum</i> β -Glucosidase a / b
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Trihydroxymethylaminoethan
UDPG	Uridindiphosphatglucose
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UNK	Übernachtkultur
Ü	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Vakuole
VSP	Vegetatives Speicherprotein
VUT	Verletzt unter Tropfen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Glu	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside
ZG	Zymogramm
ZK	Zellkern
ZW	Zellwand
1CBG	<i>Trifolium repens</i> Linamarase
2RGM	<i>Oryza sativa</i> β -Glucosidase (Os3BGlu7)

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

(V.) Literatur

AKOPYAN T.N., BRAUNSTEIN A.E. and GORYACHENKOVA E.V. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1671-1680

ALLEN J. and STROBEL G.A. (1966) Can. J. Microbiol. 12, 414-416

ARASIMOVICZ M. and FLORYSZAK-WIECZOREK J. (2007) Nitric Oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. Plant Science 172, 876-887

AURICCHIO S., RUBINO A., LANDOLT M., SEMENZA G. and PRADER A. (1962) Lancet ii, 324-326

BALLHORN, D. J.; LIEBEREI, R. and GANZHORN, J. U. (2005) Plant cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivore-plant interaction: the importance of quantitative data. J. Chem. Ecol. 31, 1451-1479

BALLHORN D.J., HEIL M. and LIEBEREI R. (2006) Phenotypic Plasticity of Cyanogenesis in Lima Bean *Phaseolus lunatus* - Activity and Activation of β -Glucosidase. J. Chem. Ecol. 32, 1445-1473

BALLHORN D.J., HEIL M., PIETROWSKI A. and LIEBEREI R. (2007) Quantitative effects of cyanogenesis on an adapted herbivore. J. Chem. Ecol. 33, 2195–2208

BARRETT T., SURESH C.G., TOLLEY S.P., DODSON E.J. and HUGHES M.A. (1995) The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. Structure 3, 951-960

BERG J.M., TYMOCZKO J.L. and STRYER L. (2002) Biochemistry, 5th edn. W.H. Freeman, New York

BEWLEY J.D. and BLACK M. (1994) Seeds: physiology of development and germination. Second Edition, Plenum Publishing Corporation, New York

BJÖRKMAN, R. and LÖNNERDAHL, B. (1973) Studies on myrosinases. 3. enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds. Biochim. Biophys. Acta 327, 121-131

BLUM M.S. (1981) Chemical Defenses of Arthropods. Academic Press, New York, 562

BOUCHÉ N., LACOMBE B. and FROMM H. (2003) GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. TRENDS in Cell Biology 13, 607-610

BOWN A.W. and SHELP B.J. (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. Plant Physiol. 115, 1-5

- BOWN A. W., MACGREGOR K.B., and SHELP B.J. (2006)** Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *TRENDS in Plant Science* 11, 424-427
- BURMEISTER, W. P.; COTTAZ, S.; DRIGUEZ, H.; IORI, R.; PALMIERI, S. and HENRISSAT, B. (1997)** The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5, 663-675
- BURMEISTER, W.P.; COTTAZ, S.; ROLLIN, P.; VASELLA, A. and HENRISSAT, B. (2000)** High Resolution X-ray Shows That Ascorbate Is a Cofactor for Myrosinase and Substitutes for the Function of the Catalytic Base. *J. Biol. Chem.* 75, 39385-39393
- BUTLER G.W. and CONN E.E. (1964)** Biosynthesis of the cyanogenic glucosides Linamarin and Lotaustralin. *J. Biol. Chem.* 239, 1674-1679
- CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N. (1987)** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159
- CHOW K.S., WAN K-L., ISA M.N.M., BAHARI A., TAN S-H., HARIKRISHNA K. and YEANG H-Y. (2007)** Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. *J. Exp. Bot.* 58, 2429–2440
- CHUENCHOR W., PENGTHAISONG S., ROBINSON R.C., YUVANIYAMA J., OONANANT W., BEVAN D.R., ESEN A., CHEN C.J., OPASSIRI, R., SVASTI J. and CAIRNS, J.R.K. (2008)** Structural Insights into Rice BGlu1 beta-Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation. *J. Mol. Biol.* 377, 1200-1215
- CHUESKUL S. and CHULAVATNATOL M. (1996)** Properties of aldehydohydroxynitrile lyase from the petiole of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 401–405
- COLEMAN G.D., CHEN T.H.H., ERNST S.G. and FUCHIGAMI L. (1991)** Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. *Plant Physiol.* 96, 686–692
- CONN, E. E. (1981)** Biosynthesis of cyanogenic glycosides. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 183-196
- CONN E.E. and STUMPF P. (2009)** *Outlines Of Biochemistry*, 5th edn, Wiley India Pvt. Ltd.
- COOKE R.D. (1978)** An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *J. Sci. Food Agric.* 29, 345
- CORPAS F.J., BARROSO J.B., CARRERAS A., VALDERRAMA R., PALMA J.M., LEON A.M., SANDALIO L.M. and DEL RIO L.A. (2006)** Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224, 246-254
- DAVIES G.J. and HENRISSAT B. (2002)** Plant Glyco-related Genomics. *Biochemical Society Transactions* 30, 291-297

- DELLEDONNE M., XIA Y., DIXON R.A. and LAMB C. (1998)** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588
- DHARMAWARDHANA, D. P.; ELLIS, B. E. and CARLSON, J. E. (1995)** A β -glucosidase from lodgepole pine specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107, 331-339
- DIETZ, K. J.; SAUTER, A.; WICHERT, K.; MESSDAGHI, D. and HARTUNG, W. (2000)** Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugates in leaves. *J. Exp. Bot.* 51, 937-944
- DUFFEY S.S. (1981)** Cyanide and Arthropods. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 385-414
- DUNNILL P.M. and FOWDEN L. (1965)** *Nature* 208, 1206-1207
- DURNER J., WENDEHENNE D. and KLESSIG D.F. (1998)** Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328-10333
- ERMANS A.M., DELANGE F., VANDERVELDERN M. and KINTHAERT J. (1972)** *Adv. Exp. Med. Biol.* 30, 455-486
- ESEN A. and BLANCHARD D.J. (2000)** A Specific β -Glucosidase-Aggregating Factor Is Responsible for the β -Glucosidase Null Phenotype in Maize. *Plant Physiol.* 122, 563-572
- FALK, A. and RASK, L. (1995)** Expression of a zeatin-o-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 108, 1369-1377
- FIELDS M.A. and GERHARDT K.E. (1994)** An examination of the β -glucosidase (linamarase) banding pattern in flax seedlings using Ferguson plots and SDS-PAGE. *Electrophoresis* 15, 654-661
- FIELDS M.A. and GERHARDT K.E. (2001)** Developmental and genetic regulation of β -Glucosidase (linamarase) activity in flax seedlings. *J. Plant Physiol.* 158, 977-989
- FLORYSZAK-WIECZOREK J., MILCZAREK G., ARASIMOWICZ M. and CISZEWSKI A. (2006)** Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224, 1363-1372
- FREHNER M. and CONN E.E. (1987)** The Linamarin β -Glucosidase in Costa Rican Wild Lima Beans (*Phaseolus lunatus* L.) Is Apoplasmic. *Plant Physiol.* 84, 1296-1300
- FRY W. E. and MILLAR M. L. (1972)** Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 468-474
- FRY W.E. and EVANS P.H. (1977)** Association of formamide hydrolyase with fungal pathogenicity to cyanogenic plants. *Phytopathology* 67, 1001-1006

- FRY W.E. and MYERS D.F. (1981)** Hydrogen Cyanide Metabolism by Fungal Pathogens of Cyanogenic Plants. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 321-335
- GIESEMANN A., BIEHL B., and LIEBEREI R. (1986)** Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. J. Phytopathol. 117, 373-376
- GLEADOW R. M. and WOODROW I. E. (2002)** Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. J. Chem. Ecol. 28, 1301-1313
- GRUHNERT C., BIEHL B. and SELMAR, D. (1994)** Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. Plant Physiol. 195, 36-42
- GRÜTZMACHER H. (1989)** Untersuchungen zur Cyanogenese in Keimlingen der Kap-Ringelblume *Dimorphotheca sinuata*. Diplomarbeit, Techn. Univ. Braunschweig
- GUO F.Q., OKAMOTO M. and CRAWFORD N.M. (2003)** identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. Science 302, 100-103
- GUS-MAYER S., BRUNNER H., SCNEIDER-POETSCH H.A.W. and RUDIGER 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
- HALKIER B.A. and MØLLER B.L. (1989)** Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and Partial Purification of the Enzyme System Involved. Plant Physiol. 90, 1552-1559
- HALLÉ F. and MARTIN J. (1968)** Etude de la croissance rythmique chez l'*Hevea* (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Euphorbiacees* - Crotonoides). Adansonia ser. 2, 475-503
- HALL F.R., HOLLINGWORTH R.M. and SHANKLAND D.L. (1971)** Comp. Biochem. Physiol. 38b, 723-579
- HASSLACHER M., SCHALL M., HAYN M., GRIENGL H., KOHLWEIN S. and SCHWAB H. (1996)** Molecular cloning of the full-length cDNA of (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. J. Biol. Chem. 271, 5884–5891
- HATZFELD and SAITO (2000)** Evidence for the existence of rhodanese (thiosulfate: cyanide sulfurtransferase) in plants: preliminary characterization of two rhodanese cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 470, 147-150
- HENRISSAT B. (1991)** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280, 309-316
- HENRISSAT B. and DAVIES G. J. (1997)** Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 637-644

- HENRISSAT B. and DAVIES G.J. (2000)** Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules and Implications for Genomics. *Plant Physiol.* 124, 1515-1519
- HENRISSAT B., COUTINHO P.M. and DAVIES G.J. (2001)** A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 47, 55-72
- HERRMANN M.M., PINTO S., KLUTH J., WIENAND U. and LORBIECKE R. (2006)** The PTI1-like kinase ZmPti1a from maize (*Zea mays* L.) co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte. Prepared manuscript, personal communication
- HODGINS D.S. (1971)** Yeast Phenylalanine Ammonia-lyase. *J. Biol. Chem.* 246, 2977-2985
- HÖSEL W. und NAHRSTEDT A. (1975)** Spezifische Glucosidasen für das Cyanglucosid Triglichinin - Reinigung und Charakterisierung von β -Glucosidasen aus *Alocasia macrorrhiza* Schott. *Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem.* 356, 1265-1275
- HÖSEL, W. (1981)** The enzymatic hydrolysis of cyanogenic glycosides. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 217-232
- HUANG X., STETTMAIER K., MICHEL C., HUTZLER P., MUELLER M.J. and DURNER J. (2004)** Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, 938-946
- HUGHES, M. A. (1981)** The genetic control of plant cyanogenesis. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 495-508
- HUGHES M.A. (1990)** The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity* 66, 105-115
- HUGHES J., CARVALHO F. and HUGHES M. (1994)** Purification, characterization and cloning of α -hydroxynitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 496-502
- JACOB F. and MONOD J. (1961)** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318-56
- JIAO J.A. and CHOLLET R. (1991)** Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ and CAM plants. *Plant Physiol.* 95, 981-985
- KADOW D. (2006)** Aktivitätsregulierung von β -Glucosidase aus Blättern des Kautschukbaumes *Hevea brasiliensis* (Willd. ex. A. Juss) Muell. Arg. Diplomarbeit, Univ. Hamburg
- KAISER W.M., WEINER H., KANDBINDER C.B., TSAI C.B., ROCKEL P., SONODA M. and PLANCHET E. (2002)** Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J. Exp. Bot.* 53, 875-882

- KHAN N.U., BHAT M.A. and VAIDYANATHAN C.S. (1989)** Phenylalanine Ammonia-lyase: update on its kinetics. *Current Science* 58, 427-430
- KOJIMA M., POULTON J.E., THAYER S.S. and CONN E.E. (1979)** Tissue distribution of dhurrin and enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* 67, 617–22
- LAEMMLI, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- LAMOTTE O., COURTOIS C., BARNAVON L., PUGIN A. and WENDEHENNE D. (2005)** Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signaling properties of a fascinating molecule. *Planta* 221, 1-4
- LANGHEINRICH U. and TISCHNER R. (1991)** Vegetative Storage Proteins in Poplar - Induction and Characterization of a 32- and a 36-Kilodalton Polypeptide. *Plant Physiol.* 97, 1017-1025
- LEAH R.; KIGEL J.; SVENDSEN I. and MUNDY J. (1995)** Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* 270, 15789-15797
- LECHTENBERGER M. (2001)** Cyanogenesis in Higher Plants and Insects. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons, Ltd., 1-3
- LIEBEREI R. and BIEHL B. (1978)** Activation of Latent Phenolase from Spinach Chloroplasts by ageing and by frost. *Phytochemistry* 17, 1427-1429
- LIEBEREI R., SCHRADER A., BIEHL B. and CHEE K.H. (1983)** Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia* 31, 227 - 235
- LIEBEREI R. (1984)** Cyanogenese und Resistenz. Habilitationsschrift, Techn. Univ. Braunschweig
- LIEBEREI R., SELMAR, D. and BIEHL B. (1985)** Metabolization of Cyanogenic Glucosides in *Hevea brasiliensis*. *Pl. Syst. Evol.* 150, 49-63
- LIEBEREI R.; NAHRSTEDT A.; SELMAR D. and GASPAROTTO L. (1986)** The occurrence of lotaustralin in the genus *Hevea* and changes of HCN-potential in developing organs of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 25, 1573-1578
- LIEBEREI R. (1988)** Relationship of cyanogenic capacity (HCN-c) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent causing south american leaf blight. *J. Phytopathol.* 122, 54-67
- LIEBEREI R.; BIEHL B.; GIESEMANN A. and JUNQUEIRA N.T.V. (1989)** Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. *Plant Physiol.* 90, 33-36
- LIEBEREI R. and SELMAR D. (1990)** Determination of Rhodanese in Plants. *Phytochemistry* 29, 1421-1424

- LIEBEREI R., FOCK H.P. and BIEHL B. (1996)** Cyanogenesis Inhibits Active Pathogen Defence in Plants: Inhibition by Gaseous HCN of Photosynthetic CO₂ Fixation and Respiration in Intact Leaves. *Angew. Bot.* 70, 230-238
- LIEBEREI R. (2007)** South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New Steps in Plant Domestication using Physiological Features and Molecular Markers. *Annals of Botany* 100, 1 - 18
- LIEBEREI R. und REISDORFF C. (2007)** „Nutzpflanzenkunde“; Thieme Verlag; Lehrbuch, 7. Auflage
- LINDERMAYR C., SAALBACH G. and DURNER J. (2005)** Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137, 921-930
- LIU Y., AHN J-E., DATTA S., SALZMAN R.A., MOON J., HUYGHUES-DESPOINTE B., PITTENDRIGH B., MURDOCK L.L., KOIWA H., and ZHU-SALZMAN K. (2005)** Arabidopsis Vegetative Storage Protein Is an Anti-Insect Acid Phosphatase. *Plant Physiol.* 139, 1545–1556
- LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKI S., MATSUDAIRA P. and DARNELL J. (1995)** *Molecular Cell Biology*. 3. Auflage, New York (W.H. Freeman)
- LOYD R. and GRAY E. (1970)** Amount and distribution of hydrocyanic acid potential during the life cycle of plants of three *Sorghum* cultivars. *Agron. J.* 62, 394-397
- MARSHO T.V. and KUNG S.D. (1976)** Oxygenase properties of crystallized fraction I protein from tobacco. *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 341-346
- MAZZUCOTELLI E., TARTARI A., CATTIVELLI L. and FORIANI G. (2006)** Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *J. Exp. Bot.* 57, 3755-3766
- McMAHON J.M., WHITE W.L.B. and SAYRE R.T. (1995)** Cyanogenesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Exp. Bot.* 46, 731-741
- MINIC Z. (2008)** Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* 227, 723-740
- MKPONG O.E., YAN H., CHISM G. and SAYRE R.T. (1990)** Purification, characterization and localization of Linamarase in cassava. *Plant Physiol.* 93, 176-181
- MØLLER B.L. and POULTON J.E. (1993)** Cyanogenic glycosides. In: P.J. Lea (Ed.) *Methods in Plant Biochemistry*. 9, Enzymes of secondary metabolism, Academic Press, New York, 183–207.
- MØLLER B. L. and SEIGLER D. S. (1999)** Biosynthesis of cyanogenic glycosides, cyanolipids and related compounds. In: B. K. Singh (ed.), *Plant amino acids*, M. Dekker, New York, 563-609
- MURRAY M.G. and THOMPSON W.F. (1980)** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321-4326

- MONTGOMERY R.D. (1969)** In "Toxic Constituents of Plant Foodstuffs". (I.E. Liener, ed.), Academic Press, New York and London., 143-157
- MANNICK J.B. and SCHONHOFF C.M. (2002)** Nitrosylation: the next phosphorylation? Arch. Biochem. Biophys. 408, 1-6
- MAYER A.M. (2006)** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review . Phytochemistry, 67, 2318-2331
- MOSBLECH A., KÖNIG S., STENZEL I., GRZEGANEK P., FEUSSNER I. and HEILMANN I. (2008)** Phosphoinositide and Inositolpolyphosphate Signalling in Defense Responses of *Arabidopsis thaliana* Challenged by Mechanical Wounding. Molecular Plant 1, 249-261
- MURAD F. (1986)** Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. Journal of Clinical Investigation 78, 1-5
- NAGANO A.J., MATSUSHIMA R. and HARA-NISHIMURA I. (2005)** Activation of an ER-body-localized β -Glucosidase via a Cytosolic Binding Partner in Damaged Tissues of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 46, 1140-1148
- NAHRSTEDT A. (1985)** Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. Plant Syst. Evol. 150, 35-47.
- NIELSEN K.A., HRMOVA M., NIELSEN J.N., FORSLUND K., EBERT S., OLSEN C.E., FINCHER G.B. and MØLLER B.L. (2006)** Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. Planta 223, 1010-1023
- NIELSEN K.A., TATTERSALL D.B., JONES P.R. and MØLLER B.L. (2008)** Metabolon formation in dhurrin biosynthesis. Phytochemistry 69, 88–98
- 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
- OSBOURN A.E. (1996)** Preformed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. The Plant Cell 8, 1821–1831
- PANCORO A. and HUGHES M.A. (1992)** *In situ* localization of cyanogenicglucosidase (linamarase) gene expression in leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using non-isotopic riboprobes. The Plant Journal 2, 821-827.
- PEARCE G., STRYDOM D., JOHNSON S. and RYAN C.A. (1991)** A Polypeptide from Tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. Science 253, 895-898
- PETTERSEN E.F., GODDARD T.D., HUANG C.C., COUCH G.S., GREENBLATT D.M., MENG E.C. and FERRIN T.E. (2004)** UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605-1612.

- POULTON J. E. (1990)** Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94, 401-405
- RASK L.; ANDRÉASSON E.; EKBOM B.; ERIKSSON S.; PONTOPPIDAN B. and MEIJER J. (2000)** Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*. *Plant Mol. Biol.* 42, 93-113
- REICHEL T.; BROWN P.D.; SCHNEIDER B.; OLDHAM N.J.; STAUBER E.; TOKUHISA J.; KLIEBENSTEIN D.J.; MITCHELL-OLDS T. and GERSHENZON, J. (2002)** Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 59, 663-671
- REPKA V., FISCHEROVA I. and SILHAROVA K. (2004)** Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum* 48, 273-283
- RICHTER G. (1998)** Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Thieme, 6. Auflage
- ROMERO-PUERTAS M.C., PERAZZOLLI M., ZAGO E.D. and DELLEDONNE M. (2004)** Nitric oxide signaling functions in plant-pathogen interaction. *Cellular Microbiology* 6, 795-803
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. and MANIATIA T. (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual. (Second edition) Cold Spring Harbour Laboratory Press New York
- SAUNDERS J.A. and CONN E.E. (1977)** Subcellular localization of the cyanogenic glucoside in *Sorghum* by autoradiography. *Plant Physiol.* 59, 647-52
- SEIGLER D.S. and BRINKER. A.M. (1993)** Characterisation of cyanogenic glycosides, cyanolipids, nitroglycosides, organic nitro compounds and nitrile glucosides from plants. *Methods in Plant Biochemistry* 8, Alkaloids and Sulphur Compounds (P.G. Waterman, ed.), Academic Press, London, 51-131
- SELLÉS-MARCHART S., CASADO-VELA J. and BRU-MARTINEZ R. (2007)** Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase: Basis for the enzymes activity regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 464, 295-305
- SELMAR D. (1986)** Cyanogenese in *Hevea*: Zwei Wege zur Metabolisierung cyanogener Glycoside. Dissertation, Univ. Hamburg
- SELMAR D., LIEBEREI R., BIEHL B. AND VOIGT J. (1987)** *Hevea* Linamarase - A nonspecific β -glycosidase. *Plant Physiol.* 83, 557-563
- SELMAR D., CARVALHO F.J. and CONN E.E. (1987b)** A colorimetric assay for α -hydroxynitrile lyase. *Anal. Biochem.* 166, 208-211
- SELMAR D., LIEBEREI R. and BIEHL B. (1988)** Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides: the linustatin pathway. *Plant Physiol.* 86, 711-716
- SELMAR D., LIEBEREI R., BIEHL B. and CONN E.E. (1989)** α -Hydroxynitrile Lyase in *Hevea brasiliensis* and its significance for rapid cyanogenesis. *Physiol. Plant.* 75, 97 - 101

- SELMAR D. (1993)** Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by *Hevea* cotyledons. *Planta* 191, 191–199.
- SERMSUVITYAWONG K., SVASTI M.R.J., SAWANGARETRAKUL P., KISAMANONTA P. and CHULAVATNATOL M. (1995)** Aggregation of Cassava Linamarase. *J. Sci. Soc. Thailand* 21, 283-292
- SHIKITA M., FAHEY J.W., GOLDEN T.R., HOLTZCLAW D. and TALALAY, P. (1999)** An unusual case of „uncompetitive activation“ by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochem. J.* 341, 725-732
- SCHAPPERT P.J. and SHORE J. S. (1999)** Cyanogenesis, herbivory and plant defense in *Turnera ulmifolia* on Jamaica. *Ecoscience* 6, 511-520.
- SHIMIZU T. and TAGUCHI H. (1969)** *J. Ferment. Technol.* 47, 638-643
- SIRITUNGA D.S. (2002)** Generation of Acyanogenic Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Transgenic Approaches. Dissertation, Ohio State Univ.
- SOOKMARK U., NARANGAJAVANA J. and CRESTIN H. (2002)** Cloning of a full-length cDNA of 66kDa protein expressed in the softbark of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). In NCBI Accession AF480476
- SOKOLOWSKI S. and BLATT M.R. (2004)** Nitric oxide block of outwardrectifying K⁺ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol.* 136, 4275-4284
- SOLOMONSON L. P. (1981)** Cyanide as a metabolic inhibitor. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 11-28
- SOUTHERN E.M. (1975)** Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
- STAMLER J.S. (1994)** Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931–936
- STROBEL G.A. (1964)** *Can. J. Biochem.* 42, 414-416
- SUE M., YAMAZAKI K., YAJIMA S., NOMURA T., MATSUKAWA T., IWAMURA H. and MIYAMOTO T. (2006)** *Plant Physiol.* 141, 1237-1247
- SUNDERASAN E., WARD M.A. AND YEANG H.Y. (2002)** Isolation and Characterisation of Latex Cyanogenic Glucosidase in *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res.* 5, 244-252
- SWAIN E., LI C.P. and POULTON J.E. (1992)** Tissue and Subcellular Localization of Enzymes Catabolizing (R)-Amygdalin in Mature *Prunus serotina* Seeds. *Plant Physiol.* 100, 291-300
- SWAIN and POULTON (1994)** Immunocytochemical Localization of Prunasin Hydrolase and Mandelonitril Lyase in Stems and Leaves of *Prunus Serotina*. *Plant Physiol.* 106, 1285-1291

TAIZ L. and ZEIGER E. (2000) Physiologie der Pflanzen. Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin

THAYER S.S. and CONN E.E. (1981) Subcellular localization of dhurrin β -glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of *Sorghum* leaf blades. *Plant Physiol.* 67, 617–22

TIAN W-M., HAN Y-Q., WU J-L. and HAO B-Z. (1998) Characteristics of protein-storing cells associated with a 67 kDa protein in *Hevea brasiliensis*. *Trees* 12, 153-159

TIAN W-M. and HU Z-H. (2004) Distribution and Ultrastructure of Vegetative Storage Proteins in Leguminosae. *IAWA Journal* 25, 459–469

TIAN W-M., WANG X.C., SHI M.J., CHEN Y.Y. and ZHANG H. (2006) The 67 kDa vegetative storage protein is a cyanogenic beta-glucosidase in *Hevea brasiliensis*. NCBI Accession EF100816

TRANBARGER T.J., FRANCESCHI V.R., HILDEBRAND D.F. and GRIMES H. D. (1991) The Soybean 94-Kilodalton Vegetative Storage Protein is a Lipoxygenase That is Localized in Paraveinal Mesophyll Cell Vacuoles. *The Plant Cell* 3, 973-987

TRIONE E.J. (1960) HCN content of flax in relation to flax wilt resistance. *Phytopathology* 50, 482 - 486

VANETTEN H.D., SANDROCK R.W., WASMANN C.C., SOBY S.D., MCCLUSKY K. and WANG P. (1995) Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. *Can. J. Bot.* 73 (suppl. I), 518-525

VAN TILBURGH H., TOMME P., CLAEYSSENS M., BHIKHABHAI R. and PETERSSON G. (1986) *FEBS Lett.* 204, 223-227

VERDOUCQ L., MORINIÉRE J., BEVAN D.R., ESEN A., VASELLA A., HENRISSAT B. and CZIZEK M. (2004) Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate. *J. Biol. Chem.* 279, 31796-31803

VETTER J. (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38, 11-36

VOLINI M. and ALEXANDER K. (1981) Multiple Forms and multiple Functions of the Rhodanases. In: Vennesland, B.; Conn E. E.; Knowles, C. J. Westby, J.; Wissing, F. (eds.). "Cyanide in Biology"; Academic press, London 1981, 77-92

VOET D., VOET J.G. and PRATT C.W. (2002) Lehrbuch der Biochemie. WILEY-VCH Verlag GmbH und Co. KgaA, Weinheim

VOß, K. (2001) Biologische Bedeutung und Aktivierbarkeit der β -D-Glycosidase in Blättern von *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg. (1865). Dissertation, Univ. Hamburg

WAJANT H., RIEDEL D., BENZ S. and MUNDREY K.W. (1994) Immunocytological localisation of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* and *Linum usitatissimum*. *Plant Science* 103, 145-154.

- WAJANT H. and PFIZENMAIER K. (1996)** Identification of potential active site residues in the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 25830–25834
- WALLACE W. (1984)** Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol.* 75, 170-175
- WANG P., MATTHEWS D.E. and VANETTEN H.D. (1992)** Purification and characterization of cyanide hydratase from the phytopathogenic fungus *Gloeocercospora sorghi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 569-575
- WANG Y., YUN B-W., KWON E.J., HONG J.K., YOON J. and LOAKE G.J. (2006)** S-Nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J. Exp. Bot.* 57, 1777-1784
- WENDEHENNE D., PUGIN A., KLESSIG D. and DURNER J. (2001)** Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6, 177-183
- WESTLEY J. (1973)** *Adv. Enzymol.* 39, 327-368
- WHITE W.L.B., ARIAS-GARZON D.I., MCMAHON J.M. and SAYRE R.T. (1998)** Cyanogenesis in Cassava - The Role of Hydroxynitrile Lyase in Root Cyanide Production. *Plant Physiol.* 116, 1219–1225
- WISHNIK M. and LANE M.D. (1969)** Inhibition of ribulose diphosphate carboxylase by cyanide inactive ternary complex of enzyme, ribulose diphosphate and cyanide. *J. Biol. Chem.* 244, 55-59
- XU Z., ESCAMILLA-TREVINO L.L., ZENG L., LALGONDAR M., BEVAN D.R., WINKEL B.S.J., MOHAMED A., CHENG C., SHIH M. POULTON J.E. and ESEN, A. (2004)** Functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol. Biol.* 55, 343-367
- YEVTUSHENKO D.P., MCLEAN M.D., PEIRIS S., VAN CAUWENBERGHE O.R. and SHELPS B.J. (2003)** Calcium/calmodulin activation of two divergent glutamate decarboxylases from tobacco. *J. Exp. Bot.* 54, 2001-2002

Das cyanogene Syndrom bei *Hevea brasiliensis*

-

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Lieberei danken. Zum einen natürlich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und für kritische, weiterführende Diskussionen, aber auch für die Gelegenheit, die faszinierende Welt des Kakaos und damit verbunden ferne Länder wie Kamerun, Trinidad und Ecuador kennenzulernen. Vor allem aber Danke ich Herrn Prof. Dr. Lieberei für das in mich gesetzte Vertrauen und die uneingeschränkte Rückendeckung und Unterstützung insbesondere in schwierigen Momenten.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Selmar. Nicht nur für die Übernahme des Korreferates sondern vor allem auch für kritische Diskussionen und Ratschläge am Telefon und auf der Botanikertagung in Leipzig.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Reisdorff und Herrn von Schwartzberg, für die ausführlichen Diskussionen methodischer und inhaltlicher Fragen zu dieser Arbeit.

Herrn Kassner Danke ich für die unermüdliche Suche nach Fehlern grammatischer Art und für die Tüte voller Bindestriche.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Böhm, Herrn Tumforde und Herrn Nölting ohne die viele Dinge im Labor und am Computer bedeutend länger gedauert hätten. Und wer weiß, ob ohne diese Herren immer eine funktionierende Kaffeemaschine zur Verfügung gestanden hätte.

Danken möchte ich auch Herrn Lorbiecke und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die fachliche Unterstützung bei der biolistischen Transformation und für die Möglichkeit diese Arbeiten in ihren Laboratorien durchführen zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Mühlbach und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Unterstützung bei den Arbeiten zum Southern Blot und für die gute Arbeitsatmosphäre. Eigentlich hatte ich nur ein paar Ratschläge zu Pufferlösungen usw. einholen wollen, da standen mir schon sämtliche Räumlichkeiten, Materialien und Geräte zur Verfügung.

Herrn Scholten danke ich für Hilfe und Beratung bezüglich methodischer Fragen zu den molekularbiologischen Arbeiten.

Danken möchte ich auch Herrn Torda und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei den Arbeiten an den 3D-Modellen der β -Glucosidasen.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Woelken für die unermüdliche Hilfe beim Schneiden der Blattproben und für die Unterstützung beim Umgang mit LEO 906E sowie dem in der Bedienung etwas gewöhnungsbedürftigen Konfokal-Lasermikroskop.

Danken möchte ich auch Herrn Buck und Herrn Harder für die massenspektrometrischen Analysen und insbesondere für die ausführlichen Erklärungen zu den Ergebnissen.

Der Arbeitsgruppe NUBI insgesamt möchte ich für die freundschaftliche und kreative Arbeitsatmosphäre danken.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und insbesondere für die Verköstigung an Abenden an denen keine Zeit mehr blieb noch etwas essbares zu beschaffen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Douglas Steinmacher, zum einen für die vielen Gespräche und Diskussionen (am Anfang noch bei Kaffee und Bounty oder Twix), ohne die ich vielen Fragestellungen wahrscheinlich nicht nachgegangen wäre. Vielen Dank auch für eine tolle, spaßige und kreative Zeit im Labor. Vor allem aber möchte ich Douglas Steinmacher für seine Freundschaft danken, die hoffentlich auch die vielen Seemeilen zwischen Brasilien und Hamburg überdauern wird.

Alice Gualino danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis, wenn ich einmal mehr am Abend zu Hause anrief um ihr mitzuteilen, dass es später werden würde als geplant. Auch dafür das sie akzeptierte, dass ich am Wochenende dann meistens keine Zeit und Lust für Unternehmungen hatte. Danke aber vor allen Dingen dafür, dass wir die zuletzt oft schwierigen Wochen und Monate gemeinsam überstanden haben. Jetzt wird auch wieder mehr Zeit für andere Dinge sein.