

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät



In Kooperation mit der Max-Planck-Gesellschaft
Am MPI für Chemische Ökologie Jena
Abteilung Bioorganische Chemie

Proteinanalyse des Verdauungssekrets von ***Nepenthes sp.***

Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
DIPLOM – BIOCHEMIE/MOLEKULARBIOLOGIE

Vorgelegt von: Sandy Rottloff
Geboren am: 28. Juni 1978 in Annaberg-Buchholz

Gutachter: PD Dr. Axel Mithöfer
Prof. Dr. Erika Kothe

Jena, den 28. Februar 2006

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	V
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Karnivore Pflanzen.....	3
2.2 Nepenthaceae.....	4
2.2.1 Charakterisierung und Strukturen der <i>Nepenthes</i> -Kannen.....	5
2.2.2 Kannenflüssigkeit.....	10
2.3 Ziel der Arbeit.....	12
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Pflanzenmaterial.....	13
3.1.2 Bakterienstämme.....	13
3.1.3 Vektoren.....	13
3.1.4 Oligonukleotide.....	14
3.1.5 Enzyme.....	16
3.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	16
3.2 Mikroskopie.....	17
3.2.1 Lichtmikroskopie.....	17
3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	17
3.3 Untersuchung des Proteinmusters im Kannensaft.....	17
3.3.1 Probengewinnung.....	17
3.3.2 Proteinaufbereitung.....	18
3.3.3 SDS-PAGE und 2D-Elektrophorese.....	20
3.3.4 Proteinfärbemethoden.....	25
3.3.5 Extraktion der Peptide aus dem Gel.....	27
3.4 Klonierung der cDNA eines Thaumatin-ähnlichen Proteins aus <i>Nepenthes</i> -Kannen.....	28
3.4.1 Isolierung der Nukleinsäuren.....	28
3.4.2 Reverse Transkription.....	30

3.4.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	31
3.4.4	Synthese und Amplifizierung von cDNA-Enden.....	32
3.4.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.4.6	Ligations- und Klonierungsreaktionen.....	34
3.4.7	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> - Zellen.....	34
3.4.8	Selektion transformierter Zellen.....	35
3.4.9	Plasmid-Präparation.....	35
3.4.10	Restriktionsspaltung mit <i>EcoR</i> I.....	35
3.4.11	DNA-Sequenzierung.....	36
3.4.12	Bioinformatik.....	36
4.	ERGEBNISSE.....	38
4.1	Mikroskopische Darstellung der Kannendrüsen.....	38
4.2	Optimierung der 2D-Elektrophorese.....	40
4.2.1	Probenvorbereitung.....	41
4.2.2	Isoelektrische Fokussierung und Äquilibration.....	42
4.2.3	SDS-PAGE.....	43
4.3	Detektion der Sekretproteine aus dem Kannensaft.....	45
4.4	Detektion von Glykoproteinen in der Kannenflüssigkeit.....	47
4.5	Isolierung einer cDNA eines Thaumatin-ähnlichen Proteins (TLP) aus <i>Nepenthes</i>	48
4.5.1	Entwicklung geeigneter Oligonukleotide.....	49
4.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren.....	51
4.5.3	Amplifizierung von Teilsequenzen einer <i>tlp</i> -cDNA-Sequenz.....	52
4.5.4	Vervollständigung der <i>tlp</i> -cDNA-Sequenz.....	54
4.5.5	Amplifizierung der Vollängen-cDNA-Sequenz.....	58
5.	DISKUSSION.....	65
6.	AUSBLICK.....	72
7.	LITERATUR.....	73
8.	ANHANG.....	78
8.1	MS-Spektren.....	78
8.2	Verwendete PCR-Programme.....	81
8.3	Sequenzvergleiche und Ableitung genspezifischer Oligonukleotide.....	82
8.4	Vektorkarten.....	88
8.5	Verwendete Puffer und Lösungen.....	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BiCa	Ammoniumbicarbonat
CA	Carbonic Anhydrase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CPK	Creatine Phosphokinase
CTAB	Cethyltrimethylammonium Bromid
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TOF-MS/MS	Time of flight-MS/MS
EtOH	Ethanol
FA	Formic acid
IAA	Iodacetamid
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
MS	Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
Olp	Osmotin-like protein
ORF	open reading frame
PAS	Periodic-Acid-Schiffs

PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Pfu-Polymerase	Proof reading Polymerase
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Pathogenesis-related
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RACE	Rapid Amplification of cDNA ends
RGB	Running gel buffer
RLM-RACE	RNA Ligase mediated-RACE
rpm	rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TLP	Thaumatococcus-like protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSN	Tris Sample Buffer Non-reducing
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside
2D	zweidimensional

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

2.1: Die verschiedenen Blattbestandteile bei Kannen von <i>Nepenthes</i>	6
2.2: Entwicklung einer Kanne von <i>N. alata</i>	6
2.3: Vielfalt von Form und Farbe bei <i>Nepenthes</i> -Kannen.....	9
3.1: Darstellung der Strukturformel von Coomassie-Brilliantblau G250.....	18
4.1: Kanne von <i>N. superbum</i>	38
4.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der inneren Oberfläche einer Kanne von <i>N. rafflesiana</i>	39
4.3: Drüsen einer Kanne von <i>N. rafflesiana</i>	39
4.4: Innere Oberfläche einer Kanne von <i>S. Purpurea</i>	40
4.5: Wesentliche Parameter der 2D-Elektrophorese, die optimiert werden mussten.....	41
4.6: Überprüfung der Proteinaufreinigung auf einem Schägger/Jagow-Gel.....	42
4.7: Darstellung des CPK 2D-Markers nach einer 2D-Elektrophorese.....	43
4.8: Auftrennung der durch IPG-Streifen (pH 3-10) separierten Kannensaftproteine (150 µg) über ein ExcelGel.....	44
4.9: Auftrennung der durch IPG-Streifen (pH 3-10) separierten Kannensaftproteine (150 µg) über ein 10%-iges Laemmli-Gel.....	44
4.10: Darstellung der über die 2D-Elektrophorese aufgetrennten Kannensaftproteine.....	45
4.11: Auftrennung zweier Proteinproben aus dem Sekret geschlossener Kannen über SDS-PAGE, die vorher durch IEF (pH-Bereich 3-5,6) separiert wurden.....	46
4.12: Detektion von Glykoproteinen über PAS-Färbung.....	48
4.13: Sequenzvergleich von Thaumatin-, Olp- und Tlp-Proteinsequenzen.....	49
4.14: Vergleich der cDNA-Sequenz von Thaumatin-, Olp- und Tlp-Proteinen.....	50

4.15: Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA und genomischer DNA	51
4.16: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte für die Positivkontrolle	52
4.17: Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten <i>tlp</i> -Teilsequenzen	53
4.18: Prinzip der durchgeführten RACE-PCR und die verwendeten Oligonukleotide	54
4.19: Agarosegelelektrophoretische Auftrennung des 5´RACE-Produkts	55
4.20: Vergleich des 5´-RACE-Fragmentes mit der Teilsequenz	56
4.21: Elektrophoretische Auftrennung der 3´RACE-PCR-Produkte	57
4.22: Vergleich der 3´RACE-Sequenz mit der überlappenden Teilsequenz	58
4.23: Elektrophoretische Auftrennung der durch die <i>Pfu</i> -PCR amplifizierten Produkte	59
4.24: Agarosegelelektrophorese der durch <i>EcoR</i> I gespaltenen Plasmid-DNA mit vorhandener Insertion	60
4.25: Darstellung der vollständigen <i>tlp</i> -cDNA-Sequenz	61
4.26: Sequenzvergleich der Tlp-Proteinsequenz aus <i>N. gracilis</i> mit anderen verwandten Proteinsequenzen	62
4.27: Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines vorhandenen Signalpeptids (SignalP-HMM Ergebnis)	63
4.28: Voraussage der Länge des Signalpeptids, sowie der Spaltstelle der Signalpeptidase I (SignalP-NN-Ergebnis)	64

Tabellen

3.1: Strukturformeln der sauren und basischen Acrylamidderivate zur Herstellung von immobilisierten pH-Gradienten	23
4.1: Übersicht der Molekulargewichte von Proteinspots, aus denen Peptidsequenzen dokumentiert werden konnten	46
4.2: Übersicht der erhaltenen Peptidsequenzen	47
4.3: Identitätsmatrix für die Aminosäure-Sequenz verschiedener Mitglieder aus der Thaumatin-Familie	62

1. ZUSAMMENFASSUNG

Karnivore Pflanzen wachsen häufig an nährstoffarmen Standorten. Zur Ergänzung ihres Nährstoffbedarfs werden vor allem Insekten in einzigartigen, von den Blättern abgeleiteten, Organen gefangen. Bei der pantropisch verbreiteten karnivoren Pflanze *Nepenthes* handelt es sich dabei um eine kannenförmige Falle. Diese Gleitfalle weist spezialisierte Strukturen auf, die während des Beutefangs verschiedene Funktionen übernehmen. Ein blumenartiges Erscheinungsbild der gesamten Kanne sowie des Peristoms bzw. Nektardrüsen auf der Innenseite des Deckels und am inneren Rand des Peristoms dienen der Anlockung der Beute. Besondere Strukturen im Halsbereich der Kanne, z.B. eine ausgeprägte Wachsschicht, verhindern eine Flucht der Beute, so dass diese ins Kanneninnere gleitet, wo sie ertrinkt. Die Kannenflüssigkeit ist leicht sauer und enthält eine Reihe hydrolytischer Enzyme wie Proteasen und Phosphatasen, die von Verdauungsdrüsen sekretiert werden, welche zahlreich in der unteren Hälfte der Kanneninnenseite lokalisiert sind. Über die genaue Identität der Verdauungsenzyme wurden bis auf wenige Ausnahmen bislang nur Vermutungen aufgestellt. Die Isolierung der Gene für zwei Aspartatproteinasen, Nepenthesin I und II, stellte die bisher einzige molekularbiologische Charakterisierung zweier Proteine aus dem Kannensaft dar.

Um weitere Proteine zu identifizieren, wurde der Saft geschlossener Kannen mehrerer *Nepenthes*-Arten herangezogen und über 2D-Elektrophorese aufgetrennt. Durch massenspektrometrische Analyse der nach tryptischem Verdau erhaltenen Peptide konnten über Datenbankvergleiche dreizehn Proteine detektiert werden, darunter Pathogenesis-related- (PR) Proteine (z.B. Glucanasen und PR-1C), mehrere putative und zwei völlig unbekannte Proteine.

Ein Thaumatin-ähnliches Protein (TLP), dessen Funktion noch weitgehend ungeklärt ist, wurde weiter charakterisiert. Über die Methode der PCR gelang es, eine *tlp*-Teilsequenz aus der cDNA von *N. gracilis* zu amplifizieren. Durch Anwendung der RLM-RACE konnte die Vollängen-cDNA-Sequenz aus *N. gracilis* (Accession-No. DQ352144), sowie die *tlp*-Sequenz aus genomischer DNA von *N. rafflesiana*, isoliert werden, wobei die Sequenz aus genomischer DNA keine

Introns aufwies. Bei bioinformatischer Untersuchung der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz zeigte sich ein Cysteinreichtum, sowie das Vorhandensein eines Signalpeptids.

Das Vorhandensein von klassischen PR-Proteinen im Kannensaft deutet auf eine Veränderung der physiologischen Relevanz dieser Proteine hin, von der Verteidigung zur Ernährung der Pflanze.

2. EINLEITUNG

2.1 Karnivore Pflanzen

Mehr als 600 verschiedene Arten karnivorer Pflanzen besiedeln weltweit Gebiete, die sich besonders durch Nährstoffarmut auszeichnen. Dabei sind die Standorte ganzjährig oder zumindest zeitweise feucht bis nass. Wüsten sind insofern ungeeignet, da die Pflanzen stark austrocknungsempfindlich sind und der Mangel an Feuchtigkeit die Existenz unmöglich macht. Da diese Pflanzen nur bedingt konkurrenzfähig sind, wachsen sie nur sehr selten auf mineralstoffreichen Böden, um den Wettbewerb mit anderen Pflanzen zu vermeiden. Die wichtigsten Lebensräume karnivorer Pflanzen sind Moore, Sümpfe und Gewässer, aber auch in sandigen Gebieten, auf Felsen und in Wäldern sind einige Vertreter zu finden.

Die Biodiversität der karnivoren Pflanzen lässt sich im Allgemeinen so zusammenfassen, dass diese von den Polen zum Äquator, von kalten zu warmen und von trockenen zu feuchten Gebieten hin zunimmt. Eine Erhöhung der Artenzahl ist auch von Standorten mit einheitlichen Umweltfaktoren zu Gebieten mit einer Vielfalt an Biotopen und Habitaten zu verzeichnen. Die sechs artenreichsten Sektoren in den subtropischen-tropischen Gebirgsstufen sind das Gebiet von Costa Rica bis Ekuador, die tropische Anden-Ostabdachung, Mata Atlantica Brasiliens, Yunnan bis Ost-Himalaya, Nord-Borneo und Neuguinea.

Karnivore Pflanzen wachsen auf Böden, in denen Mineralien und Nährstoffe wie Stickstoff sehr rar sind. Deswegen musste ein anderer Weg gefunden werden, diese zu beziehen. So bildeten sie im Laufe ihrer Evolution teilweise hochgradig spezialisierte Fallen aus, mit denen Beutetiere angelockt, gefangen und verwertet werden konnten. Dabei haben sich sehr verschiedene Morphologien von Fallen entwickelt. Man unterscheidet Klapp-, Kleb-, Saug-, Reusen- und Gleitfallen.

Ein Vertreter der Karnivoren mit Klappfallen ist die Venusfliegenfalle (*Dionaea muscipula*). Bei dieser tragen die Blatthälften zahlreiche Sinnesborsten, die bei Berührung durch die Beute mechanische Bewegungsreize in elektro-physiologische Impulse umwandeln. Dabei knickt die Blattspreite blitzschnell an der Mittelrippe ein und wird somit zur Falle.

Bei Pflanzen mit Klebfallen sind die Blattoberflächen mit zahlreichen, gestielten Drüsenköpfchen bedeckt, die glitzernden Tautropfen ähneln und mit klebrigen Fangschleim gefüllt sind. Dadurch werden die Insekten durch den optischen Reiz und den süßen Duft des Nektartropfchens angelockt und durch die Klebrigkeit des Sekrets fixiert. Bei diesem Typ der Fallen werden passive und aktive Organe unterschieden. In der aktiven Form sind die Drüsenstiele bzw. die gesamte Blattfläche beweglich. Beim Sonnentau (*Drosera*) biegen sich die Drüsenköpfchen in Richtung des Opfers, welches dann von der gesamten Blattspreite eingerollt wird.

Kennzeichnend für Wasserschläuche (*Utricularia*) sind Saugfallen. Diese besitzen eine blasenartige Hohlstruktur, die von einer Ventilklappe, welche sich nur nach Innen öffnet, verschlossen ist. Der Falleneingang ist mit Fühlborsten besetzt, die ein Öffnen der Klappe, ausgelöst durch einen mechanischen Reiz wie die Berührung durch die Beute, bewirken. Da im Innenraum der Hohlstruktur Unterdruck herrscht, wird ein Wassersog ausgelöst, der die Beute ins Falleninnere zieht.

Genlisea besitzt an ihren unterirdischen Blättern sogenannte Reusenfallen. Sie bestehen aus Y-förmig gegabelten Blättchen, welche in sich verdreht sind und in einer blasenartigen Erweiterung enden. Die Fallen sind auf einzellige Bodenorganismen spezialisiert, die chemisch angelockt werden und durch einen Öffnungsspalt in das Innere des Fangorgans gelangen. Reusenhaare, die einseitig ausgerichtet sind, versperren den Rückweg und die Beute wird in die Verdauungsblase geleitet.

Nepenthaceae gehören zu den karnivoren Pflanzen, die als Fangorgan die Gleitfalle, eine aus der Blattspreite gebildete, becherförmige und mit Flüssigkeit gefüllte Kanne, aufweisen. Da diese den Schwerpunkt der Diplomarbeit bildeten, soll der Fallentyp im nächsten Abschnitt genauer dargestellt werden.

2.2 Nepenthaceae

Von den Nepenthaceae sind bis heute 98 Arten beschrieben worden, wobei aber zusätzlich eine Vielzahl natürlicher und gärtnerischer Hybriden vorkommt. Ein konstanter Chromosomensatz von $n = 40$ innerhalb der Kannenpflanzen lässt eine beinahe unbegrenzte Kreuzbarkeit von *Nepenthes*-Arten untereinander zu.

Das Verbreitungsgebiet der Nepenthaceae beschränkt sich auf die östlichen Tropen, von Madagaskar nach Nordaustralien und Neu Kaledonien. Die höchste Diversität tritt mit etwa 30 Arten in Borneo auf.

Die meisten Arten sind Bewohner von immerfeuchten Strauchvegetationen, Regen- oder Nebelwäldern. Einige Arten besiedeln auch savannenartige Grasformationen oder Sümpfe. Es sind auch Arten bekannt, die hohe Salz- oder Schwermetallkonzentrationen tolerieren können. Jedoch zeichnen sich die Böden der meisten Verbreitungsgebiete durch einen sauren pH-Wert und Nährstoffarmut aus.

Die Wuchsform der *Nepenthes*-Arten ist meist lianenartig, wobei die Ranken bis zu 15 m lang werden können (z.B. *Nepenthes bicalcarata*). Es sind aber auch strauchförmige Arten, wie *Nepenthes pervillei*, mit Sprossen von über 1 m Länge bekannt.

2.2.1 Charakterisierung und Strukturen der *Nepenthes*-Kannen

Die Blätter werden in drei Bereiche gegliedert, wobei jeder Teil unterschiedliche Funktionen erfüllt. Der flache, blattförmige Basalteil dient der Photosynthese und damit der Energieversorgung der Pflanze. Der rundliche Kannenstiel ist meist als Ranke ausgebildet und befestigt die Pflanze in der Umgebungsvegetation. Die Kanne, die sich am Ende des Blattes befindet, stellt eine sogenannte Gleitfalle dar und dient dem Beutefang. Obwohl die Kannenform nicht unbedingt der eines Laubblattes gleicht, stimmt sie im Grundbauplan mit diesem überein. So geht der Basalteil der Kanne aus dem Blattgrund hervor und ist sehr groß und flächig ausgeprägt. Der Kannenstiel entspricht dem Blattstiel und ist je nach Kannenart unterschiedlich ausgebildet. Die Kanne ist eine Bildung der Blattspreite und zeigt bei verschiedenen Arten eine große Variationsbreite an Form und Farbe. Fast alle Kannen der Nepenthaceae weisen einen Dimorphismus auf. Aus Keimlingen entwickeln sich zuerst die terrestrischen Bodenkannen. Diese sind kleiner und weisen eine eiförmige Form mit ausgeprägten Flügelleisten auf. Die Luftkannen entwickeln sich später und sind zylindrisch geformt. Die Flügelleisten sind klein und unscheinbar (siehe Abbildung 2.1). Die Blattranke, welche die Blattspreite mit der Basis der Kanne verbindet, fixiert durch je eine Windung von ca. 360° die Pflanze an umliegender Vegetation (Moran, 1996; Clarke, 1997).

Das Wachstum beginnt mit einer kleinen, flachen Struktur am Ende des Kannenstiels (Abbildung 2.2, Bild 1). Während der Entwicklung färbt sich die Kanne grün, wobei reife Kannen am Halsbereich, von der Öffnung der Kanne bis zum Beginn der Wölbung, eine rötliche Färbung entwickeln (Abbildung 2.2, Bild 6). Die Kannenöffnung ist mit einem glatten, klappenähnlichen Deckel verschlossen (Abbildung 2.2, Bild 2 bis 4). Während der Entwicklung, in der 6. bis 8. Woche, füllt sich die Kanne teilweise mit Flüssigkeit. Offene Kannen weisen eine beidseitig über den Rand gewölbte Struktur, das Peristom, auf (Abbildung 2.2, Bild 5 und 6). Kannenpflanzen nutzen verschiedene, passive Methoden zur Anlockung der Beute. Zum Einen erfolgt dies über das blumenartige Erscheinungsbild der Kannen, welches sich vor allem durch eine auffällige Färbung ausdrückt (siehe Abbildung 2.3), und über die meist rot, gelb oder weiße Färbung des Peristoms (Moran, 1996).

Zum Anderen kann die Anziehung der Insekten auch über olfaktorische Reize erfolgen. Der obere Bereich der Kanne, der als Anlockungszone bezeichnet wird, beinhaltet Deckel und Peristom. Über Nektardrüsen, die an der Unterseite des Deckels neben zahlreichen Trichomen verschiedener Form auftreten (Owen & Lennon, 1999), sowie den inneren Rand des Peristoms auskleiden, kann süßlicher Duft verströmt werden, der die Beute anlockt. Es ist aber auch bekannt, dass die Flüssigkeit der Luftkannen von *N. rafflesiana* (Moran, 1996) bzw. die Unterseite des Deckels von *N. lowii* einen extrem unangenehmen Geruch absondern, der vor allem fliegende Beute anzieht.

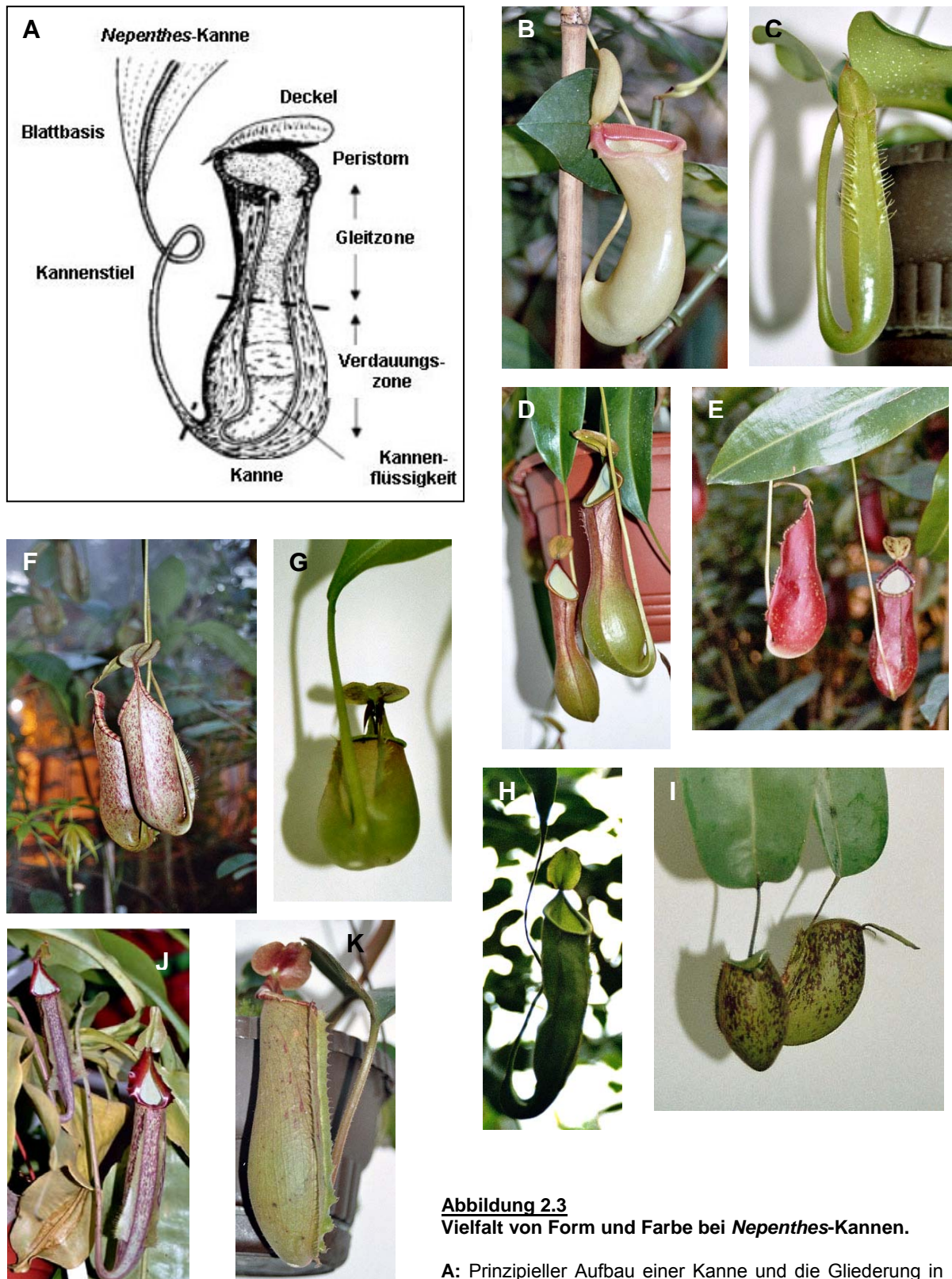
Das Peristom, dessen Form für jede Art charakteristisch ist, behindert durch seine an den Rändern der Kanne überhängende Struktur, sowie durch eine Zahnung zum Kanneninneren hin die Flucht der Beute. Es sind auch besondere Strukturen des Peristoms bekannt, wie die Ausbildung zweier Peristomrippen bei *N. bicalcarata* oder von Futterhaaren am äußeren Rand des Peristoms bei *N. albomarginata*, die eigens für die Anlockung von Termiten produziert werden (Merbach et al., 2002).

Als Gleitzone wird der Halsbereich der Kanne bezeichnet, da dessen Innenseite spezielle Strukturen aufweist, welche den Fang der Beute erleichtern. Sie wird auch als Wachzone bezeichnet, da bei vielen Arten, wie z.B. *N. alata* und *N. ventrata*, die Zellen von einer dicken Wachsschicht bedeckt sind, deren Struktur von Mikrokristallen, bestehend aus aliphatischen Komponenten und langkettigen

Aldehyden, geprägt ist (Riedel et al., 2003). Durch die mikrokristalline Struktur vermindert das Wachs die Haftung von Insekten. Diese geht durch die Benetzung der Oberfläche mit Flüssigkeit komplett verloren und die Insekten gleiten in den Kannensaft (Gaume et al., 2002 & 2004). Die Zellen dieser Zone besitzen zudem eine halbmondförmige Struktur, die schindelartig und ins Innere der Kanne gerichtet ist. Diese spezielle Form ist auch ohne die Wachsschicht sehr effektiv, um Insekten in das Kanneninnere gleiten zu lassen. An Kannen von *N. bicalcarata*, die keine Wachsschicht besitzen, wurde gezeigt, dass die Beute auf einem Flüssigkeitsfilm, der durch Regen, Kondensation oder auch Nektarproduktion entsteht, direkt in den Kannensaft rutschen kann (Bohn & Federle, 2004).

Die Verdauungszone weist große multizelluläre Drüsen auf, die sich aus einzelnen Epidermiszellen entwickeln und ist teilweise oder komplett mit Flüssigkeit gefüllt. Die Oberfläche der Drüsenschicht wird durch verschiedene Strukturen, wie epidermale Vertiefungen (bis zu 30 µm), die an ihrem Grund die Drüsen beherbergen und von hervorstehenden Hauben (15 bis 30 µm hoch) an den Rändern überzogen werden, geprägt. Die im oberen und mittleren Bereich liegenden Drüsen befinden sich vollständig in der Vertiefung, wohingegen die Drüsen der unteren Zone aus dieser herausragen (Gorb et al., 2004). Das Ausmaß der Haube nimmt zum Boden der Kanne hin ab, wohingegen die Drüsengröße steigt. Die Oberfläche zwischen den Drüsen ist mit Epidermiszellen bedeckt. Diese besitzen, ebenso wie die Kopfzellen der Drüsen, durch die Einlagerung von Cutin stark verdickte laterale und äußere Zellwände (Owen & Lennon, 1999; Gorb et al., 2004).

Die Drüsen haben verschiedene Funktionen. Sie sind für die Wahrnehmung chemischer Stimuli, z.B. von Proteinen, die Sekretion der Verdauungsenzyme, sowie für die Aufnahme der aus der Beute gewonnenen Nährstoffe verantwortlich. Dabei wird Phosphat von der Kanne absorbiert (Lüttge, 1964), jedoch kommt der Gewinnung von Stickstoff die größte Bedeutung zu (Schulze, 1997 & 1999). Es wird vermutet, dass dessen Aufnahme in Form von Ammoniumionen, einzelner Aminosäuren oder sogar kleiner Oligopeptide (Di- und Tripeptide) erfolgt.



Alle Aufnahmen wurden im Botanischen Garten in Jena gemacht. Durch die Nachbearbeitung mit „Photoshop 6“ sind keine Größenangaben möglich.

Bisher gab es noch keine Bestätigung für das Vorhandensein von Aminosäure- oder Peptidtransportern in den Zellen der Drüsen. Allerdings konnte über in situ Hybridisierung ein Ammoniumtransporter identifiziert werden, der in den Kopfszellen der Drüsen exprimiert wird (Schulze et al., 1999).

2.2.2 Kannenflüssigkeit

Die Flüssigkeit von *Nepenthes*-Kannen setzt sich aus verschiedenen Substanzen, wie Chlorid- und Salzionen, organischen Säuren und Wasser, zusammen. Der pH-Wert der Flüssigkeit schwankt während der verschiedenen Entwicklungsstadien der Kanne (siehe Abbildung 2.2). In geschlossenen Kannen von *N. alata* wurde ein durchschnittlicher Wert von pH 4,9 bestimmt. Kurz nach der Öffnung der Kanne betrug dieser 4,4 und sank bei Vorhandensein der Beute innerhalb von 2h auf 3. In älteren Kannen wurde ein basischer pH-Wert ($\text{pH} > 7$) gemessen (An et al., 2001). Es wird angenommen, dass die Ansäuerung des Kannensaftes über Salzsäure (HCl) erfolgt. Die Chloridionenkonzentration beträgt in neu geöffneten Kannen durchschnittlich 600 bis 900 mg Cl⁻/l (Morrissey, 1955). Über eine H⁺-ATPase, die in der Plasmamembran der Kopfszellen lokalisiert ist, werden Wasserstoff-Ionen in die Kannenflüssigkeit abgegeben. Die Expression der ATPase wird sowohl durch das Vorhandensein von Beute als auch durch die steigende Konzentration an Ammonium, welches beim Verdau von Proteinen entsteht, induziert (An et al, 2001).

Es wurde schon sehr früh angenommen, dass die Kannenflüssigkeit neben niedermolekularen Substanzen Enzyme enthält, welche die Zersetzung der Beute bewerkstelligen. Frühere Versuche, in denen der Kannensaft auf die Aktivität verschiedener Enzyme getestet wurde, ergaben ein positives Ergebnis für Esterase, Amylase, Chitinase, Lipase, Peroxidase, Phosphatase, Protease und Ribonuklease (Juniper, 1989).

Bereits 1964 wurde von Lüttge die Aktivität von Proteinasen und Transaminasen im sterilen Sekret geschlossener Kannen nachgewiesen (Lüttge, 1964; Steckelberg et al., 1967). Zudem wurde eine saure Protease, namens Nepenthacin, mit starker Ähnlichkeit zu Pepsin, beschrieben, welche Casein als Substrat akzeptiert (Jentsch, 1972). Alle bis dahin beschriebenen Proteasen hatten ein pH-Optimum entweder nur im sauren (pH 2-3) oder ein zweites

Optimum im fast neutralen pH-Bereich (pH 6-6,5) und waren bis zu einer Temperatur von 50°C stabil (Lüttge, 1964).

An et al. (2002) gelang es durch in situ Hybridisierung die Expression zweier Aspartat-Proteinasen (APs) in den Drüsen von *N. alata* nachzuweisen, wobei diese ein Pflanzen-spezifisches Insert (PSI) in ihrer Sequenz beinhalteten, welches ein Zielsignal für Proteine zur Lokalisation in die Vakuole darstellt. Jedoch wurden auch Pflanzen-APs beschrieben, die trotz des PSI-Fragments in der extrazellulären Matrix detektiert wurden (Frazao et al., 1999; Vieira et al., 2001). In weiteren Experimenten wurde die Verdauung der oxidierten B-Kette von Rinderinsulin in der Kannenflüssigkeit verfolgt und es konnten dabei verschiedene Abbauprodukte, wie Peptide und Aminosäuren, detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf das Vorhandensein von Exo- und Endopeptidasen geschlossen und es konnten verschiedene Schnittstellen identifiziert werden (An et al., 2002).

Später wurden zwei Aspartat-Proteinasen, Nepenthesin Typ I und II, für *N. distillatoria* und *N. gracilis* beschrieben, die in den die Drüsen umgebenden Parenchymzellen exprimiert werden (Athauda et al., 2004; Takahashi et al., 2005). Diese entsprechen nicht den oben genannten APs, da hier das PSI-Fragment fehlt. Für beide Arten wurde die cDNA-Sequenz für Typ I und II bestimmt, wobei sich in Vergleichen mit vakuolären APs anderer Pflanzen nur Ähnlichkeiten von maximal 20% ergaben. Damit stellen die *Nepenthes*-APs eine neue Unterfamilie von Aspartat-Proteinasen dar, die sich durch einen Reichtum an Cysteinresten und einer charakteristischen Insertion namens „Nep-type AP- (NAP) specific Insert“ auszeichnen. Die Enzyme werden als Preproproteine synthetisiert, wobei nach Abspaltung des Signalpeptids das Proprotein in den Kannensaft abgegeben wird und dort aktiviert wird (Takahashi et al., 2005).

Die beschriebenen APs stellen die bisher einzige molekularbiologische Charakterisierung der von den Verdauungsdrüsen sekretierten Enzyme dar. Andere Untersuchungen beschränkten sich auf Aktivitätsmessungen, wobei dort keine genauen Aussagen über die Identität dieser Enzyme gemacht werden konnten. Deshalb sollte im Rahmen der Diplomarbeit versucht werden, weitere Enzyme aus dem Kannensaft zu bestimmen, um diese dann über molekularbiologische Methoden näher charakterisieren zu können.

2.3 Ziel der Arbeit

Von karnivoren Pflanzen der Gattung *Nepenthes* ist schon seit längerem bekannt, dass sie pflanzeigene hydrolytische Enzyme in Drüsenzellen exprimieren und diese in die Kannenflüssigkeit abgeben. Außer zweier bisher beschriebenen Aspartat-Proteinasen, Nepenthesin I und II, ist nur wenig über die Identität dieser Enzyme bekannt. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, Proteine aus dem sterilen Sekret geschlossener Kannen zu isolieren. Dafür wurde die Methode der 2D-Elektrophorese gewählt, die zunächst für die Kannenproteine optimiert werden sollte. Die resultierenden Proteinspots sollten nach einem tryptischen Verdau massenspektrometrisch analysiert werden. Anhand der sich daraus ergebenden Peptidsequenzen sollten Datenbankvergleiche durchgeführt werden, um die Proteine zu identifizieren. Ausgehend von den Peptidsequenzen sollten dann exemplarisch für ein Protein über die PCR-Methode Teile der cDNA-Sequenz ermittelt werden, die dann über die 5'-RACE- und 3'-RACE-PCR-Methoden zu einer Vollängen-cDNA-Sequenz vervollständigt werden sollte.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Pflanzenmaterial

Pflanze	Material	Herkunft
<u>Nepenthaceae</u>		
<i>Nepenthes</i> sp.	Kannenflüssigkeit	Botanischer Garten, Jena Botanischer Garten, München
<i>Nepenthes rafflesiana</i>	genomische DNA aus Kannen	Botanischer Garten, Jena
<i>Nepenthes gracilis</i>	genomische DNA und Gesamt-RNA aus Kannen	Botanischer Garten, Jena
<i>Nepenthes superbum</i>	Kannen	Botanischer Garten, Jena
<u>Sarraceniaceae</u>		
<i>Sarracenia purpurea</i>	Kannen	Botanischer Garten, Jena

3.1.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Vertreiber
One Shot [®] TOP10 Zellen <i>Escherichia coli</i> (chemisch kompetent)	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Vektoren

Die Karten der Vektoren sind im Anhang 8.4 gezeigt.

Name	Vertreiber
pCR [®] 4Blunt-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] 4-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und mit nukleasefreiem ddH₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gebracht.

Oligonukleotide für die Positivkontrolle

Name	Sequenz	T _m
Nep1_forwa	5'- GGA GAT GGC GAA TAT CTG ATG - 3'	57,9°C
Nep1_forwb	5'- CTC TGT CGC TTC CTT CTC AAC - 3'	59,8°C
Nep1_reva	5'- AAT GCA TCA CAA AGG TGG GTA TC - 3'	58,9°C
Nep1_revb	5'- GGT CAC GTC GAG TTG AGA AG - 3'	59,4°C

Degenerierte Oligonukleotide für die Amplifizierung einer *t/p*- (Thaumatococcus-like protein) Teilsequenz

Name	Sequenz	T _m
Olp_forwa	5'- TAA ACC AAT TYR RMA ACW WGG ATT TC - 3'	56,9°C
Olp_forwb	5'- TGT AAY AAY CCW TGT ACY GTT ATT C - 3'	57,2°C
Olp_reva	5'- TGC AAC AAT ATT GAT CGK TYT TGA AYA C - 3'	60,0°C
Olp_revb	5'- GTG CTT GTT KGR TCA TCC TTA G - 3'	58,4°C
Thaumos_forw1	5'- CYT ACA CCG TCT GGG CAG - 3'	59,4°C
Thaumos_forw2	5'- AAA TGC GAA ACY GGT GAC TG - 3'	56,3°C
Thaumos_reverse	5'- AGG GCA AAA CAC RAC CTT RTA G - 3'	58,4°C

(Erläuterung: Y = C/T, R = A/G, W = A/T, S = C/G, M = A/C, K = G/T)

Oligonukleotide für die 5'- und 3'- RACE

Name	Sequenz	T _m
5_RACE_GS_OP	5'- GAC CAC AAC TCC CAG AAT TAC AAC AG - 3'	63,2°C
5_RACE_GS_IP	5'- TCC GCC GTA CAT GTA GGA CCA TTG - 3'	64,4°C

Name	Sequenz	T _m
3_RACE_GS_OP	5'- GGC TAT GGT TCC CCT CCT AAC AC - 3'	64,2°C
3_RACE_GS_IP1	5'- GAC TTC TTT GAC ATG TCA CTT GTT GAT G - 3'	62,2°C
3_RACE_GS_IP2	5'- CAA TGT CCT TTC TCC CAA CAT CTA ATG - 3'	61,9°C

Oligonukleotide aus dem "First Choice[®] RLM-RACE Kit"

5'RACE-Adapter

5'- GCU GAU GGC GAU GAA UGA ACA CUG CGU UUG CUG GCU UUG AUG
AAA - 3'

3'RACE-Adapter

5'- GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG(T)₁₂VN - 3'

5'RACE Outer Primer (10 µM)

5'- GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG - 3'

5'RACE Inner Primer (10 µM)

5'- CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG - 3'

3'RACE Outer Primer (10 µM)

5'- GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CT - 3'

3'RACE Inner Primer (10 µM)

5'- CGC GGA TCC GAA TTA ATA CGA CT - 3'

Oligonukleotide für die Vollängen-cDNA-Amplifizierung

Name	Sequenz	T _m
Thaumos_sense1	5'- CAA TGA GCC AAT TCA TAA AAT TCA TTG - 3'	57,4°C
Thaumos_sense2	5'- ATC CAT CAT TCC ACT TTC ACA AAG - 3'	57,6°C
Thaumos_antisense	5'- CAG TTA TAC TTT AAG GGC AAA ACA CAA C - 3'	60,7°C

Oligonukleotide für die Kolonie-PCR und Sequenzierungsreaktionen

Name	Sequenz	T _m
M13 Reverse	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'	50,4°C
T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	53,2°C

3.1.5 Enzyme

Name	Konzentration	Vertreiber
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	2,5 u/μl	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 u/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	200 u/μl	Invitrogen, Karlsruhe
<i>EcoR</i> I	20 u/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Trypsin	0,1 μg/μl	Promega, Mannheim
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	k. A.	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK
Tobacco Acid Pyrophosphatase	k. A.	Ambion Huntingdon, Cambridgeshire, UK
T4 RNA Ligase	k. A.	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK
M-MLV Reverse Transkriptase	k. A.	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK

3.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien wurden in mindestens p.a. Qualität von den Firmen Amersham Bioscience (München), SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) und der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Reagenzien und Puffer für molekularbiologische Methoden stammten von Promega (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, UK), Qiagen (Hilden) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

3.2 Mikroskopie

3.2.1 Lichtmikroskopie

Für eine lichtmikroskopische Untersuchung der Drüsen wurden frische Kannen von *N. rafflesiana* und *N. superbum* genommen und mit einer Rasierklinge Längs- und Querschnitte des mit Drüsen besetzten Abschnitts, der etwa die unteren zwei Drittel der Kanne einnimmt, angefertigt. Zum Vergleich wurden die Kannen einer weiteren karnivoren Pflanze, *Sarracenia purpurea*, herangezogen. Die Präparate wurden in Wasser unter dem Lichtmikroskop (Axioskop; Zeiss, Jena) betrachtet und über ein digitales Bildbearbeitungsprogramm (Spot; Visitron Systems, Puchheim) dokumentiert.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Präparation wurden Flächenschnitte der Drüsenschicht aus dem Inneren einer Kanne von *N. rafflesiana* angefertigt und auf spezielle Objektträger der Firma Leica, welche ein Netz aus inertem Plastik aufweisen, aufgebracht. Diese wurden dann am Leica AS LMD- (Laser Microdissection) Gerät betrachtet.

3.3 Untersuchung des Proteinmusters im Kannensaft

3.3.1 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte aus offenen sowie geschlossenen Kannen von *Nepenthes* sp. aus den Botanischen Gärten in Jena und München. Die Kannen wurden am unteren Ende mit einer sterilen Spritze (Sterican-Kanülen Ø 1mm, Omnifix®-Spritzen, der Firma BRAUN, Melsungen) angestochen und das Sekret entnommen. Die in den Botanischen Gärten vertretenen Arten waren *N. alata*, *N. superbum*, *N. rafflesiana*, *N. gracilis*, *N. khasiana*, *N. truncata*, *N. fusca*, *N. ampullaria*, *N. mirabilis*, *N. ventricosa* und *N. bicalcarata*. Aufgrund des geringen Volumens an Flüssigkeit pro Kanne konnte nicht zwischen den einzelnen Arten unterschieden werden. Deshalb wurden die Proben vereinigt.

Die Flüssigkeit wurde in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

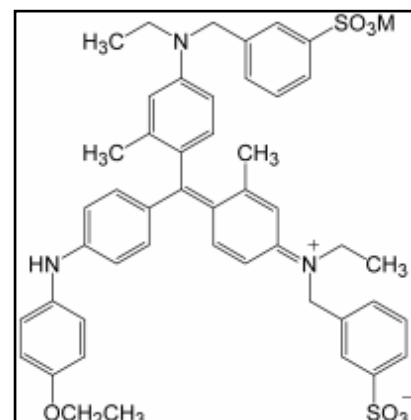
3.3.2 Probenaufbereitung

Um das Probenvolumen einzuengen, wurde der Kannensaft in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Gefriertrockner (Maxi-dry lyo, Normalab Analis, Suarlée, Belgien) lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat wurde in 1 ml 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

Quantifizierung der Proteine nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Bradford-Assay (Bradford, 1976). Hierbei handelt es sich um eine Farbreaktion, die photometrisch verfolgt werden kann. Das Bradford-Reagenz enthält den Säurefarbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 (siehe Abb. 3.1), dessen Absorptionsmaximum sich in Gegenwart von Proteinen und im saurem Milieu von 465 zu 595 nm verschiebt. Dies geschieht vermutlich über eine Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Dabei bindet der Farbstoff recht unspezifisch an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Wichtige Wechselwirkungen werden so mit Arginin eingegangen, seltener auch mit Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Hieraus wird ein Nachteil dieser Methode deutlich, denn gleiche Mengen von verschiedenen Standardproteinen können erhebliche Differenzen in den resultierenden Absorptionskoeffizienten aufweisen.

Abbildung 3.1
Darstellung der Strukturformel von Coomassie-Brillantblau G250
(als Sulfonat)



Für die Messung wurden 20 µl der Probe und 200 µl Bradfordreagenz in eine Mikrotiterplatte (NUNC™, Wiesbaden) pipettiert. Nach etwa 10 min wurde die Absorption bei 595 nm in einem Photometer (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Ismaning) gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA (bovine serum albumin).

Entsalzen über die „PD-10 Desalting column“

Um niedermolekulare Stoffe, wie Zucker und Salze, aus der Proteinlösung zu entfernen, kann man die „PD-10 Desalting column“ (Amersham Biosciences, München) verwenden.

Vor Beginn der Arbeit musste die Säule äquilibriert werden. Dazu wurde eine 0,1 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,5) verwendet. Danach erfolgte die Zugabe von 2,5 ml Probe. Nachdem diese in die Matrix eingesickert ist, wurden 3,5 ml 0,1 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) zugegeben und das Eluat, in welchem sich die Proteine befinden, gesammelt.

Die Säule kann nach Säuberung der Matrix mit 5 ml Wasser und 10 ml 50%-igem Ethanol, wiederverwendet werden.

Präzipitation der Proteine

Präzipitation mit Methanol

Um die Proteine zu fällen, wurde das dreifache Volumen an Methanol zur Proteinlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei -80°C. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation sedimentiert und in 100 µl 0,1 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

TCA-Fällung

Von einer 50%-igen Trichloressigsäure- (TCA) Stammlösung wurde soviel zugegeben, dass eine Endkonzentration von 5% in der Probe vorlag. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 13.000 rpm pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 1 ml ddH₂O wurde es getrocknet und in 100 µl

Probenpuffer aufgenommen. Dieser enthielt den pH-Indikator Bromphenolblau, welcher im Neutralen blau und im Sauren gelb erscheint. War die Lösung zu sauer, wurde sie mit Natronlauge neutralisiert.

TCA/Aceton-Fällung

Für diese Art der Proteinfällung wurde 1 Volumenteil (VT) der Probenlösung mit 1 VT einer 20%-igen TCA/Aceton-Lösung versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei -20°C und anschließend weitere 2h bei 4°C. Danach wurden die Proteine 10 min bei 13.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mehrmals mit eiskaltem, 80%-igem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde dieses in 100 µl 0,1 mM Tris-Puffer aufgenommen und über Nacht auf Eis gelöst.

Präzipitation unter Verwendung des „2-D Clean-Up Kits“

Für die Vorbereitung einer Proteinlösung für eine SDS-Page oder 2D-Elektrophorese bietet die Firma Amersham Bioscience den „2-D Clean-Up Kit“ an. Dabei konnten maximal 100 µg Protein, was einem durchschnittlichen Volumen von 100 µl Probe entsprach, pro Präzipitationsvorgang eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Das erhaltene Pellet wurde in IEF-Proben- bzw. Rehydrationspuffer resuspendiert.

Wenn das erhaltene Pellet in Tris-Puffer löslich war, wurde nach der Proteinpräzipitation die Konzentrationsbestimmung nach Bradford wiederholt. Ließ sich das Pellet jedoch nur in IEF-Probenpuffer für die 2D-Elektrophorese lösen, war dies nicht möglich, da der Probenpuffer ebenfalls einen Farbumschlag des Reagenz bewirkt.

3.3.3 SDS-PAGE und 2D-Elektrophorese

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) überdeckt als anionisches Detergenz die Eigenladungen von Proteinen. Es lagert sich beim Erhitzen (10 min,

95°C) so an die Proteine, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit (circa 1,4 g SDS pro g Protein) entstehen. Dies ermöglicht dem Protein im elektrischen Feld in Richtung Anode zu wandern. Somit können Proteingemische über die Gelmatrix, die aus vernetzten Polymeren des Acrylamids besteht, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Für die SDS-PAGE wurden zwei verschiedene Protokolle angewandt. Bei der Elektrophorese nach Laemmli (1970) wird ein SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem angewandt, welches eine gute Auflösung von Polypeptiden bis zu einem Molekulargewicht (MW) von 15 kDa erlaubt.

Für Peptide mit einem MW kleiner als 15 kDa bietet sich die Methode nach Schägger und von Jagow (1987) an, bei welcher die Molarität der Puffer erhöht ist und Tricin statt Glycin angewandt wird.

Es wurden für alle Versuche mit Laemmli-Gelen 10%-ige Trenngele verwendet, für deren Herstellung vorbereitete Stammlösungen herangezogen wurden. Für das Trenngel werden 6,6 ml Polyacrylamid-Lösung (Rotiphorese®-Gel 30 NF-Acrylamid/Bis 30% (29:1), ROTH), 5 ml Trenngelpuffer (0,8% SDS; 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) und 8,4 ml ddH₂O vermischt. Nach der Zugabe von 10 µl N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 66 µl 10%-iger Ammoniumpersulfatlösung (APS)-Lösung wurde das Gel gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 45 min oder mehrere Stunden, falls die elektrophoretisch aufgetrennten und durch proteolytische Spaltung erhaltenen Peptide mittels TOF-MS/MS sequenziert werden sollten, da sich monomeres Acrylamid störend auf die Massenspektrometrie auswirkt.

War das Trenngel polymerisiert, wurde die Oberfläche mit destilliertem Wasser von Rückständen befreit. Das Sammelgel enthielt 1,3 ml Polyacrylamid-Lösung, 5 ml Sammelgelpuffer (0,4% SDS; 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8) und 3,7 ml ddH₂O. Nach dem Zusatz von 10 µl TEMED und 60 µl 10%-iger APS-Lösung wurde dieses auf das Trenngel aufgebracht und der Kamm für die Geltaschen hinzugefügt. Die Polymerisationsdauer beträgt mindestens 15 min.

Die Proteingemische wurden mit Probenpuffer (0,1 M DTT; 5% SDS; 10% Glycerin; 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8; Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen gegeben. Es wurden Gelplatten mit den Abmessungen 160 mm x 180 mm

x 1 mm verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer Hoefer SE 600, angeschlossen an das Power Supply EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, München). Die Elektrophorese wurde für 17 h bei 50 V, 25 mA und 15°C durchgeführt. Die Kühlung erfolgte über einen Umlaufkühler (MultiTemp III thermostatic circulator, Amersham Bioscience, München).

Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsmarker (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIO-RAD) mitgeführt.

Bei der Methode nach Schägger und von Jagow (1987) besteht das Trenngel aus 5 ml Polyacrylamidlösung (Rotiphorese[®]-Gel 40 NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (37,5:1), ROTH), 6 ml 3x Running Gel Buffer (RGB; 3 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,3% SDS), 7 ml ddH₂O, 18 µl TEMED und 50 µl 10%-iger APS-Lösung. Das Sammelgel setzt sich aus 1,2 ml Polyacrylamidlösung, 4 ml 3x RGB, 6,8 ml ddH₂O, 12 µl TEMED und 60 µl 10%-iger APS-Lösung zusammen. Die Vorgehensweise bei der Herstellung der Gele, ist der von Laemmli-Gelen gleich, allerdings unterscheidet sich die Vorbereitung der Proteinproben. Dabei werden zu je 30 µl Proteinlösung 16,5 µl 3x TSN-Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 6% SDS; 10% Glycerin; 0,1% Serva Blau G) und 3 µl 0,2 M Dithiothreitol (DTT)-Lösung gegeben. Der Ansatz wird 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend werden 5 µl 0,5 M Iodacetamid (IAA) -Lösung zugefügt und 60 min bei 37°C inkubiert. Vor Beginn der Elektrophorese sollte zu den Proben nochmals die gleiche Menge an DTT zugegeben werden, da dieses während des Erhitzens oxidiert werden kann.

Die Elektrophorese wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei Laemmli-Gelen durchgeführt.

2D-Elektrophorese

Die 2D-Elektrophorese setzt sich aus zwei Schritten zusammen. Die erste Dimension ist eine isoelektrische Fokussierung, in der die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) erfolgt. Die zweite Dimension ist eine SDS-PAGE, in der die nach ihrem pI aufgetrennten Proteine nach ihrem Molekulargewicht separiert werden.

IEF (Isoelektrische Fokussierung)



Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut, welche unterschiedlich geladene Seitenketten besitzen. Dadurch trägt jedes Protein eine vom pH-Wert abhängige, charakteristische Eigenladung, von welcher die Wanderungsrichtung im elektrischen Feld bestimmt wird.

Bei der IEF wandern Proteine oder Peptide entlang eines pH-Gradienten. Dies geschieht solange, bis sie einen pH-Bereich erreicht haben, in dem ihre Nettoladung und damit ihre Wanderungsgeschwindigkeit Null sind, der isoelektrische Punkt.

Für die IEF werden Gelstreifen mit einem pH-Gradienten verwendet, welcher an der Anode ein saures und an der Kathode ein alkalisches Ende aufweist. Der pH-Gradient kann über Trägerampholyte hergestellt werden. Trägerampholyte sind heterogene Synthesegemische aus mehreren niedermolekularen aliphatischen Oligoamino-Oligocarbonsäuren mit unterschiedlichem pI. In den „Immobiline Dry Strips“ der Firma Amersham Bioscience werden die löslichen Ampholyte durch Immobiline, bifunktionelle Acrylamidderivate, die zugleich schwache Säuren oder schwache Basen sind (siehe Tabelle 3.1), ersetzt. Dieses System weist eine höhere Stabilität des pH-Gradienten durch eine kovalente Fixierung in der Polyacrylamidmatrix (4%) auf.

Tabelle 3.1

Strukturformeln der sauren und basischen Acrylamidderivate zur Herstellung von immobilisierten pH-Gradienten. (aus Bioanalytik (Lottspeich/Zorbass), 1998)

Strukturformel	pK
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	3,6
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$	4,6
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}$ 	6,2
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 	7,0
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	8,5
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	9,3
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	10,3
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	12

Für die IEF wurden Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) in den pH-Bereichen 3-10 bzw. 3-5,6 von 13 cm Länge (Amersham Bioscience, München) verwendet. Die Proben wurden nach der Präzipitation in IEF-Probenpuffer (8 M Harnstoff, 4% CHAPS, 2% IPG-Puffer) aufgenommen und mit Rehydrationspuffer (0,002% Bromphenolblau; 0,28% DTT; 2% IPG-Puffer (pH 3-10 bzw. 3,5-5); 2% CHAPS; 8 M Harnstoff) auf ein Volumen von 250 µl gebracht. Zeitweise wurden 10 µg eines 2D-Markers, die „Creatine phosphokinase“ oder die „Carbonic anhydrase“ (CPK oder CA, Carbamylite Calibration Kit for 2-D Electrophoresis, Amersham Bioscience, München), mitgeführt. Die Lösung wurde in eine Aussparung der Einquellvorrichtung (reswelling tray) gegeben, der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgebracht und die Aussparung mit Mineralöl überschichtet. Die Rehydratation erfolgte über Nacht.

Die Fokussierung wurde in der Multiphor II Elektrophorese-Einheit, angeschlossen an das Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL (Amersham Bioscience, München), durchgeführt. Es wurden die folgende Programme verwendet:

Programm 1: (für Immobilin Dry Strip pH 3-10; 13 cm)

Phase 1	300 V	0,001 kWh
Phase 2	3500 V	2,900 kWh
Phase 3	3500 V	14,000 kWh

Programm 2: (für Immobilin Dry Strip pH 3-5,6; 13 cm)

Phase 1	300 V	0,001 kWh
Phase 2	3500 V	2,900 kWh
Phase 3	3500 V	13,100 kWh

Beide Programme wurden bei 2 mA, 5 W und 20°C durchgeführt. Die Kühlung fand über eine Kühlplatte, angeschlossen an einen Durchlaufkühler (Multitemp III thermostatic circulator, Amersham Bioscience, München), statt.

Der vollständige Verlauf war daran zu erkennen, dass sich das im Rehydrationspuffer enthaltene Bromphenolblau an der Anode anreicherte. Nach Abschluss der Fokussierung wurden die IPG-Streifen äquilibriert. Dies erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde der Streifen in Äquilibriumspuffer (0,002% Bromphenolblau; 2% SDS; 30% Glycerol; 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff)

mit 10 mg/ml DTT für mindestens 45 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde der Streifen in Äquilibriumspuffer mit 25 mg/ml IAA überführt und wiederum für 45 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Streifen auf ein 10%-iges Laemmli-Gel gebracht und eine SDS-PAGE unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt.

Eine andere Möglichkeit bestand darin, Fertiggele (ExcelGel™ SDS Gradient 8-18, Amersham Bioscience, München) einer Gelgröße von 245 mm x 110 mm x 5 mm zu verwenden. Dabei wurden 3 ml Kerosin auf die Kühlplatte der Elektrophorese-Einheit Multiphor II pipettiert und das Gel mit der Gelseite nach oben aufgelegt. Nachdem der Positionierer befestigt wurde, konnten die Pufferstreifen aufgebracht werden. Der IPG-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten auf das Gel gelegt und der Marker mit Hilfe eines Filterpapierplättchens aufgetragen. Die horizontale SDS-PAGE fand bei 600 V, 30 W, 50 mA und 15°C für 140 min statt. Die Elektrophorese-Einheit war an das Power Supply EPS 3500 XL angeschlossen, wobei die Kühlung wiederum über den Durchlaufkühler Multitemp III erfolgte.

3.3.4 Proteinfärbemethoden

Coomassie-Färbung

Bei der herkömmlichen Coomassie-Färbung wird das Gel in einer Mischung von 0,02% Coomassie-Brillantblau G 250 in 10% Essigsäure eingelegt. Dabei werden die Proteine durch die Essigsäure im Gel fixiert. Der überschüssige Farbstoff wird anschließend durch Waschen in 10%-iger Essigsäure entfernt. Diese Methode erreicht Nachweisempfindlichkeiten von 100 ng bis 1 µg, je nach Farbstoffbindevermögen der verschiedenen Proteine.

Bei anderen Protokollen, wie der „sensitiven Coomassie-Färbung“ oder der „kolloidalen Coomassie-Färbung“ der Firma Roth werden Nachweisgrenzen bis zu 30 ng Protein erreicht.

In der sensitiven Coomassie-Färbung wurden die Proteine in einer Lösung aus 2% Phosphorsäure und 30% Ethanol für 30 min im Gel fixiert. Diese wurden dann über Nacht mit der Färbelösung (0,02% Coomassie Brilliantblau G 250, 2% Phosphorsäure, 5% Aluminiumsulfat, 10% EtOH) behandelt. Um den Kontrast

zwischen Gelbanden und Hintergrund zu erhöhen, wurden die Gele in einer Lösung aus 10% Ethanol und 2% Phosphorsäure gewaschen (Kang et al., 2002). Ähnliche Färbeergebnisse erreicht man unter Verwendung des Roti[®]-Blue-Färbeprotokolls der Firma Roth. Hierbei wurde das Gel für 60 min in Fixierlösung (1% Phosphorsäure, 20% MeOH) inkubiert und danach über Nacht mit Roti[®]-Blue-Färbelösung (20% MeOH; 20% Roti[®]-Blue, 5x) behandelt. Anschließend wurden die kolloidalen Farbstoffkomplexe mit Waschlösung (25% MeOH) von der Geloberfläche entfernt. Nach der Behandlung mit Stabilisierungslösung (20% Ammoniumsulfat) konnte das Gel in Trocknerlösung (10% Glycerin, 20% EtOH) bis zur Vakuumtrocknung aufbewahrt werden.

Silberfärbung

Die Silberfärbung (Blum et al., 1987) ist deutlich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Sie erreicht Nachweisgrenzen von 5 bis 30 ng Protein. Bei dieser Methode werden die Silberionen (Ag^+), die von Proteinen durch deren funktionelle Gruppen und den Peptidbindungen gebunden werden, zu Silberkeimen (Ag) reduziert. Durch starke Reduktionsmittel werden anschließend alle Ag^+ -Ionen im Gel zu metallischem Silber reduziert. In der Nähe von Silberkeimen geschieht dies viel schneller als im Rest des Geles. Dadurch färben sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz. Die Reaktion lässt sich mit einer Änderung des pH-Wertes stoppen. Dies erfolgte durch verdünnte Essigsäure.

Das Gel wurde für 60 min mit Fixierlösung (12% Essigsäure, 50% MeOH) behandelt. Nach drei Waschschritten mit ddH₂O erfolgte eine Vorbehandlung mit 0,02%-iger Natriumthiosulfatlösung. Das Gel wurde dann für 20 min in Silberreagenz (0,075% Formaldehyd; 0,2% AgNO_3) gebracht und nach dreimaligem Waschen entwickelt ($4 \cdot 10^{-4}$ % Natriumthiosulfat; 0,05% Formaldehyd; 6% Natriumcarbonat) bis sich bräunlich-schwarze Banden zeigten. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Aufbewahrungslösung (4,6% Glycerol; 12% Essigsäure; 50% MeOH) gestoppt.

PAS (Periodic-Acid-Schiffs)-Färbung

Zum Nachweis von Glykoproteinen gibt es zahlreiche Methoden. Eine einfache Form des Durchsuchens der Probe auf mögliche Glykosylierungen einzelner Proteine ist über eine SDS-PAGE, gefolgt von einer Glykoprotein-spezifischen Färbung, möglich. Eine sehr häufig angewandte Methode ist die PAS-Färbung (Gerard, 1990). Dabei werden die Hydroxylgruppen der Zuckerreste durch Behandlung mit Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Nach Behandlung mit Schiffs-Reagenz färben sich diese Aldehyde rot. Die Färbung erreicht Nachweisgrenzen bis zu 3 µg Glykoprotein.

Für die Färbung wurden die Gele zunächst in einer Lösung aus 10% Essigsäure und 70% Methanol für 30 min fixiert. Diese wurden dann 5 min mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 60 min mit Periodlösung (1% Periodsäure, 30% Essigsäure) behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte über Nacht die Färbung mit Schiffs-Reagenz bei 4°C, unter ständigem Schütteln und Lichtausschluss. Der Hintergrund wurde bis zum Hervortreten der Banden mit ddH₂O entfärbt. Das Gel wurde nach der Dokumentation mit einer der oben aufgeführten Methoden weitergefärbt.

3.3.5 Extraktion der Peptide aus dem Gel

Die durch 2D-Elektrophorese erhaltenen Proteinspots wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus dem Gel ausgestochen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Wenn die Gele über eine Silberfärbung dokumentiert wurden, mussten die Gelstücke durch eine Lösung aus 30 mM Kaliumferricyanid und 100 mM Natriumthiosulfat entfärbt werden. Die Gelstücke wurden dann in 50%-igem Acetonitril (ACN) für 15 min, danach in ACN für 5 min und anschließend in einer Lösung aus 100 mM Ammoniumbicarbonat (BiCa) und ACN im Verhältnis 1:1 unter Schütteln gewaschen. Die Proben wurden dann unter Vakuum getrocknet.

Um die Cysteinreste zu reduzieren, mussten die Proben mit einer Lösung aus 0,01 mM DTT mit 100 mM BiCa für 45 min bei 56°C inkubiert werden. Danach erfolgte eine Behandlung mit dem Alkylierungsreagenz (55 mM IAA in 100 mM BiCa) für 30 min unter Lichtausschluss. Nach Ende der Reaktion wurde die

Lösung abgenommen und mit 100 mM BiCa für 15 min geschüttelt. Danach wurde das gleiche Volumen ACN zugegeben und weitere 15 min behandelt. Die Trocknung der Gelstücke erfolgte unter Vakuum.

Um die Proteine im Gel zu verdauen, wurde Trypsin (10 ng/µl in 50 mM BiCa) verwendet. Trypsin ist eine Endopeptidase, welche Peptidbindungen hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin spezifisch spaltet. Die Trypsinlösung wurde in 10 µl Portionen zugegeben, worauf jeweils eine 10 minütige Inkubation auf Eis folgte, solange bis die Gelstücke vollständig von der Lösung bedeckt waren. Dann wurde die Lösung entfernt und je nach Größe der Gelstücke 50 bis 200 µl einer 25 mM BiCa-Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Um die Peptide aus dem Gel zu isolieren, erfolgte eine Extraktion in 3 Schritten. Nach Abnahme der Flüssigkeit wurden die Gelstücke zuerst in je 500 µl 25 mM BiCa-Lösung für 15 min inkubiert. Dem wurden anschließend 500 µl einer Lösung aus 100 mM BiCa und ACN im Verhältnis 1:1 zugesetzt und für weitere 15 min inkubiert. Der letzte Schritt war die Behandlung mit einer Lösung aus 5%-iger Ameisensäure und ACN im Verhältnis 1:1 für wiederum 15 min. Zwischenzeitlich erfolgte eine jeweils zweiminütige Behandlung der Gelstücke im Ultraschallbad. Die Extrakte wurden nach jedem Schritt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Abschluss der Extraktion wurden die Proben bei 60°C unter Vakuum getrocknet und konnten dann zur Sequenzierung eingeschickt werden. Diese erfolgte durch Dr. Markus Piotrowski vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie an der Ruhr-Universität in Bochum.

3.4 Klonierung der cDNA eines Thaumatin-ähnlichen Proteins aus *Nepenthes*-Kannen

3.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

CTAB DNA-Extraktion

Diese Methode ist besonders für die DNA-Präparation aus Pflanzenmaterial geeignet, da hier störende Polysaccharide entfernt werden müssen. CTAB ist ein kationisches Detergenz, welches bei hoher Ionenstärke (> 0,7 M NaCl) Komplexe

mit Proteinen und Polysacchariden bildet, Nucleinsäuren dagegen nicht präzipitiert (Sambrook & Russel, 2001).

Für die DNA-Präparation wurden Kannen von *N. rafflesiana* oder *N. gracilis* mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerstoßen, mit gleichem Volumen 2x CTAB-Extraktionspuffer (2 g Cetyltrimethylammonium Bromid; 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0; 4 ml 0,5 M EDTA; 8,18 g NaCl; 1 g Polyvinylpyrrolidon Mr 40.000 (PVP-40) auf 100 ml) versetzt und bei 65°C im Wasserbad für mindestens 5 min inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung 5 min bei 8.700 rpm zentrifugiert um restliche, feste Bestandteile zu entfernen. Danach wurde das gleiche Volumen einer Chloroform/Phenol-Lösung (Verhältnis 1:1) zugegeben, die Phasen vermischt und der Ansatz bei 8.700 rpm zentrifugiert. Proteine und Polysaccharide fallen aus und sammeln sich in der Interphase an. Die Nucleinsäuren befinden sich in der wässrigen Phase. Diese wurde abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Wies der Überstand noch Verunreinigungen auf, wurde der Vorgang mit Chloroform wiederholt.

Die in der Lösung noch enthaltene RNA wurde durch RNase (Endkonzentration 1 µg/ml) für 60 min bei 37°C entfernt. Anschließend wurde die DNA mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol bei 4°C über Nacht gefällt. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation bei 4°C und 8.700 rpm für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) aufgenommen. Durch Zusatz von 200 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung und 1,2 ml Ethanol wurde die DNA für 60 min bei -20°C gefällt. Die Präzipitation erfolgte bei 4°C und 13.200 rpm für 15 min. Nach zwei Waschschrritten mit 70%-igem Ethanol wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch. Die Reinheit der Präparation wurde anhand des Verhältnisses OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt. Reine DNA liegt bei einem Wert von 1,8 vor. Werte oberhalb weisen auf RNA- oder Lösungsmittelverunreinigung hin und Werte unterhalb von 1,8 zeigen Verunreinigungen durch Proteine. Die Konzentration der DNA wurde auf 0,5 µg/µl eingestellt.

Die präparierte DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarose; 0,1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) bei 135 V für 20 bis 30 min aufgetrennt. Dabei diente TAE (40 mM Tris; 1 mM EDTA) als Laufpuffer und die Proben

wurden mit 6x Ladepuffer (30% Glycerin, Bromphenolblau) versetzt. Die Digitalisierung der Gele erfolgte auf einem UV-Transilluminator mit dem Dokumentationsprogramm (Eagle Eye™ II, Stratagene®, Amsterdam, Niederlande).

RNA-Präparation

Für die Präparation der Gesamt-RNA wurden von Kannen der Pflanze *N. gracilis* die unteren zwei Drittel (etwa 6 cm einer durchschnittlich großen Kanne von 10 cm) verwendet, in denen sich die Drüsenschicht befindet. Vor Beginn des Versuchs wurden alle verwendeten Geräte mit RNase-Zap® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Das Pflanzenmaterial wurde mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerstoßen. Dazu wurde soviel „Concert Plant RNA Reagent“ (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben, bis sich eine sämige Masse bildete. Diese wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mittels Vortexer vermischt und für 5 min bei 4°C und 2.600 x g zentrifugiert, um die Probe von unlöslichen Geweberesten abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gebracht und dazu pro 10 ml Überstand 2 ml 5 M NaCl-Lösung und 6 ml Chloroform gegeben. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und 10 min bei 4°C und 2.600 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der die Nukleinsäuren solubilisiert vorlagen, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt sollte 2 bis 3 mal wiederholt werden. Danach erfolgte durch Zugabe eines Volumens Isopropanol die Fällung der RNA bei Raumtemperatur für 10 min. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 2.600 x g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 5 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die Auftrennung wurde auf 1,5%-igen Agarosegelen durchgeführt und anschließend dokumentiert.

3.4.2 Reverse Transkription (RT)

Die aus dem Pflanzengewebe isolierte Gesamt-RNA ist nicht als Matrize in einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion) einsetzbar. Deshalb muss die sehr labile mRNA

durch ein Enzym, der reversen Transkriptase, in DNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkriptase ist aus Retroviren bekannt, die das Enzym dazu nutzen, ihr als RNA vorliegendes genetisches Material in DNA umzuschreiben, welches so in das Wirtsgenom integriert werden kann. Eine der häufigsten Methoden, um aus mRNA DNA herzustellen, nutzt das polyadenylierte 3'-mRNA-Ende. Ein Oligonukleotid, das nur aus Thyminbasen besteht, lagert sich an das Polyadenylierungsende der mRNA an und wird durch die reverse Transkriptase verlängert. DNA, die aus der „messenger“-RNA einer Zelle übersetzt wurde, wird als komplementäre DNA oder kurz cDNA bezeichnet.

Für die Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, welche mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht wurde. Nach dem Zusatz von 1 µl dNTP-Mix (10 mM, Fermentas, St. Leon-Rot) und 1 µl Oligo(dT)₂₀ Primer (50 µM, Invitrogen, Karlsruhe) wurde der Ansatz 5 min bei 65°C in der PCR-Maschine inkubiert. Danach wurden 4 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer, 1 µl 0,1 M DTT und 1 µl SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt und die Reaktion für 55 min bei 50°C durchgeführt. Die Inaktivierung erfolgte bei 70°C für 15 min. Beide Schritte erfolgten in der PCR-Maschine.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente zu vervielfältigen wird die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Dabei nutzt man thermostabile DNA-Polymerasen wie die *Taq* DNA Polymerase, aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, oder die *Pfu* DNA Polymerase, welche aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert wurde.

Die PCR-Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, in einem Standardansatz bestehend aus 1x Polymerase-Puffer, 0,2 mM dNTP-Mix und je 4 pmol/µl Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer durchgeführt. Je nach verwendeter Polymerase enthielt der Ansatz 0,025 u/µl *Taq*-Polymerase und ThermoPol Reaktionspuffer (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) bzw. 0,05 u/µl *Pfu*-Polymerase und *Pfu*-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 20 mM MgSO₄). Da die *Pfu*-Polymerase eine Korrekturlesefunktion besitzt, haben die Amplifikationsprodukte eine geringere durchschnittliche Fehlerzahl als

Produkte der *Taq*-Polymerase. Als Matrize wurden entweder 20 ng/µl genomische DNA oder 1 µl der cDNA aus der RT-Reaktion (siehe Punkt 3.4.2) eingesetzt. Sollten Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines Vektors mit einer Insertion bestimmter Größe überprüft werden, so wurden ganze Bakterienzellen in den Reaktionsansatz gegeben. Die dafür eingesetzten Oligonukleotide waren entweder für die Insertion spezifisch oder flankierten die Klonierungsstelle des Vektors.

Die Bedingungen für die hier durchgeführten PCR-Reaktionen waren abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und von der verwendeten Polymerase. Die PCR-Programme für die jeweiligen Versuche sind im Anhang 8.2 aufgelistet. Die Reaktionen wurden in den PCR-Maschinen Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) und MWG Biotech Primus (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

3.4.4 Synthese und Amplifizierungen von cDNA-Enden

Für die Amplifizierung einer Vollängen-cDNA ausgehend von einer Teilsequenz wurde die Methode der RACE- (Rapid Amplification of cDNA Ends) PCR (Frohman et al., 1988), abgewandelt im „First Choice[®] RLM-RACE Kit“ der Firma Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, UK), angewandt.

5´RACE-PCR

Um das 5´-Ende einer cDNA-Sequenz zu erhalten, wird im ersten Schritt ein cDNA-Strang ausgehend von mRNA bzw. Gesamt-RNA in einer Reversen Transkription erzeugt. Anschließend wird an das 5´-Ende der cDNA ein PolyT-Schwanz über die Terminale Desoxytransferase oder ein Oligonukleotid-Adapter in einem Ligationsansatz angebracht. Über genspezifische Oligonukleotide und ein Oligonukleotid, welches für die am 3´-Ende angehängte Sequenz spezifisch ist, wird die Sequenz zwischen Adapter und genspezifischen Primer amplifiziert.

Die „RNA Ligase mediated“- (RLM) RACE weist gegenüber der herkömmlichen RACE-PCR den Vorteil auf, dass nur cDNA-Enden von vollständigen mRNAs amplifiziert werden. Das wird dadurch erreicht, dass im ersten Schritt über das Enzym „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (CIP) alle freien 5´-Phosphate, wie

sie an ribosomaler RNA, fragmentierter mRNA, tRNA und genomischer DNA vorkommen, entfernt werden. Dafür wurden zu 1 µg Gesamt-RNA 2 µl 10x CIP-Puffer und 2 µl CIP gegeben und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37°C.

Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform gereinigt und mittels Isopropanol gefällt. Die einzelnen Schritte wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Danach wurde die CAP-Struktur von vollständigen mRNA-Molekülen abgespalten, so dass am 5'-Ende eine Monophosphatgruppe erhalten blieb. Dies erfolgte durch das Enzym „Tobacco Acid Pyrophosphatase“ (TAP). Dabei wurde das durch Isopropanol gefällte Pellet in 10 µl 1x TAP-Puffer resuspendiert. 4 µl dieses Ansatzes wurden mit 1 µl TAP versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert.

Ein 45 Nukleotide (nt) langer RNA-Adapter (5'RACE Adapter) wurde dann mittels T4 RNA Ligase an das 5'-Ende der CIP/TAP-behandelte RNA angehängt. Dies kann nicht an dephosphorylierter RNA stattfinden. Für die Reaktion wurden zu 6 µl der CIP/TAP-behandelten RNA 1 µl 5'RACE Adapter (0,3 µg/µl), 1 µl 10x RNA-Ligase-Puffer und 2 µl T4 RNA Ligase gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37°C. Diesem Schritt folgte eine Reverse Transkription. Dabei werden 2 µl ligierte RNA, 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM), 2 µl Random Decamers, 2 µl 10x RT-Puffer, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase vermischt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Nach einer Inkubation von 60 min bei 42°C folgt dann die äußere 5'RLM-RACE-PCR. Der Ansatz entspricht dem in Punkt 3.4.3 beschriebenen Standardansatz, wobei die *Taq*-Polymerase und der dafür empfohlene Puffer verwendet wurde.

3'RACE-PCR

Der „RLM-RACE Kit“ wurde ebenfalls genutzt, um das 3'-Ende einer cDNA zu ermitteln. Zuerst wurde ausgehend von Gesamt- oder mRNA eine Reverse Transkription durchgeführt, in der die cDNA über den 3'RACE-Adapter, welcher sich an den PolyA-Schwanz der mRNA anlagert, synthetisiert wird. Dazu wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM), 2 µl 3'RACE-Adapter, 2 µl 10x RT-Puffer, 1 µl RNase-Inhibitor, 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase und 8 µl nukleasefreiem Wasser versetzt und bei 42°C für 60 min inkubiert. Dem folgte die

3'RLM-RACE-PCR, wobei wiederum der unter 3.4.3 beschriebene Standardansatz und die *Taq*-Polymerase verwendet wurden.

3.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um PCR-Produkte zu reinigen, wurden diese elektrophoretisch in 1,5%-igen Agarosegelen aufgetrennt, unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Masse des Gelstücks bestimmt wurde, erfolgte die Extraktion des DNA-Fragments aus dem Gel mit dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ nach Herstellerprotokoll. Die DNA wurde mit 30 µl ddH₂O eluiert.

3.4.6 Ligations- und Klonierungsreaktionen

Mit der *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte sind an ihren 3'-Enden polyadenyliert. Deshalb müssen hier TA-Klonierungsvektoren, wie der pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe), verwendet werden, welche an den 5'-Enden überhängende Thyminreste besitzen. Im Gegensatz dazu produziert die *Pfu*-Polymerase Produkte mit glatten Enden. In diesem Fall wurde der Vektor pCR[®]4Blunt-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der ebenfalls glatte Enden aufweist.

Der Ligationsansatz enthielt 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂) und 0,5 µl Vektor (10 ng/µl). Die Inkubation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur.

3.4.7 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* - Zellen

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* - Zellen (One Shot[®] TOP10) verwendet. Zu 25 µl kompetenter Zellen wurden 2 µl Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dem folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Nach der Zugabe von 150 µl S.O.C.-Medium (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose, Invitrogen, Karlsruhe) wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Zellen auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.8 Selektion transformierter Zellen

Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte über die Kanamycinresistenz. Dafür wurden zu den Luria-Bertani (LB) -Agarplatten bzw. den Flüssigkulturen (10g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,0 ad 1.000 ml ddH₂O) 50 µg/ml Kanamycin zugegeben.

Die Vektoren verfügen neben der Kanamycinresistenz noch über das *lacZ*-Reportergen, d.h. das Vorhandensein der Insertion in der multiplen Klonierungsstelle kann über Blau-Weiß-Selektion überprüft werden. Dies erfolgt durch Zugabe von 5 µl einer 0,5 M Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung und 25 µl einer 20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside (X-Gal)-Lösung auf die Agarplatte. IPTG ist dabei ein nicht metabolisierbarer Induktor, der die Transkription des *lacZ*-Gens induziert, welches für die β-Galaktosidase kodiert. X-Gal stellt ein chromogenes nicht induzierendes Substrat für dieses Enzym dar, bei dessen Spaltung ein Farbstoff entsteht, der die Bakterienzellen blau erscheinen lässt. Weist der Vektor eine Insertion auf, so befindet sich diese innerhalb des *lacZ*-Gens. Das Translationsprodukt dieses Gens kann X-Gal nun nicht mehr metabolisieren und die daraus resultierenden Bakterienkolonien sind weiß.

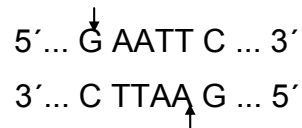
3.4.9 Plasmid-Präparation

Für die Plasmid-Präparation wurde der „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ genutzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und deren Konzentration photometrisch bestimmt.

3.4.10 Restriktionsspaltung mit *EcoR* I

Zur Überprüfung des Vektors auf Insertion wurde dieser mit dem Restriktionsendonuklease *EcoR* I gespalten. Zwei Schnittstellen für dieses Enzym flankieren links und rechts die Klonierungsstelle.

Die Schnittstelle von *EcoR* I ist wie folgt definiert:



Für den Ansatz wurden zu 2 µl Plasmid-Präparation 0,5 µl *EcoR* I (20 u/µl), 1 µl 10x NEBuffer *EcoR* I (50 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 0.025% Triton X-100) und 6,5 µl ddH₂O gegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65°C inaktiviert. Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung auf einem 1,5%-igem Agarosegel.

3.4.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Dafür wurden mindestens 1 µg Plasmid-DNA getrocknet und eingeschickt.

Die für die Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide binden an Sequenzen des Vektors, welche die multiple Klonierungsstelle auf beiden Seiten flankieren (siehe Vektorkarten im Anhang 8.4). Dabei wurde M13 reverse für die Sequenzierung des (+)-Strangs und falls notwendig T7 für die des (-)-Strangs verwendet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Lasergene 6“.

3.4.12 Bioinformatik

Für theoretische Untersuchungen von Sequenzen wurden verschiedene Programme bzw. Datenbanken verwendet.

Über Vergleiche mit bekannten, auf Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen, wurden Peptidsequenzen, die aus dem Kannensaft erhalten wurden, bestimmten Proteinen zugeordnet. Dafür wurden die Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und Fasta von EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/fasta>) verwendet. Ebenso wurden amplifizierte Nukleotidsequenzen über NCBI auf Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen untersucht.

Vergleiche bestimmter Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen untereinander erfolgten über das Internetprogramm Multalin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet, <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

Die Herstellung der Primer und die Bearbeitung von Sequenzen erfolgten über das Programm „Lasergene 6“.

Die Charakterisierung der Aminosäuresequenz bzw. die Voraussagen über bestimmte Strukturen wurden über Expasy Proteomic Tools (<http://www.expasy.ch/tools>) und Pfam (Database of protein families, Washington University St. Louis; <http://pfam.wustl.edu>) erstellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Mikroskopische Darstellung der Kannendrüsen

Da das Ziel der Arbeit die Identifizierung der Verdauungsenzyme im Kannensaft von *Nepenthes* sp. war, wurde die Anatomie der Drüsen mikroskopisch untersucht.

Die Drüsenschicht von *Nepenthes*-Kannen befindet sich an der Innenseite des Fangorgans. Sie nimmt etwa die Hälfte bis zwei Drittel der Gesamtfläche ein. Eine Kanne von *Nepenthes gracilis* wird im Durchschnitt etwa 10 cm groß, dabei entspricht der Drüsenabschnitt einer Länge von 5 bis 6 cm.

Die Drüsenschicht (DS) ist mit bloßem Auge sichtbar. In Abbildung 4.1B ist eine aufgeschnittene Kanne von *N. superbum* dargestellt. Hier ist der morphologische Unterschied des Drüsenabschnitts im Gegensatz zur restlichen Oberfläche erkennbar. Die DS erscheint grün und ist im Gegensatz zum Rest der Innenseite nicht glatt, sondern von Noppen-ähnlichen Gebilden übersät, welche unter dem Mikroskop als Drüsen identifiziert werden können.

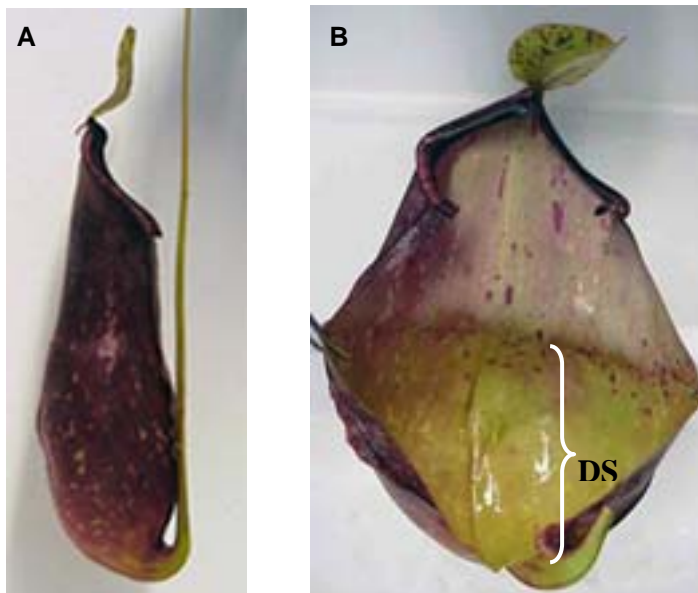


Abbildung 4.1
Kanne von *N. superbum*.

A: Eine Kanne von *N. superbum*.
B: Aufgeschnittene Kanne von *N. superbum*. Die Drüsenschicht (DS) ist schon mit bloßem Auge erkennbar. Sie befindet sich im unteren Teil der Kanne und erscheint hier gelblich-grün.

Durch zahlreiche Drüsen erscheint die Drüsenzzone unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung uneben (Abbildung 4.2). Die Drüsen befinden sich jeweils in

einer Vertiefung (VT) von 22 bis 28 μm . Der obere Bereich der Vertiefung wird durch eine Haube (H) überlagert, die im proximalen Bereich der Verdauungszone die Drüse fast vollständig und im distalen Bereich nur am Rand bedeckt (Gorb et al., 2004).

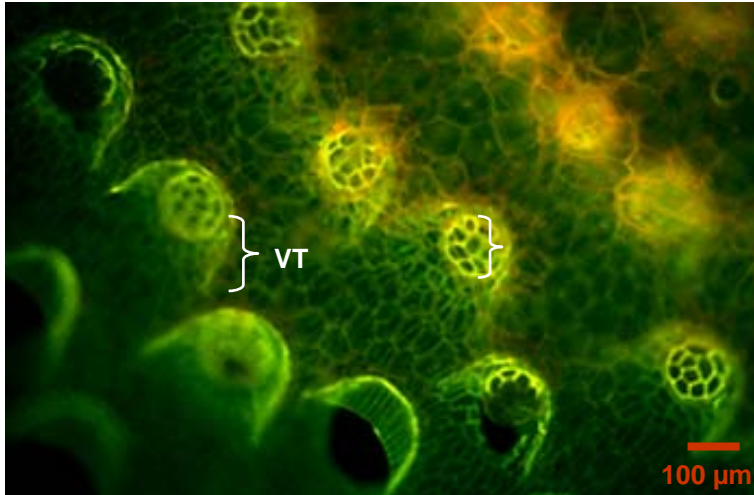


Abbildung 4.2
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der inneren Oberfläche einer Kanne von *N. rafflesiana*.

Die Drüsen (D) befinden sich im Inneren einer Vertiefung (VT), welche bis zu 28 μm tief sein kann. Die Autofluoreszenz ergibt sich wahrscheinlich durch in der Zellwand lokalisierte Phenole.

In Abbildung 4.3 sind die einzelnen Bestandteile der Drüse dargestellt. Die Aufnahmen wurden unter einem Lichtmikroskop bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung gemacht. Dabei wurde der distale Bereich der Verdauungszone einer Kanne von *N. rafflesiana* verwendet. Die Drüse befindet sich in einer Vertiefung, deren Rand von einer nach oben gewölbten Haube bedeckt wird. Diese bedeckt ebenso einen Teil der Drüse.

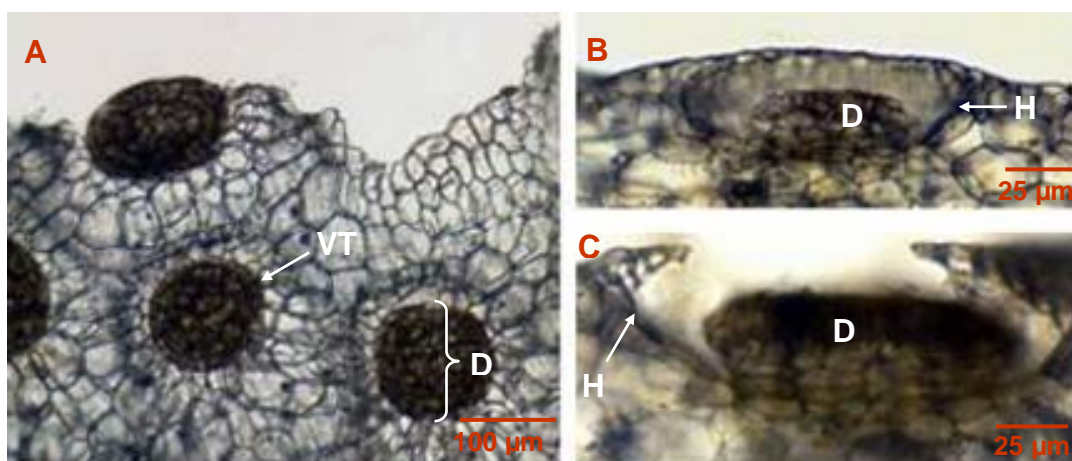


Abbildung 4.3
Drüsen einer Kanne von *N. rafflesiana*.

A: Flächenschnitt der Kanneinnenseite, 200-fache Vergrößerung.

B: Kannequerschnitt, 400-fache Vergrößerung. Im Randbereich geschnittene Drüse (D) mit umgebender Haube (H).

C: Kannequerschnitt, 400-fache Vergrößerung. Vertiefung (VT) mit Drüse und Haube.

Des Weiteren wurden Vergleichspräparate des inneren distalen Bereichs einer Kanne von *Sarracenia purpurea*, einer weiteren karnivoren Pflanze mit Gleitfallen, angefertigt. Bei *Sarracenia* ist die Expression pflanzeigener Verdauungsenzyme noch ungeklärt. Deswegen war es interessant, die Kanneninnenseite auf Drüsen zu untersuchen. Das Vorkommen von Drüsen konnte mit mikroskopischen Methoden bestätigt werden (Abbildung 4.4). Diese scheinen aber näher an der Oberfläche zu liegen, als es bei den Drüsen von *Nepenthes* der Fall ist. Unterhalb der Drüse sind zwei Zellen zu sehen, deren Zellwände ebenso wie der Drüsenkörper bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm starke Autofluoreszenz aufweisen.

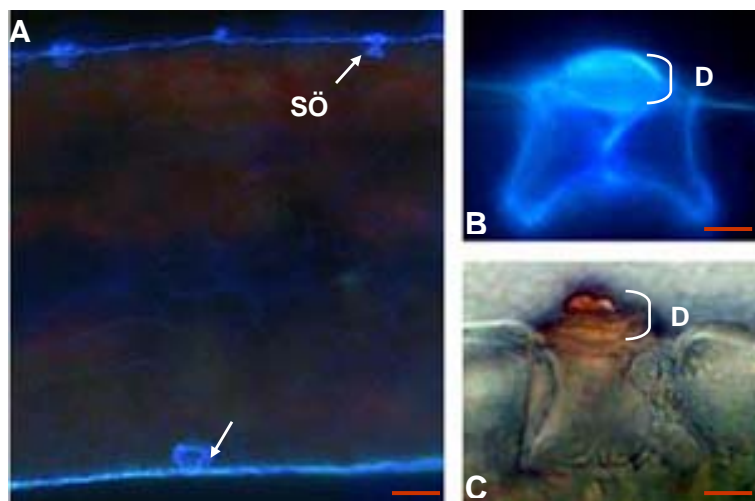


Abbildung 4.4
Innere Oberfläche einer Kanne von *S. purpurea*.

A: Kannenquerschnitt, 100-fache Vergrößerung, (Balken = 400 μm). An der Außenseite sind Spaltöffnungen (SÖ) und im inneren Bereich Drüsen (D) zu erkennen.

B: Drüsenquerschnitt, 400-fache Vergrößerung, (Balken = 50 μm). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Anregungswellenlänge 365 nm.

C: Dieselbe Drüse wie in B unter dem Lichtmikroskop, 400-fache Vergrößerung, (Balken = 50 μm).

4.2 Optimierung der 2D-Elektrophorese

Bisher gab es noch keine Angaben in der Literatur über die Auftrennung der Proteine aus *Nepenthes*-Kannen mittels 2D-Elektrophorese. Deshalb sollte diese Methode als erstes Ziel der Diplomarbeit etabliert werden.

Für eine Proteomanalyse ist eine effiziente und reproduzierbare Trennung der Proteine mittels 2D-Elektrophorese essentiell. Negativ auf die Qualität der 2D-Elektrophorese wirken sich v.a. Lipide, Nukleinsäuren, Phenole, Salze und Zucker aus. In Abbildung 4.5 sind die Parameter der einzelnen Schritte dargestellt, die optimiert und standardisiert wurden.

**Abbildung 4.5**

Wesentliche Parameter der 2D-Elektrophorese, die optimiert werden mussten.

4.2.1 Probenvorbereitung

Da die Proteine aus dem Kannensekret von *Nepenthes* untersucht wurden, spielten störende Lipide, Nukleinsäuren oder Phenole keine Rolle. Es war aber wichtig, eine Methode zu finden, die Salze und Zucker effizient aus dem Sekret entfernt. Dafür wurden zuerst PD-10 Säulen, die Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von fünf kDa zurückhalten, verwendet. Zuvor wurde das Sekret über Gefriertrocknung konzentriert, da die Proteinkonzentration maximal einen Wert von 1 µg pro Milliliter Flüssigkeit betrug. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Da die Aufreinigung über PD-10 Säulen nur zu mäßigen Ergebnissen führte, wurden andere Methoden, wie die Fällung der Proteine mit Methanol oder TCA, gewählt. Nach elektrophoretischer Auftrennung zeigte sich, dass Proben, die über PD-10 Säulen aufgereinigt oder mit Methanol gefällt wurden, noch einen sehr hohen Gehalt an Salzen aufwiesen, wohingegen dies bei der TCA-Fällung ausblieb. Da aber bei dieser Präzipitationsmethode die Proteinbanden noch unscharf erschienen, wurde eine abgewandelte Form der TCA-Fällung unter Zusatz von Aceton getestet. Diese ergab akzeptable Ergebnisse in der SDS-PAGE. In dieser wurden 40 bzw. 50 µg Protein aufgetrennt. Die Proben wurden wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben aufgetragen. Durch den Zusatz von DTT kurz vor Start der Elektrophorese konnte die Bandenstärke erhöht werden (siehe Abbildung 4.6).

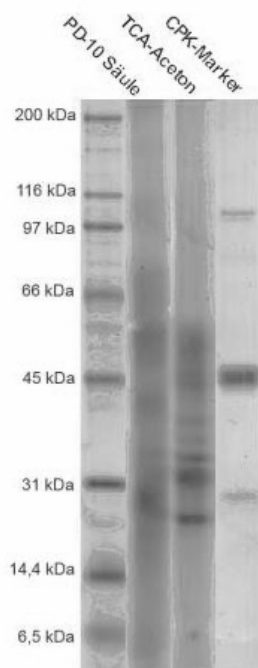


Abbildung 4.6
Überprüfung der Proteinaufreinigung auf einem Schägger/Jagow-Gel.

Es wurden Proteine, die mit TCA/Aceton gefällt wurden, mit einer Probe, deren Aufreinigung über eine PD-10 Säule erfolgte, verglichen.

- PD-10: Auftrennung von 50 µg Protein
- TCA/Aceton: 30 µg Protein

Weiter wurden 10 µg CPK-Marker aufgetragen, der später in der 2D-Elektrophorese mitgeführt werden sollte.

(Die Dokumentation erfolgte über Roti®-Blue-Färbung.)

Es wurde außerdem der „2D Clean-Up Kit“ (Amersham Bioscience, München) getestet, wobei sich dessen Resultate nicht wesentlich von denen der TCA/Aceton-Fällung unterschieden. Deshalb wurde die letzt genannte Methode für weitere Versuche verwendet.

Ein Nachteil der TCA/Aceton-Fällung ist allerdings, dass sich das Pellet sehr schlecht in Tris-Puffer lösen lässt. Nur in wenigen Fällen war es möglich, das Pellet über Nacht auf Eis zu lösen. Darum wurde das Präzipitat gleich nach der Fällung in IEF-Proben- bzw. Rehydrationspuffer resuspendiert. Dadurch konnte jedoch keine Konzentrationsbestimmung mehr durchgeführt werden, da beide Puffer von sich aus einen Farbumschlag des Bradfordreagenz bewirken.

4.2.2 Isoelektrische Fokussierung und Äquilibration

Bei Proben mit unbekannter Proteinzusammensetzung ist es notwendig für die IEF einen IPG-Streifen zu verwenden, der einen möglichst weiten pH-Bereich abdeckt. In diesem Fall wurden IPG-Streifen verwendet, welche die Proteine im Bereich pH 3-10 separieren. Oft ist es aber ratsamer, in einem engeren pH-Bereich zu arbeiten. Damit hat man zum Einen die Möglichkeit größere Proteinmengen aufzutragen um weniger abundante Proteine darzustellen und zum Anderen resultiert daraus bei gleicher Trennstrecke eine bessere Auflösung einzelner

Proteine. Aus späteren Versuchen wurde ersichtlich, dass sich die Proteinspots ausschließlich auf den sauren Bereich beschränken, so dass IPG-Streifen im Bereich pH 3-5,6 verwendet wurden (siehe Abbildungen 4.10 & 4.11).

Das Einquellen der Probelösung zusammen mit dem Rehydrationspuffer in den IPG-Streifen bewährte sich als Auftragsmethode.

Vor der Überführung des IPG-Streifens auf das SDS-Gel musste dieser mit SDS beladen, reduziert und alkyliert werden. Dabei spielte die Dauer der Äquilibration eine wesentliche Rolle. Zu Beginn der Arbeiten wurden Vorversuche durchgeführt, die nach der Anleitung des Herstellers erfolgten. Dies beinhaltete eine jeweilige Äquilibrationdauer von 15 min. Dafür wurden 10 µg des 2D-Markers CPK verwendet. Auf dem SDS-Gel waren auf diesem nach der Silberfärbung Proteinspots zu sehen (siehe Abbildung 4.7).

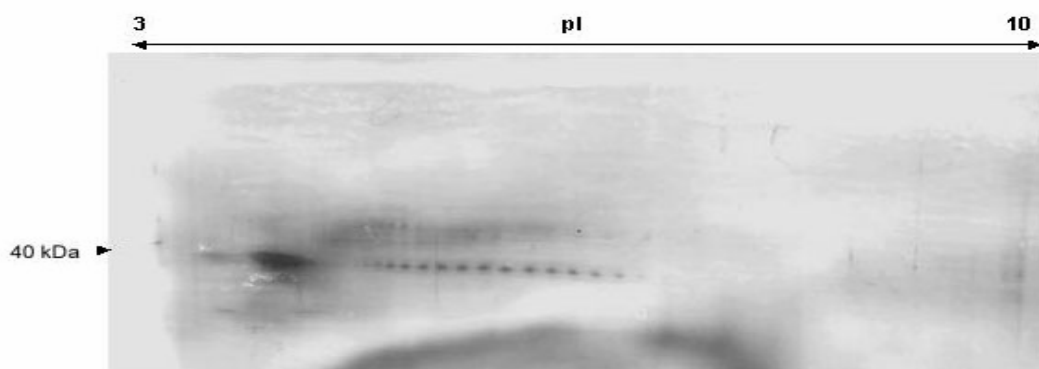


Abbildung 4.7
Darstellung des CPK 2D-Markers nach einer 2D-Elektrophorese.

10 µg CPK wurden über einen IPG-Streifen des pH-Bereichs 3-10 aufgetrennt. Die nachfolgende SDS-PAGE erfolgte auf einem ExcelGel SDS Gradient 8-18.

(Die Dokumentation erfolgte über Silberfärbung.)

Das gleiche Protokoll wurde dann auch auf die Kannensekretproteine angewandt. Allerdings konnten damit keine Proteinspots detektiert werden. Erst durch Erhöhung der Äquilibrationdauer auf jeweils 45 min konnten Ergebnisse, wie in Abbildung 4.8 dargestellt, erzielt werden.

4.2.3 SDS-PAGE

Um eine hohe Reproduzierbarkeit der SDS-Gele zu gewährleisten, wurden anfangs ExcelGel SDS Gradient 8-18 Gele der Firma Amersham verwendet.

Allerdings konnten mit diesen keine einzelnen Proteinspots identifiziert werden. Daraufhin wurden Laemmli-Gele getestet. In den Abbildungen 4.8 und 4.9 sind die Auftrennungen von jeweils 150 µg Protein, welches vorgereinigt und einer IEF im pH-Bereich 3-10 unterzogen wurde, über die verschiedenen SDS-Gele dargestellt. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Auftrennung besser über Laemmli-Gele bewerkstelligen lässt. Die Unschärfe der Proteinspots ergab sich, wie sich später herausstellte, aus der Probenvorbereitung (siehe Abschnitt 4.2.1). Bei weiteren Experimenten wurden deshalb ausschließlich 10%-ige Laemmli-Gele verwendet.

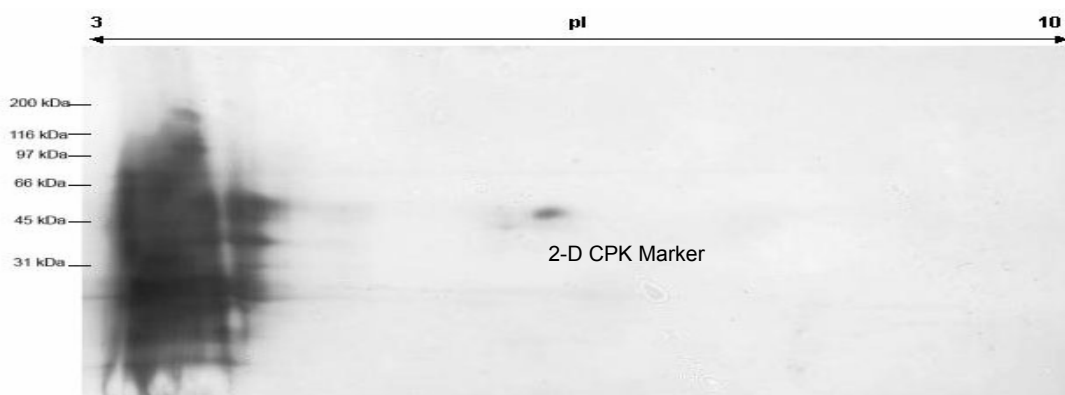


Abbildung 4.8

Auftrennung der durch IPG-Streifen (pH 3-10) separierten Kannensaftproteine (150 µg) über ein ExcelGel.

(Die Dokumentation erfolgte über Silberfärbung.)

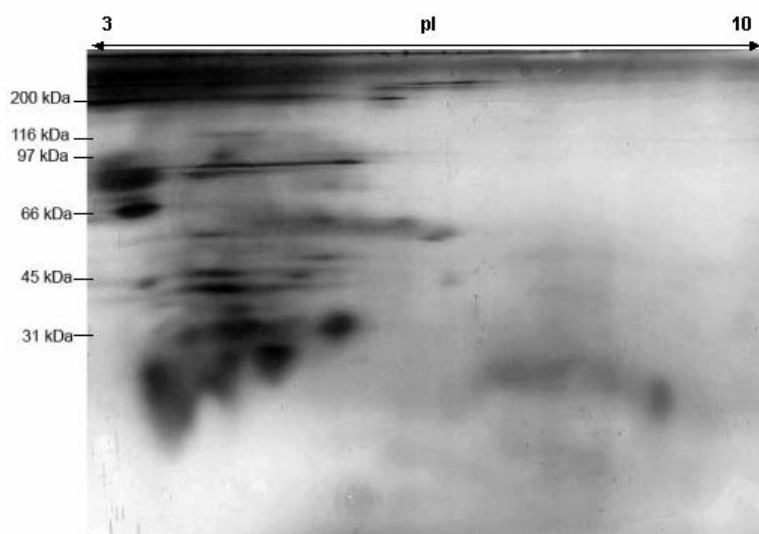


Abbildung 4.9

Auftrennung der durch IPG-Streifen (pH 3-10) separierten Kannensaftproteine (150 µg) über ein 10%-iges Laemmli-Gel.

(Die Dokumentation erfolgte über Silberfärbung.)

Die Durchführung lässt sich wie folgt zusammenfassen: Für die Proteinaufreinigung waren die TCA/Aceton-Fällung bzw. die Präzipitation über den „2-D Clean Up Kit“ am besten geeignet. Die Proben wurden mit dem Rehydrationspuffer in den IPG-Streifen eingequollen. Durch die IEF unter Nutzung eines IPG-Streifens pH 3-10 wurde das Auftreten von Proteinen mit einem pI ausschließlich im sauren Bereich festgestellt. Damit konnte durch die Verwendung eines IPG-Streifens des pH-Bereichs 3-5,6 eine Verbesserung der Auftrennung einzelner Proteine erreicht werden (siehe Abbildungen 4.10 & 4.11). Für die zweite Dimension führten 10%-ige Laemmli-Gele zu den besten Ergebnissen.

4.3 Detektion der Sekretproteine aus dem Kannensaft

Über die in Punkt 4.2 dargestellte Optimierung der 2D-Elektrophorese konnten, unter Verwendung der sterilen Flüssigkeit geschlossener Kannen, die in den Abbildungen 4.10 und 4.11 gezeigten 2D-Gele erhalten werden. Dabei ist der Unterschied der Proteinauftrennung unter Verwendung von IPG-Streifen des pH-Bereichs 3-10 und 3-5,6 zu erkennen. Über den IPG-Streifen, der einen kleineren pH-Bereich abdeckt, ist eine Erhöhung der Anzahl der Proteinspots zu verzeichnen.

Die in den Abbildungen 4.10 und 4.11 markierten Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut (siehe Punkt 3.3.5). Die resultierenden Peptidmischungen wurden mittels TOF-MS/MS analysiert.

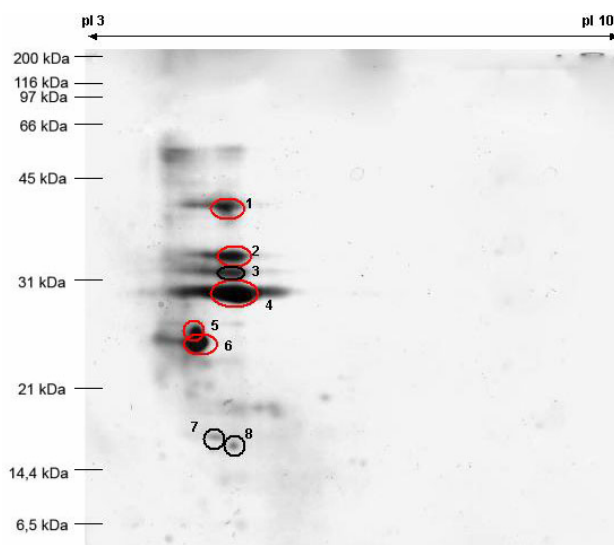


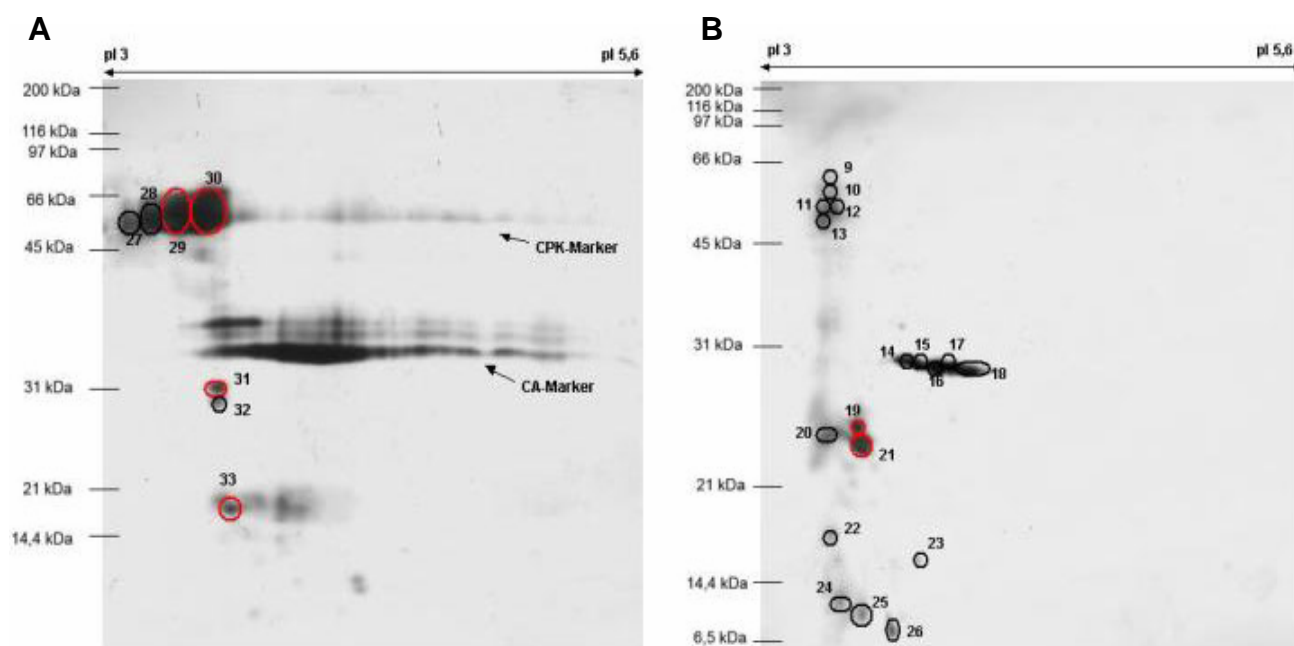
Abbildung 4.10

Darstellung der über die 2D-Elektrophorese aufgetrennten Kannensaftproteine.

200 µg Protein aus dem Sekret geschlossener Kannen wurden über eine IEF im pH-Bereich 3-10 separiert und über SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Alle markierten Proteinspots wurden aus dem Gel extrahiert und über TOF-MS/MS analysiert. Dabei konnten aus rot markierten Proteinspots Peptidsequenzen erhalten werden.

(Die Dokumentation erfolgte über Silberfärbung.)

**Abbildung 4.11**

Auftrennung zweier Proteinproben aus dem Sekret geschlossener Kannen über SDS-PAGE, die vorher durch eine IEF (pH-Bereich 3-5,6) separiert wurden.

A und **B** zeigen die Auftrennungen von jeweils 200 µg Protein aus geschlossenen Kannen, wobei für die IEF IPG-Streifen mit pH-Bereich 3-5,6 verwendet wurden.

Alle markierten Proteinspots wurden aus dem Gel extrahiert und über TOF-MS/MS analysiert. Dabei konnten aus rot markierten Proteinspots Peptidsequenzen erhalten werden.

(Die Dokumentation erfolgte über Silberfärbung.)

In den rot markierten Proteinspots konnten Peptidsequenzen gefunden werden. Insgesamt wurden 19 verschiedene Sequenzen dokumentiert, wobei oftmals mehrere Peptidsequenzen aus einem einzelnen Proteinspot isoliert wurden. Dies war vor allem bei Proteinproben der Fall, die über IPG-Streifen des pH-Bereichs 3-10 aufgetrennt wurden.

In Tabelle 4.1 sind die Molekulargewichte der einzelnen Spots dargestellt, in denen Peptidsequenzen detektiert werden konnten.

Tabelle 4.1

Übersicht der Molekulargewichte von Proteinspots, aus denen Peptidsequenzen dokumentiert werden konnten.

Proteinspot-Nr.	Molekulargewicht	Proteinspot-Nr.	Molekulargewicht
1	40 kDa	21	23 kDa
2	37 kDa	29	50 kDa
4	30 kDa	30	50 kDa
5	26 kDa	31	31 kDa
6	23 kDa	33	18 kDa
19	24 kDa		

Diese wurden über Datenbanken mit anderen Proteinsequenzen verglichen und konnten teilweise bekannten Proteinen zugeordnet werden (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2
Übersicht der erhaltenen Peptidsequenzen.

Gezeigt sind die Peptidsequenzen mit dem zugehörigem Proteinspot. Weiterhin sind Accession-No., Proteinname und die zugehörige Art, in der dieses identifiziert wurde, gezeigt. Diese wurden durch Datenbankvergleiche (NCBI & Fasta) erhalten und wiesen die größte Ähnlichkeit zu der jeweiligen Peptidsequenz auf.

Proteinspot-Nr.	Peptidsequenz	Protein	Art	Accession-No.
29, 30	GPLSLPSQMDVTK	Nepenthesin-I	<i>Nepenthes gracilis</i>	Q766C3
29	GPLSLPSQFDVTK	Nepenthesin-I	<i>Nepenthes gracilis</i>	Q766C3
29	GPLSLPSQLDVTK	Nepenthesin-I	<i>Nepenthes gracilis</i>	Q766C3
6, 21	DDATSTYTCPPG	Osmotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	P14170
5, 6, 19, 21, 31	APGGCNNPCTVFK	osmotin like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P50700
31	TSTYTC	putative thaumatin-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB80531
33	HQQEFLDTHNAAR	PR-1C	<i>Nicotiana tabacum</i>	P09042
2	YVAVGNEIRPN	putative Glucanase	<i>Drosera rotundifolia</i>	AAT44730
1, 2	TYNNNLIQNVK	putative Glucanase	<i>Drosera rotundifolia</i>	AAT44730
6, 21	NLCP	Endoglucanase V	<i>Hypocrea jecorina (Pilz)</i>	P43317
1	FAYCLTSK	OSJNBa0064H22.10	<i>Oryza sativa</i>	XP_462658
4	SWDEALNELPSCSNK	At1g52750/F14G24_2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAN28874
4	DLSYDDCKK	hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM15373
1, 4	NLVWYDNCLLK	hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q84UG5
4	WDLSYDDCQK	hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM15373
4	WDLSYDDYPR	hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM15373
2, 4	TGDFQPR	hypothetisches Protein	<i>Oryza sativa</i>	AP005295
4	EAYNTLQGDGSR	bisher unbekanntes Protein	-	-
2, 4	WVFFQDCQTCVAEAK	bisher unbekanntes Protein	-	-

4.4 Detektion von Glykoproteinen in der Kannenflüssigkeit

Da es sich bei den in der Kannenflüssigkeit vorkommenden Proteinen um Sekretproteine handelt, lag der Verdacht nahe, dass diese glykosyliert sind. Deshalb wurde eine Methode angewandt, mit der sich auf einfache Weise Glykoproteine nachweisen lassen. Es wurde eine SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow (1987) durchgeführt und das Gel anschließend über eine PAS-Färbung dokumentiert. Dabei wurden 100, 120 und 150 µg Protein aus geschlossenen Kannen aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden 50 µg Peroxidase mitgeführt. Bei vorliegender Glykosylierung waren rosa Banden zu sehen sein (Abbildung 4.12).

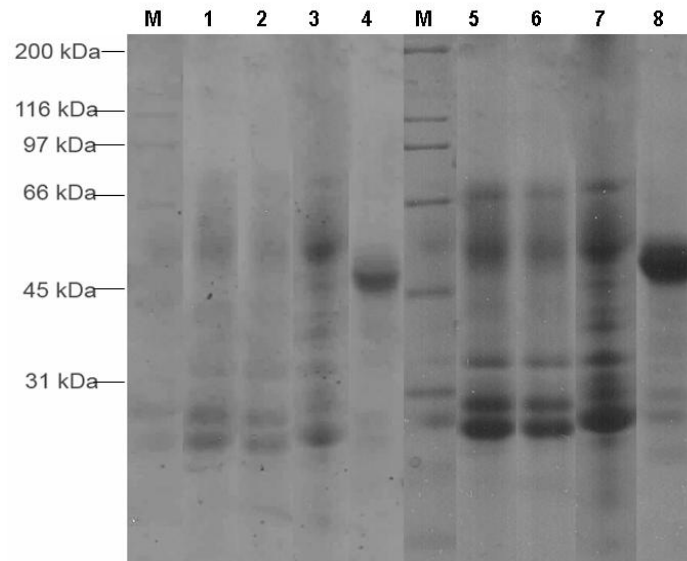


Abbildung 4.12
Detektion von Glykoproteinen über PAS-Färbung.

Links ist die Detektion über die PAS-Färbung zu sehen. Im rechten Bild ist das gleiche SDS-Gel nach zusätzlicher Färbung mit Roti[®]-Blue dargestellt.

In Spur 1 und 5 wurden 120, in Spur 2 und 6 100 und in Spur 3 und 7 150 µg Protein aufgetragen. Dabei konnten maximal 10 Proteinbanden über die PAS- (Spuren 1 bis 4) und die Roti[®]-Blue-Färbung (Spuren 5-8) dokumentiert werden. In Spur 4 bzw. 8 wurde die Peroxidase (Positivkontrolle) aufgetragen.

Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung wurden die Gele in Grau-Tönen dargestellt.

Über die PAS-Färbung konnte bestätigt werden, dass es sich bei den vorliegenden 10 Proteinbanden um Glykoproteine handelt. Die Unschärfe der Banden ist typisch für Glykoproteine.

4.5 Isolierung einer cDNA eines Thaumatin-ähnlichen Proteins (TLP) aus *Nepenthes gracilis*

Ausgehend von den in Tabelle 4.2 dargestellten Peptidsequenzen sollten nun unter Verwendung der PCR-Methode cDNA-Sequenzen ermittelt werden. Da schon seit Längerem das Vorhandensein hydrolytischer Enzyme dokumentiert wurde, jedoch das Vorkommen von Pathogenesis-related- (PR) Proteinen, wie PR-1C und Thaumatin-ähnliche Proteine (TLP), noch nicht beschrieben wurde, konzentrierte ich mich vorerst auf die Amplifizierung der Sequenz eines TLPs.

4.5.1 Entwicklung geeigneter Oligonukleotide

War die cDNA-Sequenz bzw. eine Teilsequenz bekannt, so konnte mit dem Programm „Lasergene 6, Primerselect“ die optimale Position der Oligonukleotide ermittelt und deren einzelne Parameter, wie Schmelztemperatur, Dimer- und Sekundärstrukturbildung, überprüft werden.

Um den Verlauf der PCR-Reaktionen und die Funktionalität der einzelnen Komponenten zu überprüfen, wurden Oligonukleotide für eine Positivkontrolle angefertigt. Dazu wurde die aus *N. gracilis* isolierte cDNA-Sequenz von Nepenthesin I (Athauda et al., 2004) herangezogen und von deren Sequenz spezifische Oligonukleotide abgeleitet. Dabei entstanden die Oligonukleotide Nep1_forwb und Nep1_revb. Nep1_forwa und Nep1_reva wurden mit geringfügigen Abweichungen aus der Veröffentlichung von Athauda et al. (2004) übernommen.

Schwieriger war es, auf der Grundlage einzelner Peptidsequenzen degenerierte Oligonukleotide zu kreieren. Hierzu wurden die Peptidsequenzen n-DDATSTYTCPPG-c und n-APGGCNPCTVFK-c aus Spot 6 bzw. 21 bei 23 kDa verwendet (siehe Tabelle 4.2; Abbildung 4.10 & 4.11). Diese ergaben bei der Durchmusterung von Datenbanken (NCBI und Fasta) hohe Ähnlichkeiten zu Thaumatin, Osmotin oder ähnlichen Proteinen. Die Sequenzen aus bekannten Proteinen wurden für weitere Sequenzvergleiche herangezogen.

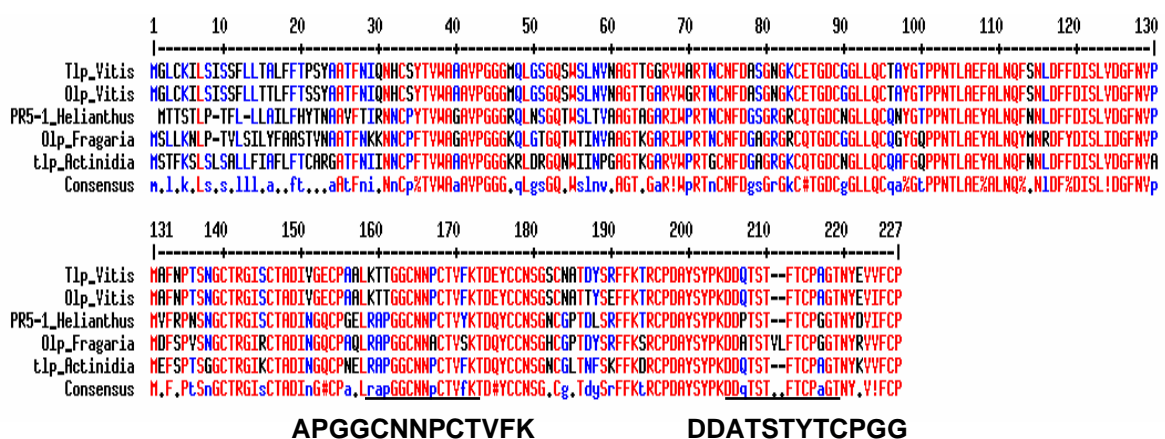


Abbildung 4.13
Sequenzvergleich von Thaumatin-, Olp- und Tlp-Proteinsequenzen.

Es wurden fünf verschiedene Proteinsequenzen verglichen. Peptidsequenzen, die im Kannensekret gefunden wurden, waren ähnlich bis identisch zu Bereichen der bekannten Sequenzen (unterstrichene Bereiche). Rote Bereiche zeigen konservierte, blaue teilweise und schwarze nicht konservierte Aminosäurereste an.

(Legende: Tlp_Vitis = Tlp aus *Vitis vinifera*, Olp_Vitis = Olp aus *Vitis vinifera*, PR5-1_Helianthus = PR5-1 Protein aus *Helianthus annuus*, Olp_Fragaria = Olp aus *Fragaria ananassa*, tlp_Actinidia = Tlp aus *Actinidia deliciosa*, (Legende: Tlp = Thaumatin-like protein, Olp = Osmotin-like protein, PR5-1 = Pathogenesis related protein 5-1).

Dabei erfolgte ein Vergleich mit fünf bekannten Proteinsequenzen, in denen die ermittelten Peptidsequenzen aus den Kannensaftproteinen teilweise oder vollständig wiedergefunden werden konnten (siehe Abbildung 4.13).

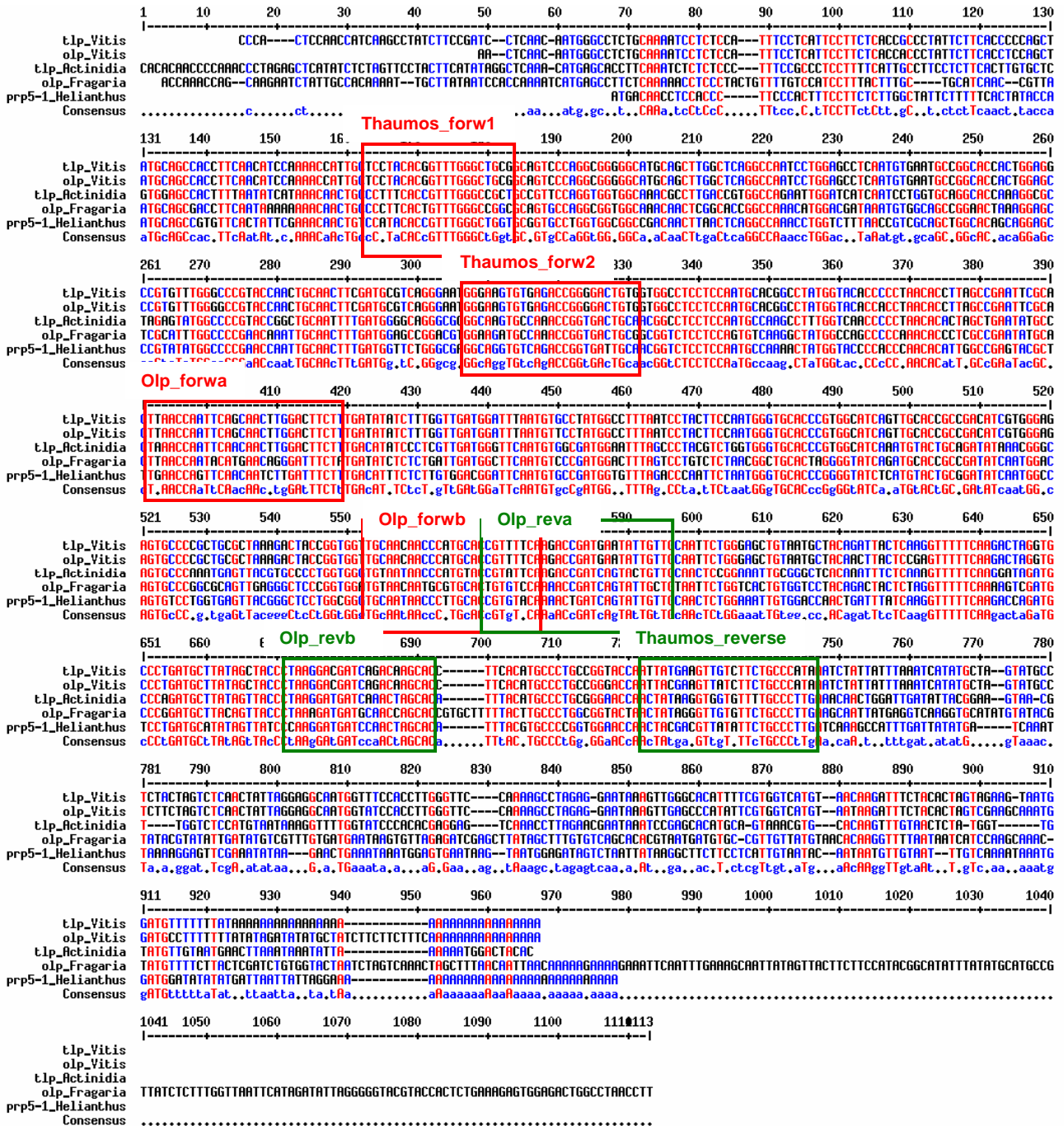


Abbildung 4.14
Vergleich der cDNA-Sequenz von Thaumatin-, Olp- und Tlp-Proteinen.

Es wurden fünf verschiedene cDNA-Sequenzen verglichen. Dabei sind Bereiche, von denen die Oligonukleotide abgeleitet wurden, markiert. Vorwärtsprimer wurden rot und Rückwärtsprimer grün gekennzeichnet. Rote Bereiche zeigen konservierte, blaue teilweise und schwarze nicht konservierte Aminosäurereste an.

(Legende: tlp_Vitis = Tlp aus *Vitis vinifera*, olp_Vitis = Olp aus *Vitis vinifera*, prp5-1_Helianthus = PR5-1 Protein aus *Helianthus annuus*, olp_Fragaria = Olp aus *Fragaria ananassa*, tlp_Actinidia = Tlp aus *Actinidia deliciosa*, tlp = Thaumatin-like protein, olp = Osmotin-like protein, prp5-1 = Pathogenesis related protein 5-1).

Mit diesen fünf Proteinen erfolgte ebenfalls ein Sequenzvergleich auf cDNA-Ebene. Anhand dieses Sequenzvergleiches wurden Oligonukleotide kreiert, die von stark oder zumindest teilweise konservierten Regionen abgeleitet wurden (siehe Abbildung 4.14). Die ermittelten Peptidsequenzen konnten zum Teil solchen Regionen zugeordnet werden. So waren die Oligonukleotide teilweise identisch mit den Peptidsequenzen, *Olp_revb* mit TDATSTYTCPGG und *Olp_forwa* und *Olp_reva* mit APGGC~~NNP~~CTVFK. Die so entwickelten Oligonukleotide sind unter 3.1.4 aufgeführt.

4.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Aus Kanten von *N. gracilis* konnte nach der unter Punkt 3.4.1 beschriebenen Methode die Gesamt-RNA mit guten Resultaten präpariert werden. Ebenso gelang es mit dem CTAB DNA-Extraktionprotokoll (Punkt 3.4.1) die genomische DNA aus Kanten von *N. rafflesiana* und *N. gracilis* zu isolieren (siehe Abbildung 4.15). Die Gesamt-RNA, welche durch reverse Transkription in cDNA übersetzt wurde, wie auch die genomische DNA dienten als Matrizen in den späteren PCR-Reaktionen.

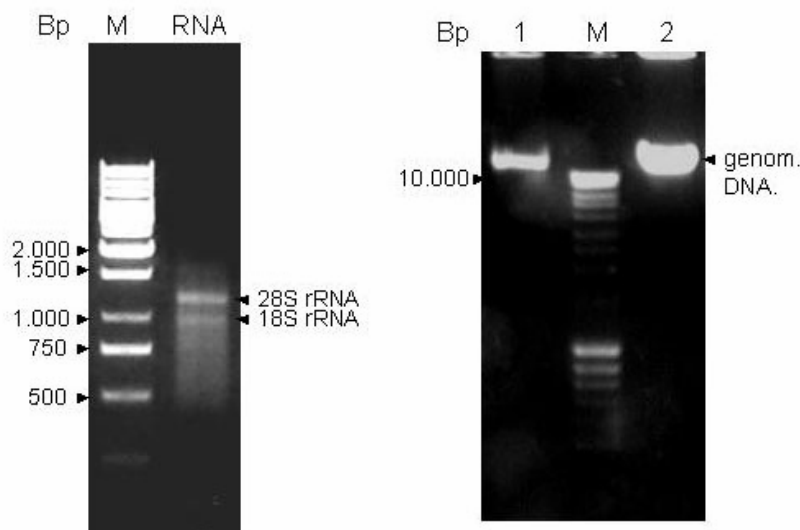


Abbildung 4.15

Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA und genomischer DNA.

Im linken Bild wurden 5 µl einer Gesamt-RNA-Probe (120 µg/ml) aufgetragen. Zu sehen sind zwei Banden, welchen der 28S bzw. 18S rRNA zugeordnet werden können.

Das Bild rechts zeigt elektrophoretisch aufgetrennte genomische DNA von *N. gracilis* (Spur 1) und *N. rafflesiana* (Spur 2). Es wurden jeweils 5 µl Probe aufgetragen, wobei die Konzentration in Spur 1 500 µg/ml und in Spur 2 950 µg/ml beträgt. Die Banden befinden sich oberhalb von 10.000 Bp.

M: links, 100 bp Marker (Biolabs NE); rechts, 1 kb Marker (Fermentas).

4.5.3 Amplifizierungen von Teilsequenzen einer *tlp*-cDNA-Sequenz

Alle angegebenen PCR-Programme sind im Anhang 8.2 aufgelistet. Hier nicht aufgeführte Sequenzvergleiche, die auf der öffentlich zugänglichen Internetseite von „MultAlin“ (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) ermittelt wurden, befinden sich im Anhang 8.3.

Um die für die Positivkontrolle kreierten Oligonukleotide zu überprüfen, wurden diese wie folgt kombiniert:

- Ansatz 1: Nep1_forwa/Nep1_revb
- Ansatz 2: Nep1_forwa/Nep1_reva
- Ansatz 3: Nep1_forwb/Nep1_reva

Dabei waren für Ansätze 1 ein 847 bp, 2 ein 435 bp und 3 ein 444 bp großes Fragment zu erwarten. Dies konnte in einer PCR mit dem Programm PCR 1 unter Verwendung von cDNA bzw. genomischer DNA bestätigt werden. Jedoch war die Konzentration des Amplifikats von Ansatz 1 so gering, dass nur Ansatz 2 und 3 als Positivkontrollen Verwendung fanden. Die elektrophoretische Auftrennung des jeweiligen Amplifikates ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

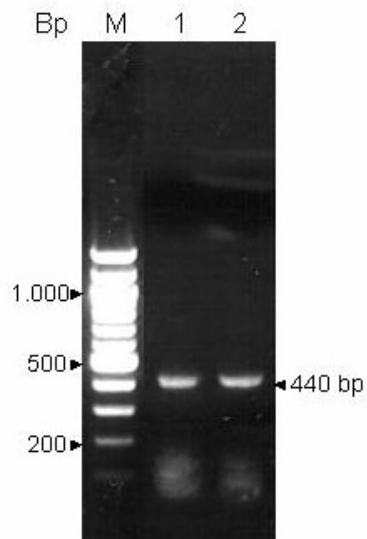


Abbildung 4.16
Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte für die Positivkontrolle.

1: PCR-Produkt aus den Oligonukleotiden Nep1_forwa/Nep1_revb. Das Produkt hat eine Größe von 435 bp.

2: PCR-Produkt aus den Oligonukleotiden Nep1_forwb/Nep1_reva. Das Amplifikat hat eine Größe von 444 bp.

M: 100 bp Marker (Biolabs NE).

Um eine Teilsequenz der *tlp*-cDNA zu erhalten, wurden zunächst die degenerierten Oligonukleotide *Olp_forwa*, *Olp_forwb*, *Olp_reva* und *Olp_revb* angefertigt. Aus dem in Abbildung 4.14 dargestellten Sequenzvergleich konnte bei

bestimmter Oligonukleotidkombination die zu erwartenden Fragmentgröße bestimmt werden. So war für die Kombination von Olp_forwa/Olp_reva ein 207 bp, für Olp_forwa/Olp_revb ein 301 bp und für Olp_forwb/Olp_reva ein 140 bp großes Fragment zu erwarten.

Von den drei verschiedenen Ansätzen wurden PCR-Reaktionen unter Verwendung von Programm PCR 2 und variablen Anlagerungstemperaturen von 55 bis 60°C im Abstand von 1°C angefertigt. Dabei konnten allerdings keine der zu erwartenden Produkte detektiert werden.

Deshalb wurden anhand des oben erwähnten Sequenzvergleiches (Abbildung 4.14) drei weitere degenerierte Oligonukleotide hergestellt, wobei es sich um zwei Vorwärts- (Thaumos_forw1 und Thaumos_forw2) und einen Rückwärtsprimer (Thaumos_reverse) handelte. Thaumos_reverse wurde zum Einen mit Thaumos_forw1 kombiniert, wobei unter Verwendung des Programms PCR 3 ein Fragment von 596 bp amplifiziert werden konnte. Zum Anderen wurde das Oligonukleotid mit Thaumos_forw2 verwendet und mit dem Programm PCR 4 ein 424 bp großes Amplifikat erhalten. Bei beiden Reaktionen wurde cDNA als Matrize verwendet. Die Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 4.17) und anschließend aus dem Gel isoliert.

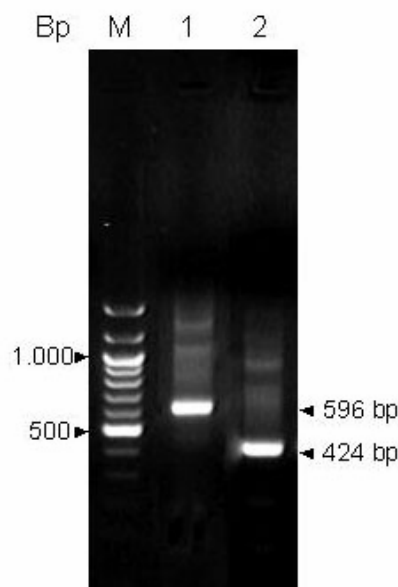


Abbildung 4.17
Elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten *tIp*-Teilsequenzen.

1: Das 596 bp große Produkt der PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden Thaumos_forw1/Thaumos_reverse.
2: Das 424 bp große Fragment der Reaktion mit Thaumos_forw2/Thaumos_reverse.
M: 100 bp Marker (Biolabs NE).

Das aufgereinigte Amplifikationsprodukt wurde in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Die dabei

erhaltenen Kolonien wurden entweder durch Blau-Weiß-Selektion oder über eine Kolonie-PCR unter Verwendung des Programms PCR 5 und den Oligonukleotiden M13 reverse und T7 auf eine Insertion geprüft. Aus einem positiven Klon wurde dann die Plasmid-DNA isoliert. Durch eine Restriktionsspaltung mit dem Enzym *EcoR* I erfolgte nochmals eine Prüfung auf das klonierte Fragment. War dieses vorhanden, konnte es sequenziert werden.

Die erhaltene Sequenz wurde in der öffentlich zugänglichen Datenbank NCBI auf Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzen überprüft. Es konnte bestätigt werden, dass es sich bei den vorliegenden Fragmenten um *t1p*-Teilsequenzen handelt. Beide Sequenzen sind bis auf einen Überhang des größeren Produktes von 172 bp identisch.

4.5.4 Vervollständigung der *t1p*-cDNA-Sequenz

Um eine Vollängen-cDNA-Sequenz zu isolieren, wurden ausgehend von der unter Punkt 4.5.3 ermittelten 596 bp großen DNA-Sequenz nun genspezifische Oligonukleotide für die 5'RACE- bzw. die 3'RACE-PCR abgeleitet. Dabei entstanden für die 5'RACE zwei Rückwärts- und für die 3'RACE drei Vorwärtsprimer. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass ein überlappender Bereich von 134 bp entstand.

In Abbildung 4.18 ist die Strategie der Methode mit den verwendeten Oligonukleotiden dargestellt.

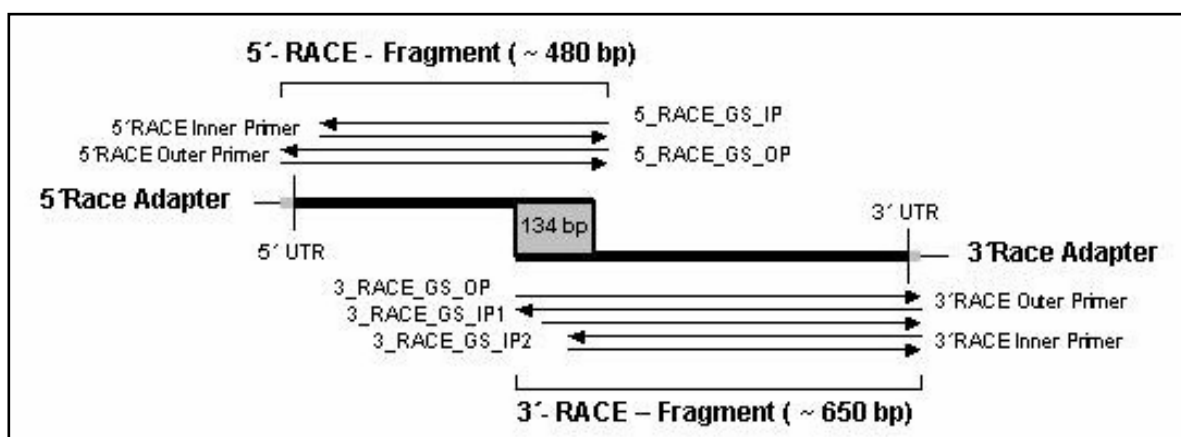


Abbildung 4.18
Prinzip der durchgeführten RACE-PCR und die verwendeten Oligonukleotide.

Die schwarzen Bereiche stellen die in der RACE-PCR zu erwartenden Fragmente dar. Die genspezifischen Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie innerhalb der Teilsequenz in einem Bereich von 134 bp überlappen.

Um das 5'-Ende der *tlp*-cDNA zu erhalten, wurde wie unter Punkt 3.4.4 beschrieben eine Gesamt-RNA-Probe zuerst mit den Enzymen CIP und TAP behandelt. An die 5'-Monophosphate der mRNA-Moleküle wurde im darauffolgenden Schritt der 5'RACE Adapter ligiert. Mithilfe von „Random Decamers“ und der reversen Transkriptase wurde die mRNA dann in cDNA übersetzt. Dem folgte eine 5'RLM-RACE mit 5'RACE Outer Primer, welcher spezifisch für den Adapter ist, und dem 5_RACE_GS_OP, wobei es sich um einen genspezifischen Rückwärtsprimer handelt, nach dem Programm PCR 6. Dieser Ansatz führte jedoch zu keinem detektierbaren Produkt. Jedoch wurde mit diesem Ansatz eine Nested-PCR mit 5'RACE Inner Primer und 5_RACE_GS_IP durchgeführt und es konnte ein Produkt von ungefähr 510 bp Größe amplifiziert werden (siehe Abbildung 4.19).

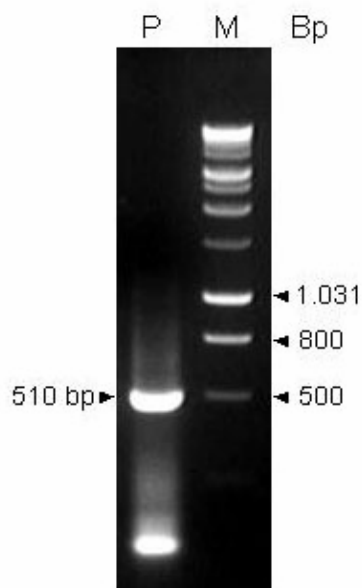


Abbildung 4.19
Agarosegelelektrophoretische Auftrennung des 5'RACE-Produkts.

P: Amplifikat der 5'-RACE., M: 1 kb Marker (Fermentas).

Das PCR-Produkt wurde wiederum aus dem Gel isoliert, in den TA-Vektor pCR[®] 4-TOPO[®] ligiert, in *E. coli* TOP10 Zellen kloniert und nach Überprüfung auf die Insertion sequenziert. Die erhaltene Sequenz konnte über Datenbankvergleiche als 5'-Ende einer *tlp*-cDNA-Sequenz identifiziert werden.

In Abbildung 4.20 ist der Vergleich des 5'RACE-Produktes mit der Teilsequenz und die daraus resultierende Aminosäuresequenz angegeben. Das Fragment überlappt in 321 bp mit der Teilsequenz. Dieser Bereich ist in der Abbildung 4.20 grau unterlegt.

AS-Sequenz		M S R F I K
5'-RACE	ATCCATCATTCCACTTTTCGCAAAGAAAAAAAAACAATG	AACCGATTCCATAA
AS-Sequenz		F I V F P S L L L A L L S I S I
5'-RACE	AATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCTTATTGTCAATATCCATC	
AS-Sequenz		D A A T F D I V N N C G Y L V W A
5'-RACE	GATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGG	CTATACGGTCTGGGC
<i>tlp</i> -Teilsequenz		CTATACGGTCTGGGC
AS-Sequenz		A A S P G G G Q Q L N P G Q T W T
5'-RACE	AGCTGCCTCACCGGGCGGTGGCCAACAATTGGACCCAGGTCAGACTTGGA	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		AGCTGCCTCACCGGGCGGTGGCCAACAATTGGACCCAGGTCAGACTTGGA
AS-Sequenz		I N V N A G Q T G G R V W A R T
5'-RACE	CCATAAATGTTAATGCGGGCCAAACAGGTGGTCGTGTTTGGGCGGAACT	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		CCATAAATGTTAATGCGGGCCAAACAGGTGGTCGTGTTTGGGCACGAACT
AS-Sequenz		G C S L S G S N G A S C E S G D C
5'-RACE	GGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAACGGGGCAAGCTGCCAATCTGGTGACTG	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		ATGTGCAATCTTTCCGGATCAAACGGGGCAAGCTGCCAATCTGGTGACTG
AS-Sequenz		G G L L Q C Q G Y G S P P N T L A
5'-RACE	CGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCCCCTCCTAACACTTTGG	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		CGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCCCCTCCTAACACTTTGG
AS-Sequenz		E Y S L N Q Y N N L D F F D M S
5'-RACE	CTGAGTATTCATTGAACCAGTACAACAACCTGGACTTCTTTGACATGTCA	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		CTGAGTATTCATTGAACCAGTACAACAACCTGGACTTCTTTGACATGTCA
AS-Sequenz		L V N G F N V P M S F L P T S N G
5'-RACE	CTTGTTGATGGGTTTAATGTCCAATGTCTTTCTCCCAACATCTAATGG	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		CTTGTTGATGGGTTTAATGTCCAATGTCTTTCTCCCAACATCTAATGG
AS-Sequenz		C
5'-RACE	CTGCAC	
<i>tlp</i> -Teilsequenz		CTGCAC

Abbildung 4.20**Vergleich des 5'-RACE-Fragmentes mit der Teilsequenz.**

Gezeigt ist die komplette Sequenz des ermittelten 5'-Endes und der mit der Teilsequenz überlappende Bereich (grau unterlegt). Des Weiteren sind das Startcodon und die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

Zur Vervollständigung des 3'-Endes erfolgte zuerst die Synthese der cDNA. Dabei diente der 3'RACE Adapter als Startpunkt für die reverse Transkriptase. In den darauffolgenden PCR-Reaktionen nach dem Programm PCR 7 wurde der Rückwärtsprimer 3'RACE Outer Primer entweder mit dem Vorwärtsprimer 3_RACE_GS_OP oder 3_RACE_GS_IP1 kombiniert. Dadurch konnten zwei verschieden große Produkte amplifiziert werden (siehe Abbildung 4.21).

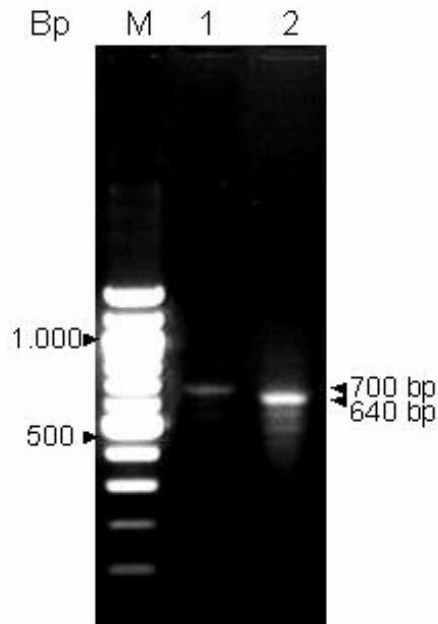


Abbildung 4.21
Elektrophoretische Auftrennung der 3'RACE-PCR-Produkte.

1: 700 bp Amplifikat, erhalten durch die Kombination des 3'RACE Outer Primer mit 3_RACE_GS_OP.
 2: 640 bp großes Fragment, erhalten durch die Kombination des 3'RACE Outer primer mit 3_RACE_GS_IP1.
 M: 100 bp Marker (Biolabs NE).

Aufgrund der geringen Konzentration der Amplifikationsprodukte wurden diese ohne vorherige Aufreinigung in den TA-Vektor ligiert und in *E. coli* TOP10 Zellen kloniert. Die Selektion erfolgte über das *lacZ*-Reportergen. Durch anschließende Kolonie-PCR konnten Klone mit richtiger Insertion gefunden werden. Aus diesen wurde das Plasmid isoliert und sequenziert.

Auch hier konnte bei beiden Sequenzen, welche sich nur in der Adaptersequenz unterschieden, die Ähnlichkeit zu anderen Tlp-Proteinen über Datenbankvergleiche festgestellt werden.

Die neu gewonnenen 3'-Enden wurden nun mit der bekannten Teilsequenz verglichen. Diese überlappen in 387 bzw. 327 bp und stimmen in allen drei Sequenzen fast vollständig überein. Abbildung 4.22 zeigt einen Vergleich des 3'RACE-Fragments mit der Teilsequenz, sowie die daraus resultierende Aminosäuresequenz.

AS-Sequenz	G Y G S P P N T L A E Y S L N Q Y
<i>tlp</i> -Teilsequenz	GGCTATGGTTCCCCTCCTAACACTTTGGCTGAGTATTCATTGAACCAGTA
3'-RACE	GGCTATGGTTCCCCTCCTAACACTTTGGCTGAGTATTCATTGAACCAGTA
AS-Sequenz	N N L D F F D M S L V D G F N V P
<i>tlp</i> -Teilsequenz	CAACAACCTTGGACTTCTTTGACATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCC
3'-RACE	CAACAACCTTGGACTTCTTTGACATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCC
AS-Sequenz	M S F L P T S N G C T N G P T C
<i>tlp</i> -Teilsequenz	CAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGCACCAATGGTCCTACATGT
3'-RACE	CAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGCACCAATGGTCCTACATGT
AS-Sequenz	K A N I N G Q C P S E L K A P G G
<i>tlp</i> -Teilsequenz	ACGGCGGATATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAAGCCCCAGGTGG
3'-RACE	ACGGCGGATATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAAGCCCCAGGTGG
AS-Sequenz	C N N P C T V F K T D Q Y C C N S
<i>tlp</i> -Teilsequenz	TTGCAATAATCCATGCACTGTTTTTAAGACTGATGAATACTGTTGTAATT
3'-RACE	TTGCAATAATCCATGCACTGTTTTTAAGACTGATGAATACTGTTGTAATT
AS-Sequenz	G S C G P K S Y S E F F K N L C
<i>tlp</i> -Teilsequenz	CTGGGAGTTGTGGTCTACGAGCTACTCTGAGTTTTTTAAGAACCCTGTGC
3'-RACE	CTGGGAGTTGTGGTCTACGAGCTACTCTGAGTTTTTTAAGAACCCTGTGC
AS-Sequenz	P N A Y S Y P K D D A T S T Y T C
<i>tlp</i> -Teilsequenz	CCTGATGCTTATAGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTG
3'-RACE	CCTGATGCTTATAGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTG
AS-Sequenz	P G G T N Y K V V F C P
<i>tlp</i> -Teilsequenz	CCCTGGTGGAACCTAATTATAAGGTTGTGTTTTGCCCCT
3'-RACE	CCCTGGTGGAACCTAATTATAAGGTTGTGTTTTGCCCCTTAAAGTATAGCTG
AS-Sequenz	
3'-RACE	GTTTATATTCTGATGTTTATCAATAATAATTAAGTATACCTAAGTTTTTA
AS-Sequenz	
3'-RACE	CAAGATATTATGACAAGAGAGTCATACATATGTTAGAAAATAAAATAAACT
AS-Sequenz	
3'-RACE	TCTGTCAAGTTTTATTTGTTTTGAAAAAATATTTGGGAGTCCAAGGATCC
AS-Sequenz	
3'-RACE	TATGCGCCCTTGCATAGTGGAAGAATCCTATAAAATTTGCTCTCTTCATT
AS-Sequenz	
3'-RACE	GGCTGTAAAAAAAAAAAAA

Abbildung 4.22**Vergleich der 3'-RACE-Sequenz mit der überlappenden Teilsequenz.**

Gezeigt ist die komplette Sequenz des ermittelten 3'-Endes und der mit der Teilsequenz überlappende Bereich (grau unterlegt). Des Weiteren sind das Stoppcodon und die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

4.5.5 Amplifizierung der Vollängen-cDNA

Die Oligonukleotide für die 5'- bzw. 3'-RACE-PCR wurden so gewählt, dass die resultierenden Amplifikate in einem Bereich von 134 bp überlappten. Somit war es

möglich, diese zu einer vollständigen cDNA-Sequenz von 874 bp zusammenzustellen. Jedoch musste diese durch Amplifizierung der Vollängen-cDNA unter Verwendung der *Pfu* DNA Polymerase noch überprüft werden. Aus der schon ermittelten Sequenzinformation konnten zwei Vorwärtsprimer, *Thaumos_sense1* und *Thaumos_sense2*, und der Rückwärtsprimer *Thaumos_antisense* abgeleitet werden. Dabei waren Amplifizierungsprodukte von 722 bzw. 698 bp Größe zu erwarten. Um Ungenauigkeiten in der Sequenz zu vermeiden wurden *Pfu*-PCR-Reaktionen mit dem Programm PCR 8 durchgeführt. Dabei dienten cDNA aus *N. gracilis* und genomische DNA aus *N. gracilis* und *N. rafflesiana* als Matrizen. Bei Anlagerungstemperaturen von 57, 59 und 60°C konnte mit dem Vorwärtsprimer *Thaumos_sense2* und der cDNA als Matrize ein 698 bp großes Produkt amplifiziert werden. Mit genomischer DNA von *N. rafflesiana* und dem Oligonukleotiden *Thaumos_sense1* und *Thaumos_antisense* erfolgte die Synthese eines 722 bp großen Produktes bei einer Anlagerungstemperatur von 58°C (siehe Abbildung 4.23). Bei der Verwendung von genomischer DNA aus *N. gracilis* konnten keine Amplifikate detektiert werden.

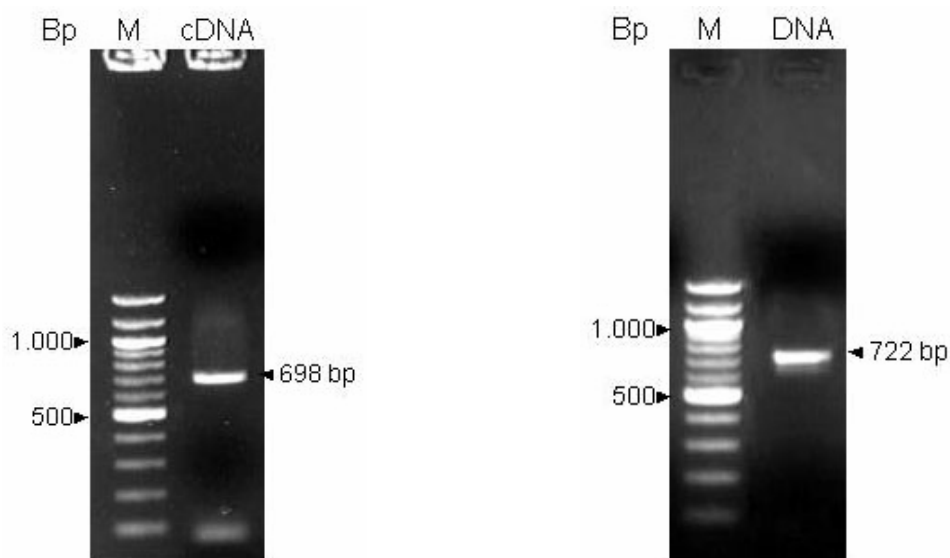


Abbildung 4.23

Elektrophoretische Auftrennung der durch die *Pfu*-PCR amplifizierten Produkte.

Im linken Bild ist das 698 bp große PCR-Produkt, welches mit cDNA aus *N. gracilis* und den Oligonukleotiden *Thaumos_sense2*/*Thaumos_antisense* amplifiziert werden konnte, zu sehen.

Das Bild rechts zeigt das Amplifikat von 722 bp Größe, welches mit genomischer DNA aus *N. rafflesiana* und den Oligonukleotiden *Thaumos_sense1*/*Thaumos_antisense* synthetisiert wurde.

M: 100 bp Marker (Biolabs NE).

Beide PCR-Produkte wurden aus dem Gel isoliert und in den Vektor pCR[®]4Blunt-TOPO[®] ligiert. Mit diesem wurden dann *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Über Blau-Weiß-Selektion konnten dann positive Kolonien isoliert werden. Diese wurden durch eine Kolonie-PCR, in der die Oligonukleotidpaare der jeweiligen *Pfu*-PCR verwendet wurden, auf die richtige Insertion getestet. Bei richtiger Insertion wurde die Plasmid-DNA aus den Klonen extrahiert. Diese wurde mit dem Enzym *EcoR* I gespalten, wobei einmal ein Produkt bei ca. 4.000 bp, welches den linearisierten Vektor darstellt, und ein weiteres bei 700 bzw. 730 bp erhalten wurde (siehe Abbildung 4.24).

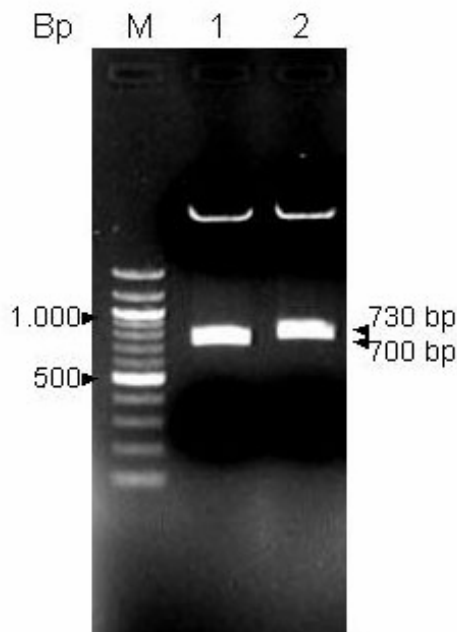


Abbildung 4.24

Agarosegelelektrophorese der durch *EcoR* I gespaltenen Plasmid-DNA mit vorhandener Insertion.

In beiden Spuren ist eine Bande bei 4.000 bp zu sehen, die dem linearisierten Vektor entspricht.

Weiterhin liegt in Spur 1 eine Bande bei 700 bp und in Spur 2 bei 730 bp vor, welche die jeweilige Insertion darstellen.

M: 100 bp Marker (Biolabs NE).

Beide Proben wurden zum Sequenzieren gegeben, wobei jeweils die komplementären DNA-Stränge sequenziert wurden. Die beiden Sequenzen waren bis auf einen Überhang von 32 bp am 5'-Ende identisch. In Abbildung 4.25 sind beide Stränge der vollständigen *t/p*-cDNA-Sequenz aus *N. gracilis* mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz dargestellt. Vom Start- bis zum Stoppcodon weist die Sequenz eine Länge von 678 nt auf, wobei A und C zu 24,6%, G zu 23,3% und T zu 24,4% vertreten ist.

Die cDNA-, sowie auch die Aminosäuresequenz wurden auf der Datenbank NCBI unter der „Accession-No.“ DQ352144 hinterlegt.

		M S Q F I K F I V	
1	ATCCATCATTCCACTTTCACAAAGAAGAAAAACAATGAGCCAATTCATAAAAATTCATTGT		60
1	TAGGTAGTAAGGTGAAAAGTGTTCCTTTCTTTTGTACTCGGTAAAGTATTTTAAAGTAACA		60
		F P S L L L A L L S I S I D A A T F D I	
61	TTTCCCTAGTCTTCTACTTGGCCCTATTGTGCGATATCCATCGATGCGGCCACATTTGACAT		120
61	AAAGGGATCAGAAGATGAACGGGATAACAGCTATAGGTAGCTACGCCGGTGTAAACTGTA		120
		V N N C G Y T V W A A A S P G G G Q Q L	
121	CGTAAACAACCTGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCTGCCTCACCGGGCGGTGGCCAACAATT		180
121	GCATTTGTTGACACCGATATGCCAGACCCGTCGACGGAGTGGCCCGCCACCGGTTGTTAA		180
		D P G Q T W T I N V N A G Q T G G R V W	
181	GGACCCAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAATGCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTG		240
181	CCTGGGTCCGGTCTGAACCTGGTATTTACAATTACGCCGGTTTGACCTCCAGCACAAAC		240
		A R T G C S L S G S N G A S C Q S G D C	
241	GGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCGGATCAAATGGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTG		300
241	CCGTGCTTGTCCACATCGGAAAGGCCTAGTTTACCCCGTTCGACGGTTAGACCGCTGAC		300
		G G L L Q C Q G Y G S P P N T L A E Y S	
301	CGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCCCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTC		360
301	GCCGCCAACGAGGTCACGGTTCGGATGCCGAGGGGAGGATTGTCAAACCGACTTATAAG		360
		L N Q Y N N L D F F D M S L V D G F N V	
361	ATTGAACCAGTACAACAACCTGGACTTCTTTGACATGTCACCTGTTGATGGGTTCAATGT		420
361	TAACCTGGTCATGTTGTTGAACCTGAAGAACTGTACAGTGAACAACCTACCCAAGTTACA		420
		P M S F L P T S N G C T N G P T C T A D	
421	CCCAATGTCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGCACCAATGGTCTACATGTACGGCGGA		480
421	GGGTTACAGGAAAGAGGGTGTAGATTACCGACGTGGTTACCAGGATGTACATGCCGCCT		480
		I N G Q C P S E L K A P G G C N N P C T	
481	CATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAGCCCCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCAC		540
481	GTATTTACCCGTCACGGGTTCACTCGATTTTTCGGGGTCCACCAACGTTGTTAGGTACGTG		540
		V F K T D E Y C C N S G S C S P T S Y S	
541	TGTTTTTAAAGACCGATGAATACTGTTGTAATTCCTGGGAGCTGTAGTCCTACGAGCTACTC		600
541	ACAAAAATTCGGCTACTTATGACAACATTAAGACCCTCGACATCAGGATGCTCGATGAG		600
		E F F K N L C P D A Y S Y P K D D A T S	
601	TGAATTTTTTAAAGAACCTGTGTCCTGATGCTTATAGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAG		660
601	ACTTAAAAAATTCCTGGACACAGGACTACGAATATCAATGGGGTTCCTACTACGTTGTTTC		660
		T Y T C P G G T N Y K V V F C P *	
661	CACATATACCTGCCCTGGTGGAACTAATTATAAGGTTGTGTTTTGCCCTTAAAGTATAAC		720
661	GTGTATATGGACGGGACCACCTTGATTAATATCCAACACAAAACGGGAATTCATATTG		720
721	TG	722	
721	AC	722	

Abbildung 4.25**Darstellung der vollständigen *t1p*-cDNA-Sequenz.**

Hier sind beide Stränge der *t1p*-cDNA-Sequenz aus *N. gracilis* mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz dargestellt. Das Start- bzw. Stopp-Codon, sowie die aus dem Kannensaft ermittelten Peptidsequenzen sind grau unterlegt.

Die resultierende Aminosäuresequenz wurde des Weiteren bioinformatisch untersucht. Zuerst erfolgte der Sequenzvergleich mit anderen Tlp-Proteinen. Dabei wurden die schon bei früheren Sequenzvergleichen genutzten Proteinsequenzen verwendet (Abbildung 4.26).

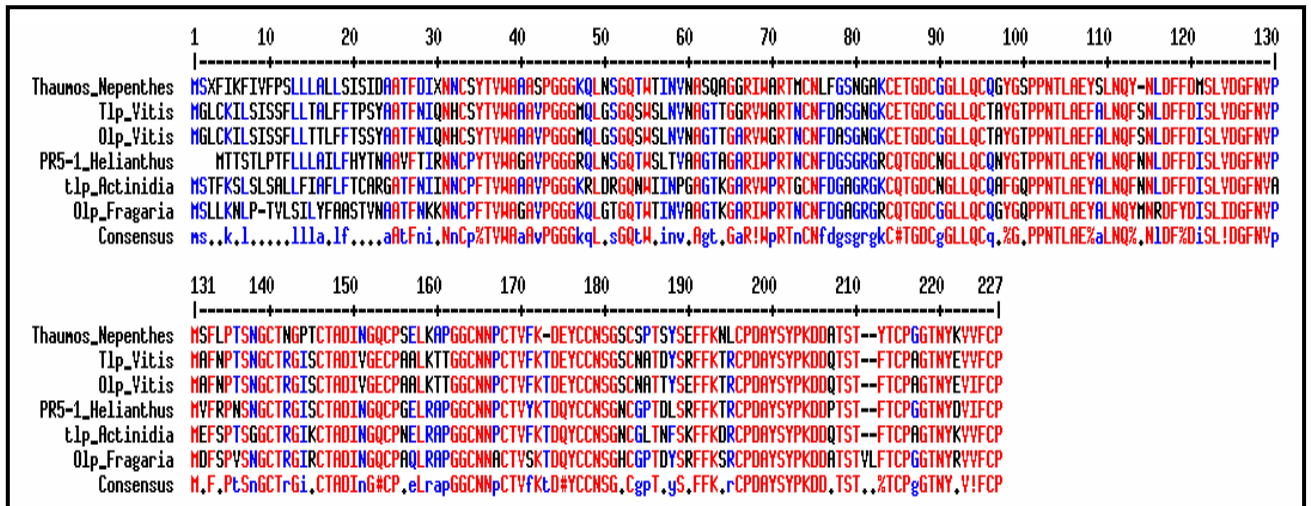


Abbildung 4.26
Sequenzvergleich der Tlp-Proteinsequenz aus *Nepenthes gracilis* mit anderen verwandten Proteinsequenzen.

Die größten Unterschiede treten in den ersten 30 Aminosäuren (AS) auf. Diese stellen wahrscheinlich das Signalpeptid dar.

(Legende: Tlp_Vitis = Tlp aus *Vitis vinifera*, Olp_Vitis = Olp aus *Vitis vinifera*, PR5-1_Helianthus = PR5-1 Protein aus *Helianthus annuus*, Olp_Fragaria = Olp aus *Fragaria ananassa*, tlp_Actinidia = Tlp aus *Actinidia deliciosa*, Tlp = Thaumatin-like protein, Olp = Osmotin-like protein, PR5-1 = Pathogenesis related protein 5-1, Thaumos = Thaumatin/Osmotin-like protein).

Zur Verdeutlichung der Sequenzvergleiche wurde eine Identitätsmatrix zwischen der ermittelten Tlp-Sequenz und weiteren 5 bekannten Tlp, Olp (Osmotin like protein) und einem PR5-1 Protein angefertigt (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3
Identitätsmatrix für die Aminosäure-Sequenz verschiedener Mitglieder aus der Thaumatin-Familie.

Die Werte sind als Identität der Sequenz in Prozent ausgedrückt. Ermittelt wurden diese über die Datenbank NCBI.
(Legende: Tlp = Thaumatin-like protein, Olp = Osmotin-like protein, PR5-1 = Pathogenesis related protein 5-1)

	Tlp, <i>Nepenthes gracilis</i>	Tlp, <i>Vitis vinifera</i>	Olp, <i>Vitis vinifera</i>	PR5-1, <i>Helianthus annuus</i>	Tlp, <i>Actinidia deliciosa</i>	Olp, <i>Fagus ananassa</i>
Tlp, <i>Nepenthes gracilis</i>	100%	74%	73%	73%	73%	75%
Tlp, <i>Vitis vinifera</i>		100%	96%	74%	72%	71%
Olp, <i>Vitis vinifera</i>			100%	74%	76%	73%
PR5-1, <i>Helianthus annuus</i>				100%	76%	78%
Tlp, <i>Actinidia deliciosa</i>					100%	74%
Olp <i>Fagus ananassa</i>						100%

Es wurde weiterhin vermutet, dass die Aminosäuresequenz N-terminal ein Signalpeptid trägt. Deshalb wurde auf dem „SignalP 3.0 Server“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) die mögliche Länge des Signalpeptids berechnet und die voraussichtliche Spaltstelle der Signalpeptidase I auf der Grundlage verschiedener Algorithmen bestimmt (siehe Abbildung 4.27 und 28).

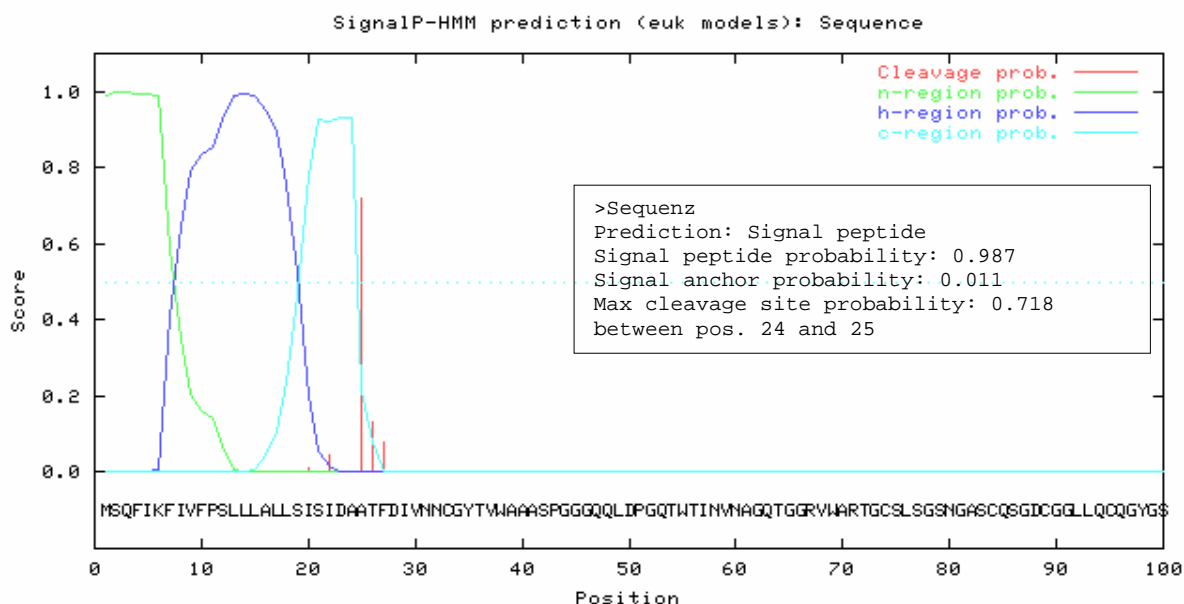
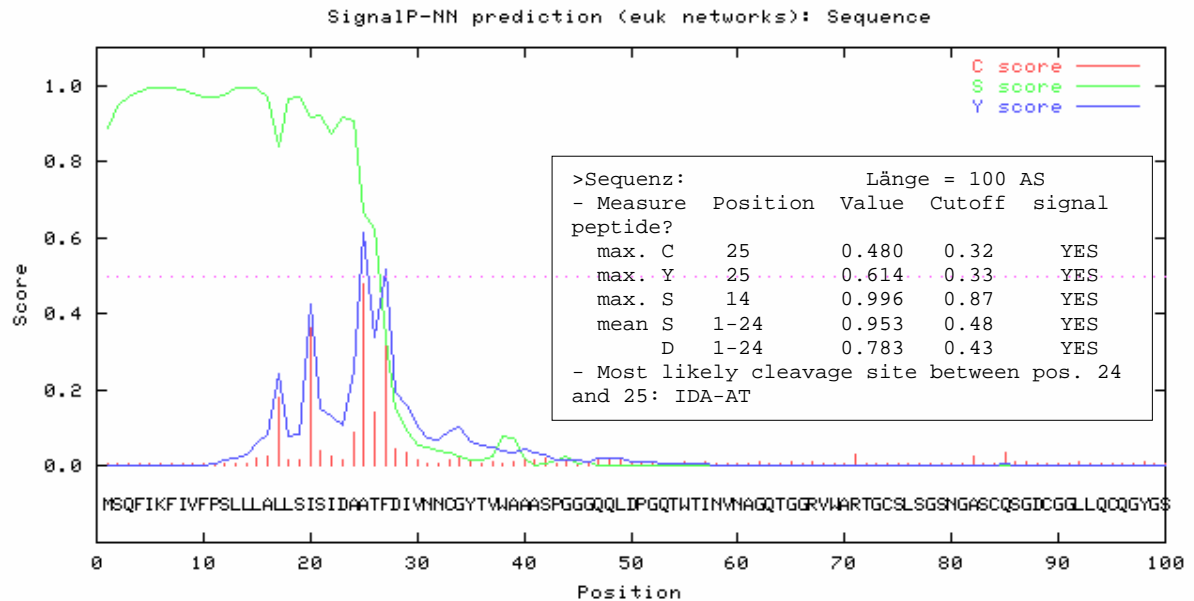


Abbildung 4.27

Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines vorhandenen Signalpeptids (SignalP-HMM Ergebnis).

Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines Signalpeptids wurde mit 0,987 angegeben. Die Spaltstelle befindet sich höchst wahrscheinlich zwischen AS 24 (Ala) und 25 (Ala).

Dabei wurde ein Signalpeptid mit einer Länge von 24 AS angegeben, wobei sich die Spaltstelle für die Signalpeptidase I voraussichtlich zwischen AS 24 (Ala) und 25 (Ala) befindet. Da die Proteinsequenz aus 225 AS besteht, würde das reife Protein mit AS 25 beginnen und wäre somit 201 AS lang. Das berechnete Molekulargewicht des Gesamtproteins beträgt 24 kDa und der isoelektrische Punkt wurde mit 4 angegeben. Nach Abtrennung des Signalpeptids liegt das theoretische Molekulargewicht bei 21 kDa und der pI bei 3,9. Nach der Auftrennung über die 2D-Elektrophorese lagen die Proteinspots 6 und 21, in denen die Peptidsequenzen detektiert wurden, bei 23 kDa, wobei der pI bei etwa 4 lag.

**Abbildung 4.28**

Voraussage der Länge des Signalpeptids, sowie der Spaltstelle der Signalpeptidase I (SignalP-NN-Ergebnis).

Auch hier wurde die Länge des Signalpeptids auf die ersten 24 AS gelegt. Die Spaltstelle der Signalpeptidase I wurde zwischen AS 24 (Ala) und 25 (Ala) gelegt.

Dabei wurden die angegebenen Werte wie folgt definiert:

Der S-Wert wird für jede einzelne Aminosäureposition (AS) der angegebenen Sequenz vorausgesagt. Bei hohen Werten gehört diese AS zum Signalpeptid, bei niedrigen zum reifen Protein.

Der C- (cleavage site) Wert wird ebenfalls für jede Position der Sequenz angegeben und sollte nur an der Spaltstelle signifikant hoch sein. Die angegebene Position meint dabei die erste Aminosäure des reifen Proteins.

Der Wert Y max ist eine Korrektur des C-Wertes unter Einbeziehung von S und erlaubt eine genauere Voraussage der Spaltstelle.

S mean zeigt die Länge des Signalpeptids von der ersten N-terminalen AS bis zu der AS mit dem höchsten Y-Wert an. D ist ein durchschnittlicher Wert aus S mean und Y max.

5. DISKUSSION

Kannepflanzen der Gattung *Nepenthes* weisen Organe auf, die hoch spezialisierte Strukturen zur Anlockung, zum Fang, zur Verhinderung der Flucht und zur Verdauung der Beute, sowie für die Resorption der Nährstoffe aufweisen (Owen & Lennon, 1999; Gaume et al., 2002 & 2004; Riedel et al., 2003; Bohn & Federle, 2004). Dabei ist die Anatomie der Verdauungsdrüsen besonders interessant, da diese eine Vielzahl der Aufgaben, wie die Sekretion der Verdauungsenzyme und organischer Säuren, den Transport von H^+ -Ionen über die Plasmamembran in die Kannenflüssigkeit (An et al., 2001), sowie die Absorption der durch die Verdauung der Beute freigesetzten Nährstoffe, vor allem von Stickstoff (Schulze et al., 1997 & 1999), übernehmen. Die Drüsenschicht kann bis zu zwei Drittel der inneren Oberfläche der Kanne einnehmen, wobei die Drüsen, deren Durchmesser 100 μm beträgt, mit bloßem Auge erkennbar sind. Bei mikroskopischer Betrachtung der Drüsenzzone von *N. rafflesiana* fielen verschiedene Strukturen auf: Der Drüsenkörper befindet sich in einer Vertiefung, die bis zu 28 μm betragen kann. Diese wird am Rand von einer Haube überzogen, welche vor allen im proximalen Bereich der Verdauungszone auch Abschnitte der Drüse bedeckt (Gorb et al., 2004). Bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde eine Autofluoreszenz der Zellwände von Drüsen-, Kopf-, sowie umliegenden Parenchymzellen beobachtet. Diese haben in ihren lateralen und äußeren Zellwänden Cutin eingelagert (Gorb et al., 2004). Die Autofluoreszenz ergibt sich wahrscheinlich durch phenolische Verbindungen, die in der Cutinmatrix präsent sind (Laguna et al., 1999).

Bei der Präparation der Absorptionszone einer Kanne von *Sarracenia purpurea* wurden ebenfalls Drüsen gefunden. Der Drüsenkörper, sowie die Zellwände zweier den Drüsenkörper nach unten begrenzenden Zellen weisen ebenfalls Autofluoreszenz auf. Der Drüsenkörper liegt offen an der Oberfläche und ist nicht wie bei *Nepenthes* von einer Vertiefung geschützt. Über die Funktionen der Drüsen ist noch sehr wenig bekannt. Eine Aufgabe ist wahrscheinlich die Absorption von Nährstoffen, die während des Verdauens der Beute freigesetzt werden. Weiterhin können verschiedene organische Substanzen durch die

Drüsenzellen in den Kannensaft abgegeben werden. Ob die Zellen auch zur Sekretion von Verdauungsenzymen befähigt sind, ist noch ungeklärt. Zwar wurde eine von der Pflanze produzierte Protease postuliert (Hepburn & Jones, 1927; Lindquist, 1975), sowie proteolytische Aktivität in der Flüssigkeit geschlossener Kannen von *Sarracenia* beschrieben (Lüttge, 1964), doch seitdem gibt es keine weiteren Hinweise auf das Vorkommen pflanzeigener Proteine in der Kannenflüssigkeit. Der Kannensaft wird von zahlreichen Algen (vor allem Grün- und Goldalgen), Pilzen, Bakterien und Insektenlarven besiedelt (Gebühr, 2005). Deshalb wird angenommen, dass die Zersetzung der Nahrung durch bakterielle Enzyme erfolgt. Die Algen resorbieren in der Flüssigkeit enthaltene Nährstoffe. Diese entstehen durch bakterielle Exkretion und durch das Absterben und die anschließende Zersetzung von in der Flüssigkeit lebenden Protozoen und Mikroben, sowie von in die Kanne gefallenen Insekten. Bisher wurde jedoch noch nicht beschrieben, ob *Sarracenia* ähnlich spezialisierte Strukturen wie *Nepenthes* für den Beutefang besitzt, oder ob dies vielleicht gar nicht nötig ist, da das Nährstoffangebot ausreicht, das durch die Besiedlung der Kanne entsteht.

Im Gegensatz zu *Sarracenia* ist bei *Nepenthes* das Vorkommen pflanzeigener Verdauungsenzyme bekannt. Durch simple Aktivitätsbestimmungen zahlreicher Enzyme wie Esterasen, Amylasen, Chitinasen, Lipasen, Peroxidasen, Phosphatasen, Proteasen, Ribonukleasen und Transaminasen in geschlossenen Kannen von *Nepenthes* konnte deren Vorkommen sehr wahrscheinlich gemacht werden (Juniper, 1989). Jedoch gab es außer der Identifizierung zweier Aspartatproteinasen, Nepenthesin I und II (Athauda et al., 2004 & Takahashi et al., 2005), noch keinen Nachweis auf molekularbiologischer Ebene für das Vorhandensein der oben genannten Enzyme.

Deswegen wurde nach einer Methode gesucht, die es ermöglicht, die Proteine aus der Kannenflüssigkeit schnell und effektiv zu isolieren, aufzutrennen und zu identifizieren. Dazu wurde die Methode der 2D-Elektrophorese herangezogen. Diese musste bezüglich jedes einzelnen Parameters für Kannensaftproteine optimiert werden: Zur Probenaufreinigung eignete sich die Fällung der Proteine mit TCA/Aceton oder über den „2-D Clean-Up Kit“. Durch diese Methoden konnten Salze und Zucker effektiv aus der Probe entfernt werden, was durch die Methanol-Fällung oder die Aufreinigung über die PD-10 Säulen nicht möglich war. Nach der

Aufreinigung wurden die Proteine in Rehydrationspuffer resuspendiert und in den IPG-Streifen eingequollen. Bei der Verwendung von IPG-Streifen des pH-Bereichs 3-10 zeigte sich, dass im Kannensaft ausschließlich Proteine vorkommen, die einen pI im sauren Bereich aufweisen (siehe Punkt 4.3, Abbildung 4.10). Deshalb wurden IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3-5,6 verwendet, die eine bessere Auflösung der einzelnen Proteine ermöglichten (Punkt 4.3; Abbildung 4.11). In der zweiten Dimension wurde eine akzeptable Auftrennung durch die Verwendung von 10%-igen Laemmli-Gelen erreicht. Durch die Optimierung dieser Parameter wurde die Methode soweit etabliert, dass einzelne Proteinspots detektiert werden konnten.

Unter der Verwendung des Sekrets aus geschlossenen und damit sterilen Kannen von *Nepenthes* wurden die Gele in Punkt 4.3 (Abbildungen 4.10 & 4.11) erhalten, wobei sich jeweils ein anderes Proteinmuster ergab. Es kann nicht genau gesagt werden, ob dies ein Problem der Methode ist oder an der Probenzusammensetzung liegt. Wie in Punkt 3.3.1 erwähnt, war die Proteinkonzentration und das Volumen der Flüssigkeit pro Kanne so gering, dass nicht zwischen den einzelnen Arten unterschieden werden konnte und deshalb die Proben vereinigt werden mussten. Da die in Abbildung 4.10 bzw. 4.11 (Punkt 4.3) dargestellten Proben jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten, sowie aus verschiedenen Kannen entnommen wurden, liegt nahe, dass die Proteinzusammensetzung unterschiedlich ist. Außerdem wurden die Proben von Kannen verschiedenen Alters verwendet. Bisher ist nicht bekannt, inwiefern sich das Expressionsmuster der Verdauungsenzyme mit dem Alter der Kannen ändert bzw. welche Parameter die Induktion der Expression beeinflussen.

Aus den in den Abbildungen 4.10 und 4.11 (Punkt 4.3) dargestellten Gelen wurden 33 Proteinspots ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau die Peptide aus dem Gel extrahiert. Dabei konnten aus 11 von 33 Proteinspots 19 Peptidsequenzen erhalten werden, die in Datenbankvergleichen Nepenthesin I, Thaumatin-ähnlichen Proteinen (TLP), einem Pathogenesis-related- (PR) Protein-1C, Glucanasen und verschiedenen putativen Proteinen zugeordnet werden konnten. Interessanterweise wurden auch zwei Peptidsequenzen gefunden, die keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Proteinsequenzen aufwiesen.

In Proben, die in der IEF über einen pH-Bereich von 3-10 separiert wurden, kam es häufig vor, dass mehrere Peptidsequenzen, die in Datenbankvergleichen

verschiedenen Proteinen zugeordnet werden konnten, in einem Proteinspot detektiert wurden (Punkt 4.3; Abbildung 4.10; Spot 1,2 & 4). Dies konnte durch eine Einschränkung des pH-Bereichs auf 3-5,6 und die damit verbundene erhöhte Trennleistung größtenteils unterbunden werden.

Aus zwei Proteinspots (Punkt 4.3; Abbildung 4.11; Spot 29 & 30) wurden drei Peptidsequenzen gefunden, die eindeutig Nepenthesin I zugeordnet werden konnten. Die Peptidsequenzen sind 13 AS lang und unterscheiden sich jeweils in der neunten AS, wobei diese Met, Phe oder Leu ist. Die zwei Spots wurden im gleichen Molekulargewichtsbereich von etwa 50 kDa detektiert, besaßen aber einen unterschiedlichen pI (3,5 & 4). Trotzdem unterschieden sich beide Parameter nur geringfügig von den publizierten Werten von 45 kDa und einem pI von 3,94 (Athauda et al., 2004; Takahashi et al., 2005). Hier liegt das Vorkommen von Isoformen des Enzyms innerhalb der verschiedenen Arten oder auch in derselben Spezies nahe, die sich geringfügig in ihrer AS-Sequenz unterscheiden. Die Tatsache, dass Athauda et al. (2004) bei einem Vergleich der AS-Sequenzen von Nepenthesin I aus *N. distillatoria* und *N. gracilis* nur eine Übereinstimmung von 93 bis 94% herausfanden, unterstützt diese Vermutung.

Eine Erklärung für die Detektion gleicher Peptidsequenzen in Proteinspots mit verschiedenem Molekulargewicht, jedoch gleichem pI, könnte das Vorkommen von Glykosylierungen sein. Diese können je nach Anzahl der Akzeptorstellen für O- bzw. N-Glykosylierung unterschiedlich ausgeprägt sein. Der jeweilige Anteil an Kohlenhydraten hat einen Einfluss auf das Molekulargewicht, nicht aber auf den pI. Da es sich bei den Kannensaftproteinen um Sekretproteine handelt, liegt eine Glykosylierung als Schutzmechanismus vor proteolytischem Abbau nahe. So wurden für Nepenthesin I sechs Sequenzbereiche beschrieben, an denen N-Glykosylierung erfolgen könnte (Athauda et al., 2004; Takahashi et al., 2005). Um die Frage nach möglichen Glykosylierungen der Proteine zu beantworten, wurde über die PAS-Färbung ein einfacher Nachweis durchgeführt. Dabei konnten nach einer SDS-Gelelektrophorese zehn Proteinbanden detektiert werden, in denen die Proteine glykosyliert vorlagen (Punkt 4.4, Abbildung 4.12). Eine Bande befand sich im Bereich von 50 kDa, was Nepenthesin I entsprechen könnte.

Weiterhin wurden aus fünf unterschiedlichen Proteinspots im Molekulargewichtsbereich von 23 bis 31 kDa bei nahezu gleichem pI vier Peptidsequenzen erhalten, die alle Thaumatin-ähnlichen Proteinen (TLP) zugeordnet werden konnten (Punkt

4.3; Abbildungen 4.10 & 4.11; Spot 5, 6, 19, 21 & 31). In diesem Molekulargewichtsbereich wurden mit der PAS-Färbung ebenfalls Glykoproteine detektiert. Das Vorkommen von TLP, einem PR-Protein der Klasse 5 mit weitgehend unbekannter Funktion, in der Kannenflüssigkeit ist sehr interessant. PR-Proteine wurden bisher nur in Zusammenhang mit pflanzlicher Abwehr beschrieben. Das Vorkommen dieser Proteine in der Kannenflüssigkeit könnte ihnen eine neue physiologische Bedeutung bei der Ernährung der Pflanze geben. Deshalb habe ich mich im weiteren Verlauf der Arbeit mit der Charakterisierung der Sequenz des TLPs beschäftigt.

Ausgehend von den Peptidsequenzen gelang es mit degenerierten Oligonukleotiden zwei *tlp*-Teilsequenzen von 596 bzw. 424 bp Größe zu amplifizieren. Mit der RLM-RACE-PCR war es möglich, das 5'- und 3'-Ende der cDNA-Sequenz zu vervollständigen.

Somit konnte erstmals die Vollängen-cDNA-Sequenz aus *N. gracilis* sowie die Sequenz aus genomischer DNA von *N. rafflesiana* eines TLPs isoliert werden. Beide Sequenzen waren identisch und bestehen vom Start- bis zum Stopp-Codon aus 678 nt (Punkt 4.5; Abbildung 4.25). Die Sequenz aus der genomischer DNA wies keine Introns auf. Dies wurde ebenfalls für *tlp*-Gene in Tabak (*Nicotiana tabacum*) beschrieben (van Kan et al., 1989).

Die von der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz besteht aus 225 AS-Resten. Die aus dem Kannensaft isolierten Peptidsequenzen wurden in der AS-Sequenz wiedergefunden. Somit ist sehr wahrscheinlich, dass das isolierte TLP in der Verdauungszone der Kanne exprimiert und in die Kannenflüssigkeit abgegeben wird.

Die Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen der Thaumatin-Familie bewegten sich zwischen 73% und 75%, wobei beim Vergleich von anderen Vertretern dieser Familie untereinander auch ähnliche Ergebnisse resultierten (Punkt 4.5; Tabelle 4.3). Außerdem weist die Sequenz zwölf stark konservierte Cysteinreste auf, die bei vielen Vertretern dieser Familie zur Ausbildung von 6 Disulfidbrücken führen.

In bioinformatischen Untersuchungen wurde ein theoretische Molekulargewicht von 24 kDa, sowie ein *pI* von 3,9 bestimmt. Weiterhin wurde N-terminal ein aus 24 AS-Resten bestehendes putatives Signalpeptid definiert und die Schnittstelle für eine Signalpeptidase zwischen AS 24 und 25 vorhergesagt (Punkt 4.5; Abbildung 4.27 und 28). Ein Signalpeptid der gleichen Länge wurde auch bei Nepenthesin I

und II gefunden (Takahashi et al., 2005). Nach der Abtrennung des Signalpeptids besteht die Sequenz des maturen Proteins aus 201 AS-Resten, das kalkulierte Molekulargewicht beträgt 21 kDa und der pI liegt bei 3,9. In der 2D-Elektrophorese lagen die Proteinspots, in denen die Peptidsequenzen detektiert worden waren, zwischen 23 und 31 kDa. Dies ist zwar höher als der theoretisch bestimmte Wert, doch da auch in diesem Molekulargewichtsbereich Glykoproteine gefunden wurden, ist es möglich, dass ein posttranslationales Anhängen von Kohlenhydratresten das höhere Molekulargewicht bedingt.

Über die Bedeutung von TLPs in der Kannenflüssigkeit kann nur spekuliert werden. Als TLPs werden die PR-Proteine der Klasse 5 bezeichnet, da diese sehr homolog zu Thaumatin sind, einer süß-schmeckenden Substanz aus der Frucht des Katemfe-Strauchs (*Thaumatococcus daniellii*).

PR-Proteine wurden zuerst im Zusammenhang mit der hypersensitiven Antwort von Tabak auf den Tabak-Mosaik-Virus (TMV) beschrieben (zusammengefasst von Bol et al., 1990) und werden generell als Antwort auf verschiedene biotische und abiotische Agenzien induziert.

TLPs werden als Antwort auf virale, bakterielle und pilzliche Infektionen, Stress oder Entwicklungssignale exprimiert. Bis jetzt ist jedoch noch keine eindeutige enzymatische Funktion bekannt. In Mais (*Zea mays*) wurde ein TLP (Zeamatin) als α -Amylase/Trypsin-Inhibitor beschrieben (Schimoler-O'Rourke et al., 2001). Diese Aktivität konnte bislang jedoch bei keinem anderen TLP, inklusive des stark homologen Zeamatin-ähnlichen Proteins aus Mais (Malehorn et al., 1994), detektiert werden. Ebenso wird eine β -1,3-Glucanase-Aktivität mit TLPs in Verbindung gebracht (Grenier et al., 1999; Menu-Bouaouiche et al., 2003), die für die Inhibierung von Pilzwachstum verantwortlich ist. In Tabak wurde ebenfalls ein TLP mit β -1,3-Glucanase-Aktivität beschrieben, welches spezifisch an Proteine des Cucumber-Mosaik-Virus (CMV) bindet. Dabei ist nicht bekannt, ob es sich um eine antivirale Wirkung handelt oder ob der Virus das TLP dazu nutzt, seine Replikation und Verbreitung zu erhöhen (Kim et al., 2005).

Bei einigen Mitgliedern der TLP-Unterfamilie wurde eine direkte Abwehrfunktion festgestellt: So löst Osmotin aus Tabak die Lyse der Sporangien von *Phytophthora infestans* aus (Woloshuk et al., 1991) und verschiedene Samen-TLPs wirken inhibierend auf das Wachstum von *Candida albicans*, *Neurospora crassa* und

Trichoderma reesei (Roberts & Selitrennikoff, 1990), *Alternaria solani* und *Fusarium oxysporum* (Huynh et al., 1992), und *Trichoderma viridae* (Bryngelsson & Green, 1989). Die Inhibierung des Wachstums von Pilzen durch TLPs erfolgt auf unterschiedlichen Wegen: TLPs mit β -1,3-Glucanase-Aktivität können das Pilzwachstum durch Hydrolyse des Glucan-Polymers inhibieren. Es wurde aber auch eine Lyse von Hyphen oder Sporen beobachtet. Für Zeamatin wurde eine membranpermeabilisierende Aktivität beschrieben, da neben Brüchen der Hyphenstruktur ein Ausströmen des cytoplasmatischen Materials bewirkt wird (Stintzi et al., 1993; Roberts & Selitrennikoff, 1990). Als Ursache dafür wird die Ausbildung amphipathischer Domänen in der Sekundärstruktur, vermittelt durch Disulfidbindungen, vermutet. Diese sind analog zu einem anderen Typ pflanzlicher Abwehrproteine, den Thioninen (Hughes et al., 2000; Stec et al., 2004). Die Domänen könnten mit der Membran interagieren und Poren oder Kanäle bilden, woraus unter extremen Bedingungen die Lyse der Zelle resultieren kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vielen Vertretern der Thaumatin-Familie durch eine β -1,3-Glucanase- oder Membranaktivität eine Funktion in der Abwehr von Pilzbefall zukommt. In der Flüssigkeit von *Nepenthes*-Kannen könnten diese Funktionen dazu genutzt werden, um durch eine hydrolytische oder lytische Aktivität die in Zellen der Beute befindlichen Nährstoffe freizusetzen. Dazu müsste das TLP nach heterologer Expression in diesem Zusammenhang weiter untersucht werden.

6. AUSBLICK

Ein wichtiger Punkt der Diplomarbeit war die Optimierung der Parameter der 2D-Elektrophorese, um darüber eine Auftrennung der Kannensaftproteine zu ermöglichen. Mit dieser Methode war es zwar möglich, eine Reihe von Proteinen zu detektieren, jedoch wurden dabei auch die Grenzen dieser Methode deutlich. So ist bei vielen Proteinen der Kannenflüssigkeit die Konzentration so gering, dass diese zwar auf dem SDS-Gel noch detektiert werden konnten, jedoch für eine massenspektrometrische Analyse nicht mehr ausreichten. Eine mögliche Überlegung wäre, direkt vom Sekret geschlossener Kannen einen tryptischen Verdau durchzuführen und diesen anschließend massenspektrometrisch zu untersuchen. Damit erhält man zwar keine Aussagen über den pI bzw. das Molekulargewicht der einzelnen Proteine, umgeht aber Probenverluste während der einzelnen Arbeitsschritte. Somit müsste sich ein großes Spektrum von Peptidsequenzen erhalten lassen, denen spätere molekularbiologische Untersuchungen folgen können.

Ein weiterer Punkt der Arbeit war die Isolierung der Vollängen-cDNA-Sequenz eines Thaumatin-ähnlichen Proteins. Mit dieser Sequenz sollte eine funktionelle Expression in einem heterologen System erfolgen.

Durch die Expression in Bakterienzellen könnten Enzymtests zur Untersuchung des Proteins auf β -1,3-Glucanase-Aktivität, sowie die Überprüfung auf membranpermeabilisierende Eigenschaften erfolgen.

Ferner wäre es interessant, eine Expression in Hefe- bzw. Insektenzellen durchzuführen um strukturelle Eigenschaften wie z.B. den Glykosylierungsgrad zu charakterisieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

An CI, Fukusaki EI, Kobayashi A (2001) Plasma-membrane H⁺-ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **212**: 547-555

An CI, Fukusaki E, Kobayashi A (2002) Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **214**: 661-667

An CI, Takekawa S, Okazawa A, Fukusaki E, Kobayashi A (2002) Degradation of a peptide in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **215**: 472-477

Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H, Takahashi K (2004) Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal* **381**: 295-306

Barthlott W, Porembski S, Seine R, Theisen I (2004) Karnivoren, Biologie und Kultur Fleischfressender Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99

Bohn HF, Federle W (2004) Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 14138-14143

Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Reviews of Phytopathology* **28**: 113-138

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254

Bryngelsson FT, Green B (1989) Characterization of a pathogenesis-related, thaumatin-like protein isolated from barley challenged with an incompatible race of mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **35**: 45-52

Clarke C (1997) *Nepenthes* of Borneo. Natural History Publications, Kota Kinabalu

Darwin C (1875) *Insektenfressende Pflanzen*. Schweizbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

Fraza C, Bento I, Costa J, Soares CM, Verissimo P, Faro C, Pires E, Cooper J, Carrondo MA (1999) Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 27694-27701

Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Biochemistry* **85**: 8998-9002

Gaume L, Gorb S, Rowe N (2002) Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytologist* **156**: 479-489

Gaume L, Perret P, Gorb E, Gorb S, Labat JJ, Rowe N (2004) How do plant waxes cause flies to slide? Experimental tests of wax-based trapping mechanisms in three pitfall carnivorous plants. *Arthropod Structure & Development* **33**: 103-111

Gebühr C (2005) Struktur und Sukzession der Algengemeinschaften in den Phytotelmen einer allochthonen Population von *Sarracenia purpurea* L. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Gerard G (1990) Purification of Glykoproteins. Academic Press: *Methods in Enzymology* **182**: 529-539

Gorb E, Kastner V, Peressadko A, Arzt E, Gaume L, Rowe N, Gorb S (2004) Structure and properties of the glandular surface in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *Journal of Experimental Biology* **207**: 2947-2963

Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A (1999) Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans. *Plant Journal* **19**: 473-480

Hepburn JS, Jones FM (1927) The enzymes of the pitcher liquor of the Sarraceniaceae. *Trans. Wagner Free Inst. Sci.* **11**: 49-68.

Hughes P, Whitecross M, Llewellyn D, Gage P (2000) The Cytotoxic Plant Protein, Purothionin, Forms Ion Channels in Lipid Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 823-827

Huynh QK, Borgmeyer JR, Zobel JF (1992) Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **182**: 1-5

Jentsch J (1972) Enzymes from carnivorous plants (*Nepenthes*). Isolation of the protease Nepenthacin. *Febs Letters* **21**: No. 3

Juniper BE, Robins RJ, Joel D (1989) *The Carnivorous plants*. Academic Press, London, UK

- Kang DH, Gho YS, Suh MK, Kang CH** (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **23**: 1511-1512
- Kim MJ, Ham BK, Kim HR, Lee IJ, Kim YJ, Ryu KH, Park YI, Paek KH** (2005) In vitro and in planta interaction evidence between *Nicotiana tabacum* thaumatin-like protein 1 (TLP1) and Cucumber mosaic virus proteins. *Plant Molecular Biology* **59**: 981-994
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laguna L, Casado CG, Heredia A** (1999) Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of H-3-phenylalanine precursor. *Physiologia Plantarum* **105**: 491-498
- Lindquist JA** (1975) Part II: Digestive activities of carnivorous plants. Pitcher Plant Project, Literature Review II
- Lottspeich F, Zorbas H** (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin
- Lüttge U** (1964) Untersuchungen zur Physiologie der Carnivoren-Drüsen, I. Die an den Verdauungsvorgängen beteiligten Enzyme. *Planta* **63**: 103-117
- Lüttge U** (1964) Untersuchungen zur Physiologie der Carnivoren-Drüsen, III. Der Stoffwechsel der resorbierten Substanzen. *Flora* **155**: 228-236
- Malehorn DE, Borgmeyer ER, Smith CE, Shah DM** (1994) Characterization and expression of an antifungal zeamatin-like protein (zlp) gene from *zea mays*. *Plant Physiology* **106**: 1471-1481
- Menu-Bouaouiche L, Vriet C, Peumans WJ, Barre A, Van Damme EJM, Rouge P** (2003) A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* **85**: 123-131
- Merbach MA, Merbach DJ, Maschwitz U, Booth WE, Fiala B, Zizka G** (2002) Carnivorous Plants: Mass march of termites into the deadly trap. *Nature* January **415**: 36-37
- Moran JA** (1996) Pitcher dimorphism, prey composition and the mechanisms of prey attraction in the pitcher plant *nepenthes rafflesiana* in borneo. *Journal of Ecology* **84**: 515-525
- Morrissey S** (1955) Chloride ions in the secretion of the pitcher plant. *Nature* **176**
- Owen TP, Lennon KA** (1999) Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *American Journal of Botany* **86**: 1382-1390

Owen TP, Lennon KA, Santo MJ, Anderson AN (1999) Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Annals of Botany* **84**: 459-466

Riedel M, Eichner A, Jetter R (2003) Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* **218**: 87-97

Roberts WK, Selitrennikoff CP (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General and Applied Microbiology* **136**: 1771-1778

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379

Schimoler-O'Rourke R, Richardson M, Selitrennikoff CP (2001) Zeamatin inhibits trypsin and alpha-amylase activities. *Applied & Environmental Microbiology* **67**: 2365-2366

Schulze W, Frommer WB, Ward JM (1999) Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant Journal* **17**: 637-646

Schulze W, Schulze ED, Pate JS, Gillison AN (1997) The nitrogen supply from soils and insects during growth of the pitcher plants *nepenthes mirabilis*, *cephalotus follicularis* and *darlingtonia californica*. *Oecologia* **112**: 464-471

Stec B, Markman O, Rao U, Heffron G, Henderson S, Vernon LP, Brumfeld V, Teeter MM (2004) Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *Journal of Peptide Research* **64**: 210-224

Steckelberg R, Lüttge U, Weigl J (1967) Reinigung der Proteinase aus *Nepenthes*-Kannsaft. *Planta* **76**: 238-241

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemannmerdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**: 687-706

Takahashi K, Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H (2005) Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: enzymatic and structural characteristics. *Current Protein and Peptide Science* **6**: 513-525

Van Kan JAL, Van De Rhee MD, Zuidema D, Cornelissen BJC, Bol JF (1989) Structure of tobacco genes encoding thaumatin-like proteins. *Plant Molecular Biology* **12**: 153-155

Vieira M, Pissarra J, Verissimo P, Castanheira P, Costa Y, Pires E, Faro C (2001) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology* **45**: 529-539

Woleshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1991) Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* **3**: 619-628

8. ANHANG

8.1 MS-Spektren

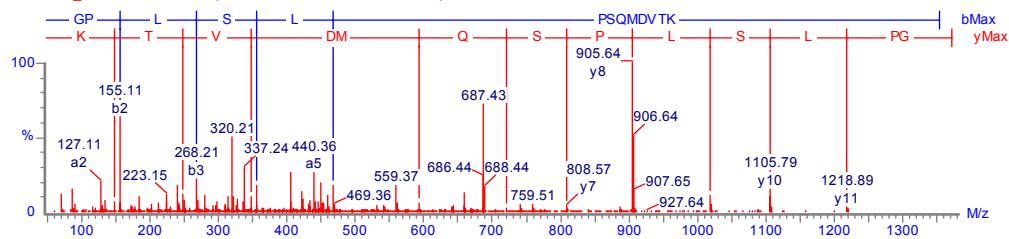
Dargestellt sind die TOF-MS/MS-Spektren der ermittelten Peptidsequenzen.

- Sequenz: n-GPLSLPSQMDVTK-c, (Spot-Nr.: 29 & 30)

Sandy S4-S25, 686.8345, 2+

axmi050803_686 AccMass 196 (Cen.4, 80.00, Ht,5000.0,0.00,1.00)

1: TOF MSMS 686.83ES+

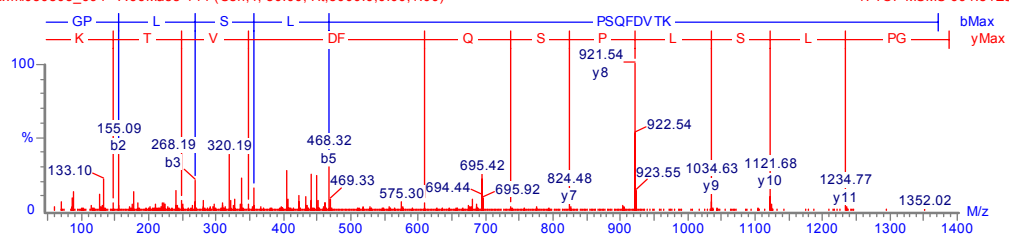


- Sequenz: n-GPLSLPSQFDVTK-c, (Spot-Nr.: 29)

Sandy S4-S25, 694.8093, 2+

axmi050803_694 AccMass 144 (Cen.4, 80.00, Ht,5000.0,0.00,1.00)

1: TOF MSMS 694.81ES+

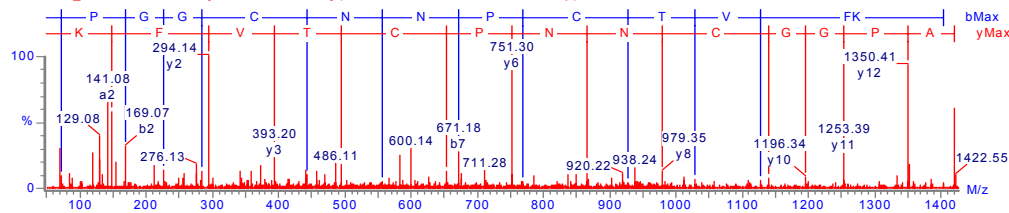


- Sequenz: n-APGGCNPCTVFK-c, (Spot-Nr.: 5, 6, 16, 19, 21, 31)

Sandy S6 5-25, 711.1466, 2+

axmi050819_711 MaxEnt 3 12 [Ev-89739, I50, En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

1: TOF MSMS 711.15ES+

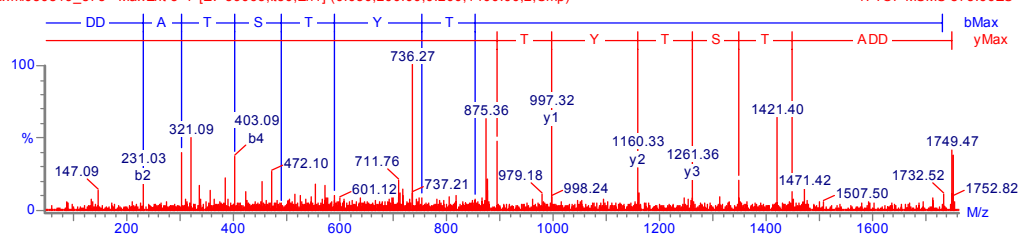


- Sequenz: n-DDATSTYTCPGGAK-c, (Spot-Nr.: 6, 16, 21)

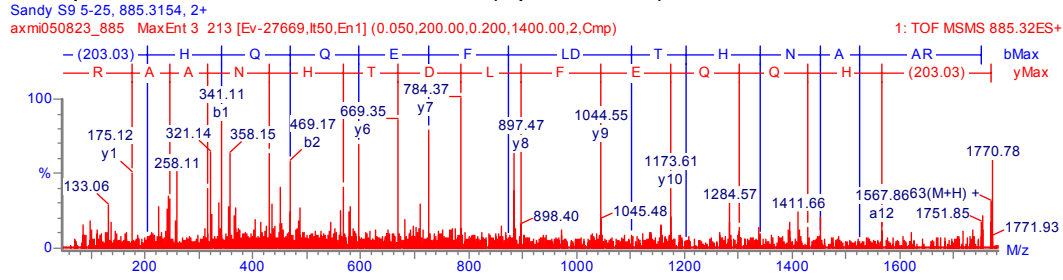
Sandy S6 5-25, 875.6583, 2+

axmi050819_875 MaxEnt 3 7 [Ev-39063, I50, En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

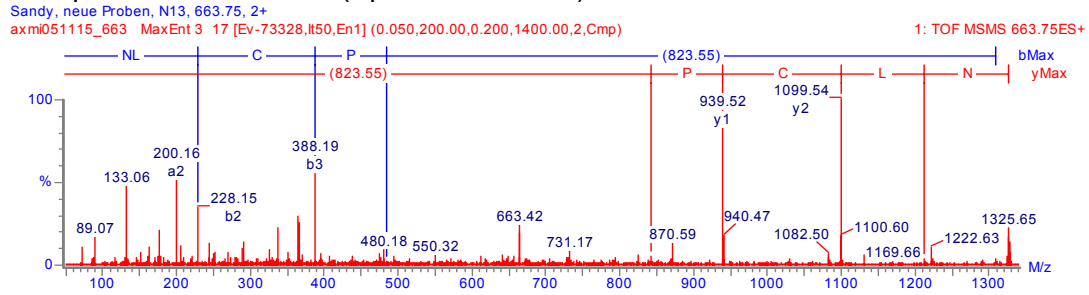
1: TOF MSMS 875.66ES+



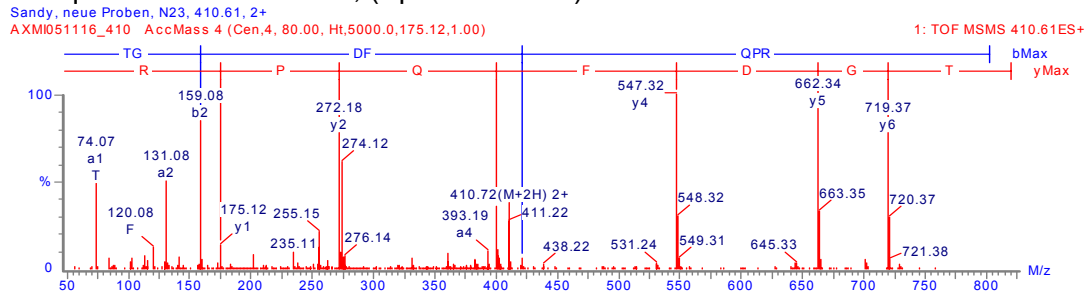
- Sequenz: n-HQQEFLDTHNAAR-c, (Spot-Nr.: 33)



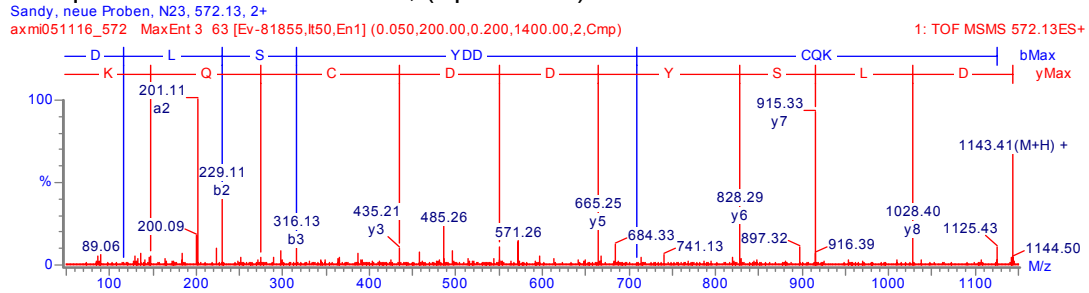
- Sequenz: n-NLC*P...-c, (Spot-Nr.: 16 & 21)



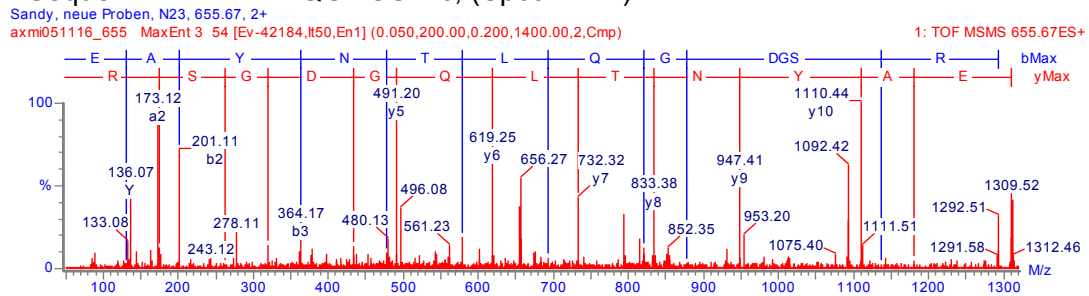
- Sequenz: n-TGDFQPR-c, (Spot-Nr.: 3 & 4)



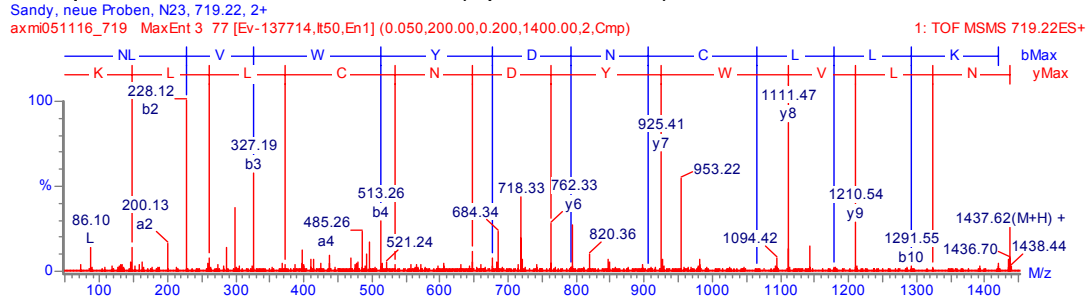
- Sequenz: n-DLSYDDC* KK-c, (Spot-Nr.: 4)



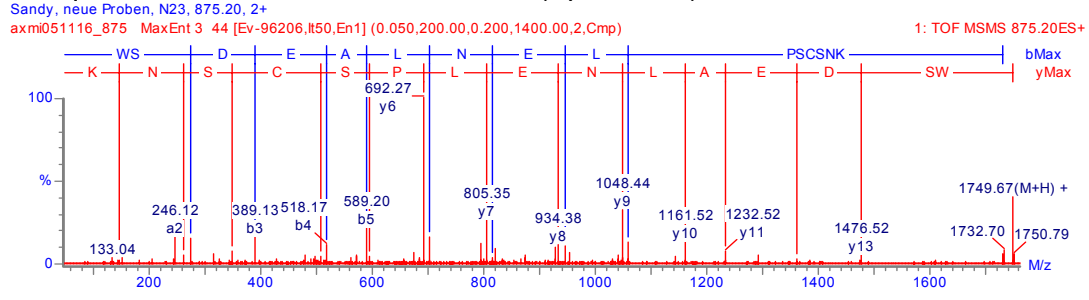
- Sequenz: n-EAYNTLQGDGSR-c, (Spot-Nr.: 4)



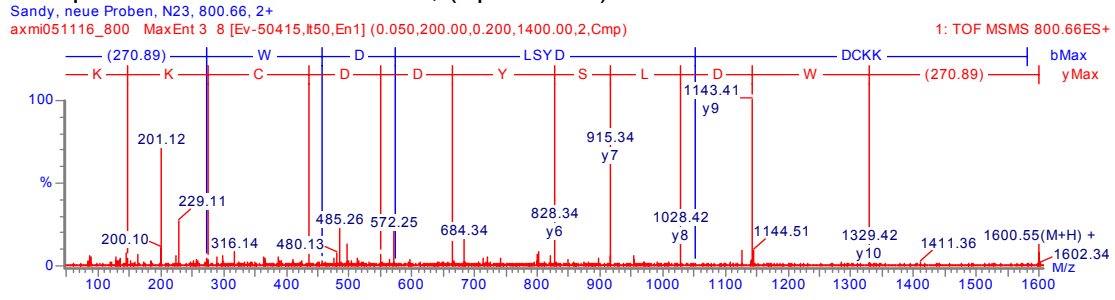
- Sequenz: n-NLVWYDNC*LLK-c, (Spot-Nr.: 1 & 4)



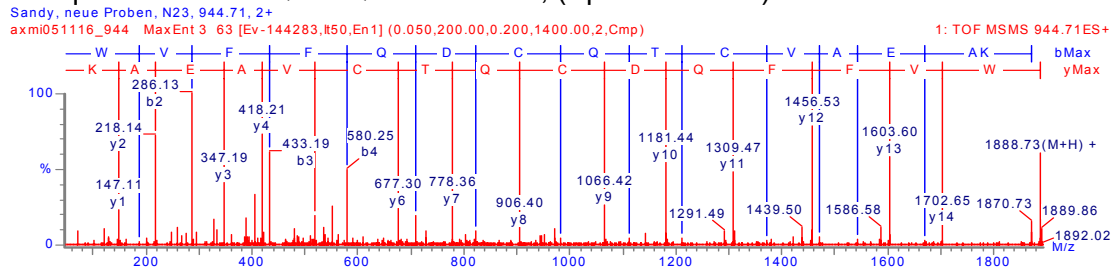
- Sequenz: n-SWDEALNELPSC*SNK-c, (Spot-Nr.: 4)



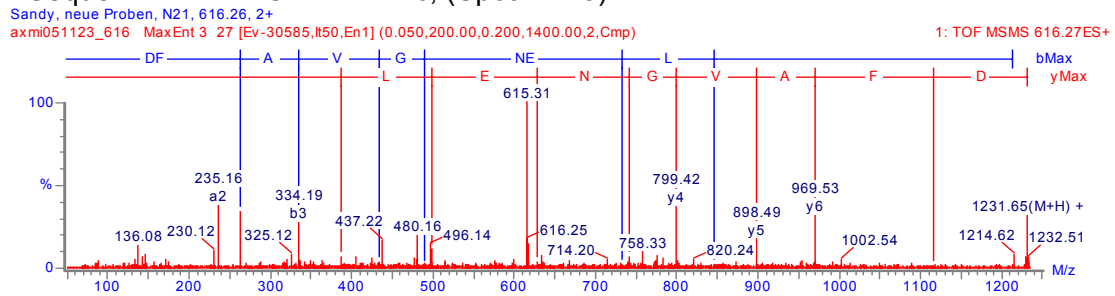
- Sequenz: n-WDLSYDDC*QK-c, (Spot-Nr.: 4)



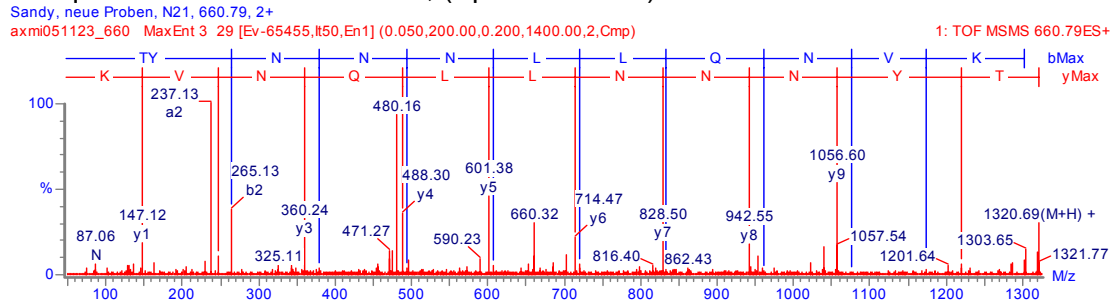
- Sequenz: n-WVFFQDC*QTC*VAEAK-c, (Spot-Nr.: 3 & 4)



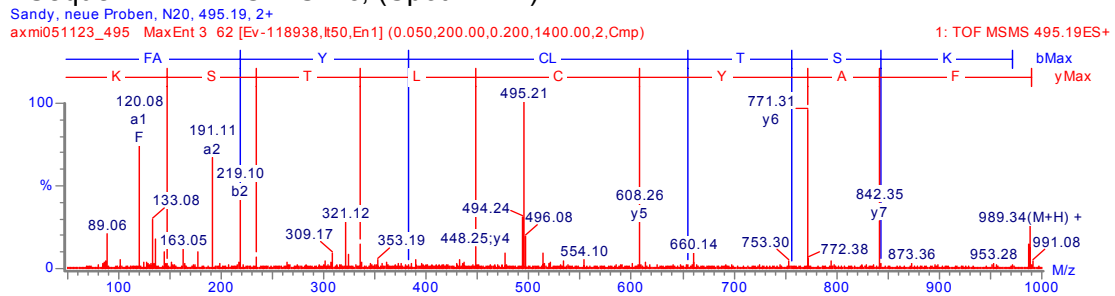
- Sequenz: n-YVAVGNELRPN-c, (Spot-Nr.: 3)



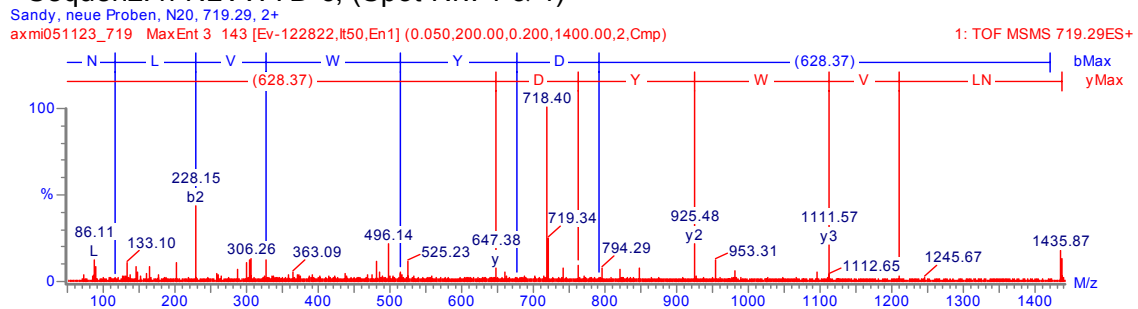
- Sequenz: n-TYNNLLQNVK-c, (Spot-Nr.: 1 & 3)



- Sequenz: n-FAYCLTSK-c, (Spot-Nr.: 1)



- Sequenz: n-NLVWYD-c, (Spot-Nr.: 1 & 4)



8.2 Verwendete PCR-Programme

Angegeben sind die jeweils verwendeten PCR-Programme, mit Dauer, Temperatur des jeweiligen Schrittes (Denaturierung, Anlagerung und Synthese) und der Anzahl der Amplifikationsschritte.

PCR 1:

- 94°C	3 min	
- 94°C	30 s	} 35x
- 60°C	60 s	
- 72°C	60 s	
- 72°C	10 min	
- 4°C	∞	

PCR 2:

- 94°C	3 min	
- 94°C	30 s	} 35x
- 57,5°C *	60 s	
- 72°C	90 s	
- 72°C	10 min	
- 4°C	∞	

(* 55, 56, 57, 68, 69, 60°C)

PCR 3:
 - 94°C 3 min
 - 94°C 30 s }
 - 57°C 60 s } 50x
 - 72°C 90 s }
 - 72°C 10 min
 - 4°C ∞

PCR 4:
 - 94°C 3 min
 - 94°C 30 s }
 - 59°C 60 s } 50x
 - 72°C 90 s }
 - 72°C 10 min
 - 4°C ∞

PCR 5:
 - 94°C 2 min
 - 94°C 15 s }
 - 55°C 30 s } 35x
 - 72°C 90 s }
 - 72°C 5 min
 - 4°C ∞

PCR 6:
 - 94°C 3 min
 - 94°C 30 s }
 - 60,5°C* 30 s } 50x
 - 72°C 60 s }
 - 72°C 7 min
 - 4°C ∞

(* 59, 60, 62°C)

PCR 7:
 - 94°C 3 min
 - 94°C 30 s }
 - 59°C 30 s } 50x
 - 72°C 2 min }
 - 72°C 7 min
 - 4°C ∞

PCR 8:
 - 94°C 3 min
 - 94°C 30 s }
 - 58,5°C* 60 s } 50x
 - 72°C 2 min }
 - 72°C 5 min
 - 4°C ∞

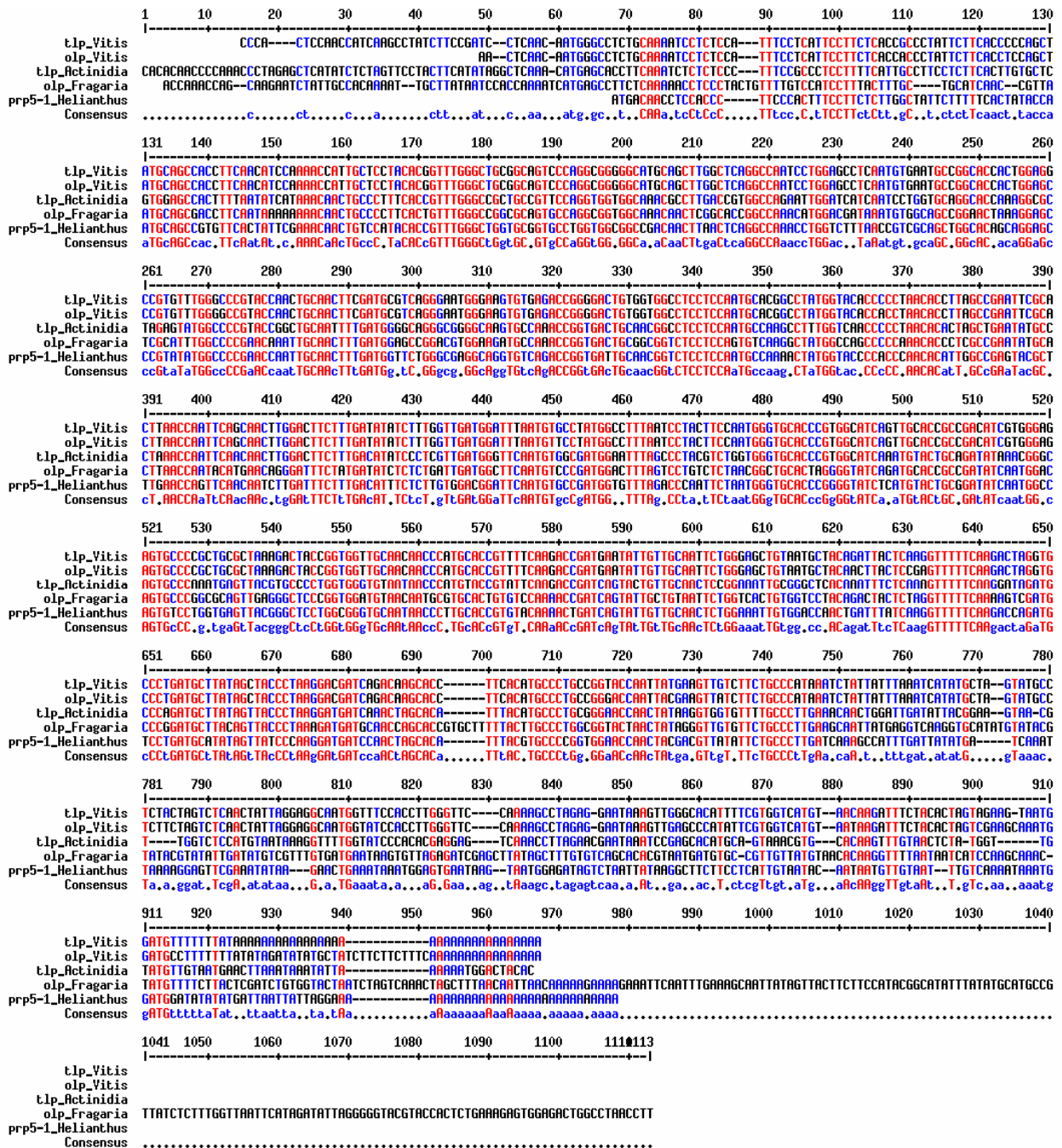
(* 57, 58, 59, 60°C)

8.3 Sequenzvergleiche und abgeleitete Oligonukleotide

Sequenzvergleich der 5 bekannten Tlp-Proteinsequenzen

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
Tlp_Vitis	M	G	L	C	K	I	L	S	I	S	F	L	L	T	L
Olp_Vitis	M	G	L	C	K	I	L	S	I	S	F	L	L	T	L
PR5-1_Helianthus	M	T	T	S	T	L	P	-	T	F	L	-	L	L	A
Olp_Fragaria	M	S	L	L	K	N	L	P	-	T	V	L	S	I	L
t1p_Actinidia	M	S	T	F	K	S	L	S	L	S	A	L	L	F	I
Consensus	M	L	K	L	S	S	L	L	L	A	L	L	L	L	L
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	227				
Tlp_Vitis	M	A	F	N	P	T	S	N	G	C	T	R	G	I	C
Olp_Vitis	M	A	F	N	P	T	S	N	G	C	T	R	G	I	C
PR5-1_Helianthus	M	A	F	N	P	T	S	N	G	C	T	R	G	I	C
Olp_Fragaria	M	A	F	N	P	T	S	N	G	C	T	R	G	I	C
t1p_Actinidia	M	A	F	N	P	T	S	N	G	C	T	R	G	I	C
Consensus	M	A	F	N	P	T	S	N	G	C	T	R	G	I	C

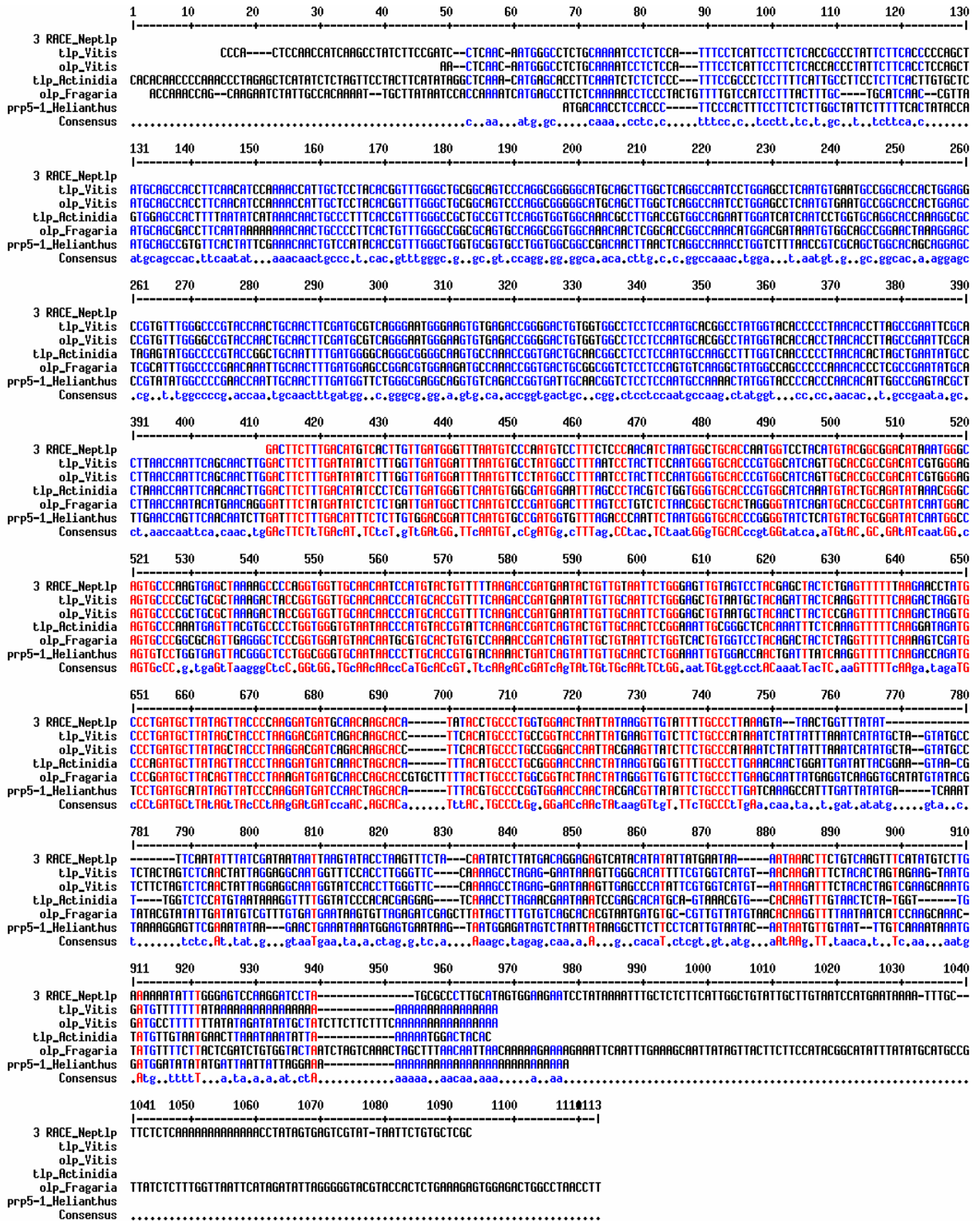
Sequenzvergleich der 5 Tlp-Proteine auf cDNA-Ebene



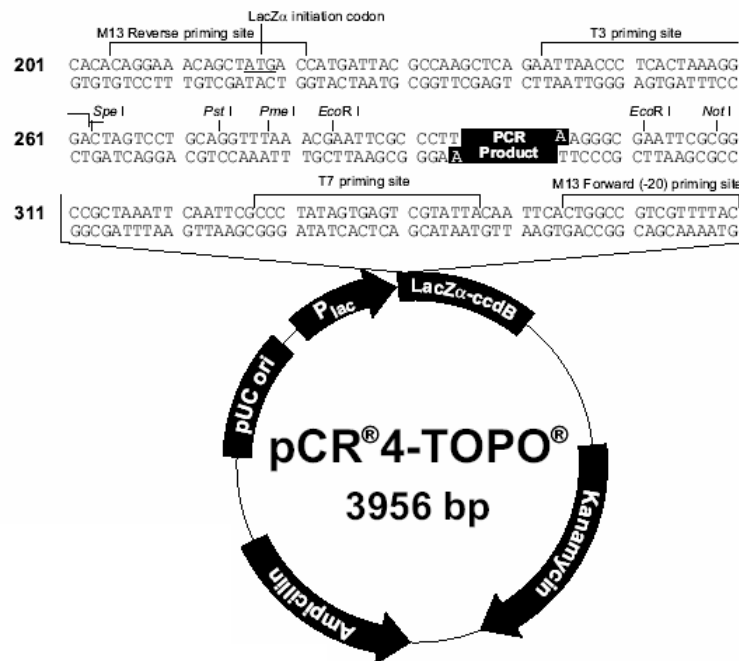
Vergleich des 5'-Endes mit den 5 bekannten *tIp*-cDNAs

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
5'RACE_NeptIp	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGGCTTTGATGAAATCCATCATCCACTTTGCGARAGAAAAAARACATGAACCGATTCAARAATTCATTG---TTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCTTATGTC													
tIp_Vitis	CCCA---CTCCACCATCAGGCTATCTCCGATC---CTCAGC---AATGGGCTCTGCARAACTCTCCAA---TTTCCCTATTCTCTCACCACCCTATCTCT													
oIp_Vitis	AA---CTCAGC---AATGGGCTCTGCARAACTCTCCAA---TTTCCCTATTCTCTCACCACCCTATCTCT													
tIp_Actinidia	CACACACCCCAACCTAGAGCTCATATCTAGTTCCTACTTCATATAGGCTCAAA---CATGAGCACCCTCAAACTCTCTCC---TTTCCGCTCTCTTTCATTGCCTCTCTCT													
oIp_Fragaria	ACCACACCAAG---CAGAGATCTATTGCGCAAAAT---TGCTATATCCACCAAAATCATGAGCTTCTCAAAACCTCTCTACTGTTTGTCCATCTTACTTTCG---TGC													
prp5-1_Helianthus	ATGACACCTCCACC---TTCCACTTTCCTCTCTTGCTATTCTTT													
Consensusc.....a.....cca.....a.....c.....t.....a.....c.....aaa.....atgagcc.....ttCAaaa.cctC.c.....Ttcc.C..tCtTtCt.tGcC.t.t.tct													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
5'RACE_NeptIp	CATATCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACACTGTGGCTATACGGCTGGGGAGCTGCTCACCGGGGGTGGCCACCAATGGACCCAGGTGAGACTTGGACCAATTAATGTTAATGCGGG													
tIp_Vitis	TCACCCAGGCTATGACAGCCACTTCACATCCAAACCAATTTGCTCTACAGGTTGGGCTGCGCAGTCCAGGCGGGGGCATGACGCTTGGCTCAGGCCAATCTGGAGCCTCAATGTAATGCGGG													
oIp_Vitis	TCACCCAGGCTATGACAGCCACTTCACATCCAAACCAATTTGCTCTACAGGTTGGGCTGCGCAGTCCAGGCGGGGGCATGACGCTTGGCTCAGGCCAATCTGGAGCCTCAATGTAATGCGGG													
tIp_Actinidia	TCACCTTGGCTATGACAGCCACTTTAATATCATAAACACTGCCCCCTTACAGGTTGGGCGCTGCGCTTCAAGTGGTGGCAGACGCTTGAACGCTGGCAGAAATGGATCATCAATCTGGTGGCAGG													
oIp_Fragaria	TCAC---CGTTAATGAGAGCCCTTCATTAARAAARACACTGCCCCCTTACAGTGGTGGGCGGCGCAGTCCAGGCGGGGGCATGACGCTTGGCTCAGGCCAATCTGGAGCCTCAATGTAATGCGGG													
prp5-1_Helianthus	TTCACTATACCAATGACAGCCGCTTCACTATTCGAAACACTGTCCATACAGGTTGGGCTGGTGGGCTGGTGGGCGGCGCAGCTTACCTCAGGCCAATCTGGTCTTACCGCTGCGAGCTGG													
Consensus	tca.ct.ca.c.aTGcaGcCaC.TTcaatAtc..AAACaCtGccccTAcR.GTtGGGC.GctGc.gt.CCaGGcGGtGGCaCaCaCtTga.c.cAGGcCAaac.TGGaCaAAtat.g.t.GC.GG													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
5'RACE_NeptIp	CCARACGGTGGTCTGTATGGGCGCACTGGGCTGAGCTTTCCGGATCAACGGGGCAGCTGCCAGCTGGCGACTGGCGGGGGTGGCCAGCTGCGGGGGTGGCCAGCTTCCCTCTACACACTTTG													
tIp_Vitis	CACCCTGGAGGCCGTGTTGGGCGCGTACCAACTGCACACTTCGATCGCTCAGGGAATGGGAGTGTGAGCCGGGGACTGTGGTGGCTCCCTCCAACTGCACGGCCTATGGTACACCCCTAACACCTTA													
oIp_Vitis	CACCCTGGAGGCCGTGTTGGGCGCGTACCAACTGCACACTTCGATCGCTCAGGGAATGGGAGTGTGAGCCGGGGACTGTGGTGGCTCCCTCCAACTGCACGGCCTATGGTACACCCCTAACACCTTA													
tIp_Actinidia	CACCARAGGCGCTGAGTATGGCCCGTACCGCTGCAATTTGATGGGGAGGGCGGGGCAAGTGGCAACCGGTTGCTGCAACGGCTCTCCCAATGCCAGCCTTGGTCAACCCCTAACACACTTA													
oIp_Fragaria	ACCTAAGGGAGCTCGACTTTGGCCCGCAACAAATGGCACTTTGATGGAGCGGACGTGGAGAGTGCARAACTCCGGTGCAGCGGGTGCAGCGGCTCCCTCCAGCTATGGCCAGCCCAACACCCCTC													
prp5-1_Helianthus	CACAGCGGGAGCCGCTATATGGCCCGCAACAAATGGCACTTTGATGGTCTGGGCGGGGAGGCTGCAGCGGGTATGCAACGGCTCTCCCAATGCCAARACTTGGTACCCCAACCAACACTTG													
Consensus	cAc.acaGGaGctcGtTaGGcCcCGAcCaA..TcAactTgat.Gg.t.Cagggcg.Gg.AgGtGcAgaCgGGtGcGcggGg.cTcCTCAATGccaag.CtatGG..c.c.Cc.AARAC.t.T.													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
5'RACE_NeptIp	GCTGAGTACTCATTGACCAAGTGCACAACTTGGACTTCTTGGCATGTCTTGTGATGGATTAATGTCCCAATGCTTTTCCCAACACTTAAATGGTGCACCAATGGTCCCTCATGTACGGGG													
tIp_Vitis	GCCGAAATCGCACCTTAAACCAATTCAGCACTTGGACTTCTTGTATATATCTTTGGTGTGATGGATTAATGTCCCAATGCTTTTCCCAACACTTAAATGGTGCACCAATGGTCCCTCATGTACGGGG													
oIp_Vitis	GCCGAAATCGCACCTTAAACCAATTCAGCACTTGGACTTCTTGTATATATCTTTGGTGTGATGGATTAATGTCCCAATGCTTTTCCCAACACTTAAATGGTGCACCAATGGTCCCTCATGTACGGGG													
tIp_Actinidia	GCTGAAATCGCACCTTAAACCAATTCAGCACTTGGACTTCTTGTATATATCTTTGGTGTGATGGATTAATGTCCCAATGCTTTTCCCAACACTTAAATGGTGCACCAATGGTCCCTCATGTACGGGG													
oIp_Fragaria	GCTGAAATCGCACCTTAAACCAATTCAGCACTTGGACTTCTTGTATATATCTTTGGTGTGATGGATTAATGTCCCAATGCTTTTCCCAACACTTAAATGGTGCACCAATGGTCCCTCATGTACGGGG													
prp5-1_Helianthus	GCCGATGACGCTTAAACCAATTCAGCACTTGGACTTCTTGTATATATCTTTGGTGTGATGGATTAATGTCCCAATGCTTTTCCCAACACTTAAATGGTGCACCAATGGTCCCTCATGTACGGGG													
Consensus	GcCgAaTAcgCact.AACCAaTcAacAAcTtGAcTtTcT.GcAt.G.TcT.Gt.Gt.GgAaTtCAAGT.G.cTTTAg.CctAc.TCtaAaGgTGCACcgtGGtAcCa.a.TGAC.GC.G													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
5'RACE_NeptIp	A													
tIp_Vitis	ACATCGTGGAGAGTGCACCCGCTGCGCTAAGACTACCGGTTGCAACACCCATGCACCGTTTTCAGACCCGATGAATATTGTCGAATCTGGGAGCTGTAATGCTACAGATTACTCAGGTTTTT													
oIp_Vitis	ACATCGTGGAGAGTGCACCCGCTGCGCTAAGACTACCGGTTGCAACACCCATGCACCGTTTTCAGACCCGATGAATATTGTCGAATCTGGGAGCTGTAATGCTACAGATTACTCAGGTTTTT													
tIp_Actinidia	ATATAAAGCGGAGTGCACCCGCTGCGCTAAGACTACCGGTTGCAACACCCATGCACCGTTTTCAGACCCGATGAATATTGTCGAATCTGGGAGCTGTAATGCTACAGATTACTCAGGTTTTT													
oIp_Fragaria	ATATAAAGCGGAGTGCACCCGCTGCGCTAAGACTACCGGTTGCAACACCCATGCACCGTTTTCAGACCCGATGAATATTGTCGAATCTGGGAGCTGTAATGCTACAGATTACTCAGGTTTTT													
prp5-1_Helianthus	ATATAAAGCGGAGTGCACCCGCTGCGCTAAGACTACCGGTTGCAACACCCATGCACCGTTTTCAGACCCGATGAATATTGTCGAATCTGGGAGCTGTAATGCTACAGATTACTCAGGTTTTT													
Consensus	Atatcaa.gg.cagtgccc.g.tgagtta.gggctcc.ggtgg.tg.aa.aacc.tgaccctg.t.caa.accgatcagatattgtgcaa.tctgg.aa.tgtgg.cca.aat.ctc.a.gtttt													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
5'RACE_NeptIp	CAGACTAGGTGCCCTGATGCTTATAGCTACCCTAGGACGATCAGCAGCACC---TTCCATGCCCTCCGGTACCAATATGAAATGCTTCTGCCATAAATCTATTATTAATCATATG													
tIp_Vitis	CAGACTAGGTGCCCTGATGCTTATAGCTACCCTAGGACGATCAGCAGCACC---TTCCATGCCCTCCGGTACCAATATGAAATGCTTCTGCCATAAATCTATTATTAATCATATG													
oIp_Vitis	CAGACTAGGTGCCCTGATGCTTATAGCTACCCTAGGACGATCAGCAGCACC---TTCCATGCCCTCCGGTACCAATATGAAATGCTTCTGCCATAAATCTATTATTAATCATATG													
tIp_Actinidia	CAGAGTATGATGCCCGATGCTTATAGTATACCTTAGGATGATCAACATGACACA---TTTACTGCCCTCCGGGACCAACTATAGGTTGGTGTGGCCCTTGAAACCACTGGATGATATACG													
oIp_Fragaria	CAGAGTATGATGCCCGATGCTTATAGTATACCTTAGGATGATCAACATGACACA---TTTACTGCCCTCCGGGACCAACTATAGGTTGGTGTGGCCCTTGAAACCACTGGATGATATACG													
prp5-1_Helianthus	CAGAGTATGATGCCCGATGCTTATAGTATACCTTAGGATGATCAACATGACACA---TTTACTGCCCTCCGGGACCAACTATAGGTTGGTGTGGCCCTTGAAACCACTGGATGATATACG													
Consensus	caaga.tagatgccc.gatgctatagttaccctaaagatgatc.aac.agcac.....tttac.tgcccct..gg.accaacta..a.gtt.t.t.ctgcccctgaa.caa.t...t.gat.atatg													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
5'RACE_NeptIp	CTA---GTATGCTCTTCTAGTCTCACTATTAGGAGCAATGGTTCCACCTGGGTTCC---CAARAGCCTAGAG---GAATAAAGTTGGGCAATTTTCTGGTCTATG---AACAGATTTCTACACTAG													
tIp_Vitis	CTA---GTATGCTCTTCTAGTCTCACTATTAGGAGCAATGGTTCCACCTGGGTTCC---CAARAGCCTAGAG---GAATAAAGTTGGGCAATTTTCTGGTCTATG---AACAGATTTCTACACTAG													
oIp_Vitis	CTA---GTATGCTCTTCTAGTCTCACTATTAGGAGCAATGGTTCCACCTGGGTTCC---CAARAGCCTAGAG---GAATAAAGTTGGGCAATTTTCTGGTCTATG---AACAGATTTCTACACTAG													
tIp_Actinidia	GAA---GTAAC---CGT---TGGCTCCATGTAATAAAGGTTTGGTATCCACACGAGGAG---TCARACCTTAGACGAAATTAATCCGAGCAGTGC---GTAARAGT---CACAGTTTGTACTACTA													
oIp_Fragaria	CATATGTAATGATACGATATACGATATATGATATGCTGTTTGGTGAATAAAGTTGTAAGAGTGCAGCTTATAGCTTTGTGTGCTACACGATATAGGTTGTGTCTGCCCTTGAAACCACTGGATGATACG													
prp5-1_Helianthus	A---TCARATTAARAGGAGTTCGAATATA---GAACTGAATAAATGGGATGAATAG---TAATGGAGATGCTATATTAAGGCTTCTCTCATTTGATATAC---AATATGTTGATAT---TTG													
Consensus	...t.a..c.t.....t.t.c.a..t.t.....g...tg...t.....g.....aaagc.tagag..aa.a.a...g...c.t.c.cgt.gt.atg...a.ag.t.t.aa...t..													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
5'RACE_NeptIp	TAGAG---TAATGATGTTTTTTTATAAAAAAARAAAAA---AAAAAARAAAAA													
tIp_Vitis	TCGAGCAATGATGCTTTTTTATATAGATATATGCTATCTTCTTTCARAAAAAARAAAAA													
oIp_Vitis	TGGT---TGATGTGTAATGAATTAATTAATTAATTA---AAAAATGACTACAC													
tIp_Actinidia	TCCAGCAAC---TATGTTTCTTACTGATCTGTGGTACTATCTAGTCAACTAGCTTTACAAATTAACAAAAGAAAAGAAATTCATTTGAAGCAATATATAGTACTTCTCCATCAGGCAATTT													
oIp_Fragaria	TCAAAATTAATGATGATATATATGATTAATTAATGAA---AAAAAARAAAAAARAAAAA													
prp5-1_Helianthus	T...aa...aatg.atg..t.t..t.....a...a.....a.....aaaa..aa.aa.aaa.....													
Consensus													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1125				
5'RACE_NeptIp	ATATGATGCCGTTATCTTTGGTAAATTCATAGATATAGGGGGTACGTACCACCTCTGAAGAGTGGAGACTGGCCTACCTT													
tIp_Vitis														
oIp_Vitis														
tIp_Actinidia														
oIp_Fragaria														
prp5-1_Helianthus														
Consensus													

Vergleich des 3'-Endes mit den 5 bekannten *tIp*-cDNAs



- pCR® 4-TOPO®

**Karte des Vektors pCR® 4-TOPO®**

Die Gesamtgröße des Vektors beträgt 3956 bp. Der Vektor trägt zwei Antibiotikaresistenzgene, welche der Selektion dienen.

Der Abschnitt des *LacZ*-Reportergens ist vergrößert dargestellt. Dieses beinhaltet die multiple Klonierungsstelle, in der das PCR-Produkt mit PolyA-Überhang inseriert werden kann. Weiterhin sind verschiedene Oligonukleotid-Bindestellen zu sehen, wie M13 reverse und T7, die zur Sequenzierung genutzt wurden.

8.5 Verwendete Puffer und Lösungen**Quantifizierung der Proteine****Bradfordreagenz, 5x**

100 mg Coomassie Brilliantblau G 250
59,4 ml Ethanol
125 ml o-Phosphorsäure (85%-ig)
65,6 ml ddH₂O

Trenngelpuffer

0,8% (w/v) SDS
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer

0,4% (w/v) SDS
0,25 M Tris-HCl, pH 6,8

SDS-PAGE und 2D-Elektrophorese**Laemmli-Gel****Polyacrylamid-Lösung**

Rotiphorese® -Gel 30
NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%
(29:1), Roth

Laufpuffer, 10x

1% (w/v) SDS
0,25 M Tris-HCl, pH 8,3
1,92 M Glycin

Probenpuffer, 1x

0,1% (w/v) Bromphenolblau
5% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerin
60 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1 M DTT

Schägger/von Jagow-GelPolyacrylamid-Lösung

Rotiphorese® -Gel 40
NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40%
(37,5:1), Roth

RGB (Running gel buffer), 3x

0,3% (w/v) SDS
3 M Tris-HCl, pH 8,45

Anodenpuffer

0,01% (w/v) Natriumazid
0,1% (w/v) SDS
200 mM Tris-HCl, pH 8,9

Kathodenpuffer

0,1% (w/v) SDS
0,1 M Tris-Base
0,1 M Tricin

TSN-Probenpuffer, 3x

0,1% (w/v) Serva Blau G
6% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerin
250 mM Tris-HCl, pH 6,8

2D-ElektrophoreseIEF-Probenpuffer

2% (v/v) IPG-Puffer
4% (w/v) CHAPS
8 M Harnstoff

Rehydrationspuffer

0,002% (w/v) Bromphenolblau
0,28% (w/v) DTT
0,5-2% (v/v) IPG-Puffer
2% (w/v) CHAPS
8 M Harnstoff

SDS-Äquilibriumspuffer

0,002% (w/v) Bromphenolblau
2% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerin
50 mM Tris-HCl, pH 8,8
8 M Harnstoff

Färbereagenzien**Sensitive Coomassie-Färbung**Fixierlösung

2% (v/v) o-Phosphorsäure
30% (v/v) Ethanol

Färbelösung

0,02% (w/v) Coomassie Brilliant-
blau G 250
2% (v/v) o-Phosphorsäure
5% (w/v) Aluminiumphosphat
10% (v/v) Ethanol

Entfärber

2% (v/v) o-Phosphorsäure
10% (v/v) Ethanol

Kolloidale Coomassie-FärbungFixierlösung

1% (v/v) o-Phosphorsäure
20% (v/v) Methanol

Roti®-Blue-Färbelösung

20% (v/v) Methanol
20% (v/v) Roti®-Blue (5x)

Waschlösung

25% (v/v) Methanol

Stabilisierungslösung

20% (w/v) Ammoniumsulfat

Trocknungslösung

10% (v/v) Glycerin
20% (v/v) Ethanol

SilberfärbungFixierlösung

12% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) Methanol

Waschlösung

50% (v/v) Ethanol

Vorbehandlungslösung

0,02% (w/v) Natriumthiosulfat

Silberreagenz

0,075% (v/v) Formaldehyd

0,2% (w/v) Silbernitrat

Entwickler4*10⁻⁴% (w/v) Natriumthiosulfat

0,05% (v/v) Formaldehyd

6% (w/v) Natriumcarbonat

Konservierungslösung

4,6% (v/v) Glycerin

12% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) Methanol

Entfärber

30 mM Kaliumferricyanid

100 mM Natriumthiosulfat

PAS-FärbungFixierlösung

10% (v/v) Essigsäure

70% (v/v) Methanol

Periodlösung

1% (w/v) Periodsäure

30% (v/v) Essigsäure

Schiffs-Reagenz

Fertiglösung von Roth

PeptidextraktionReduktionsmittel

0,01 mM DTT

10 mM Ammoniumcarbonat

Alkylierungsreagenz

55 mM Iodacetamid

100 mM Ammoniumbicarbonat

DNA-PräparationCTAB-Extraktionspuffer, 2x1 g Polyvinylpyrrolidon Mr 40.000
(PVP-40)

2 g Cetyltrimethylammoniumbromid

8,18 g NaCl

4 ml 0,5 M EDTA

10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0

ad 100 ml mit ddH₂OTAE-Puffer

1 mM EDTA

40 mM Tris-Acetat, pH 8,0

Lade-Puffer, 6x

30% (v/v) Glycerin

1 Spatelspitze Bromphenolblau

NährmedienLB- (Luria-Bertani) Medium

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl, pH 7

10 g Trypton

ad 1000 ml mit ddH₂O

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

Besonders natürlich bei Herrn PD Dr. Axel Mithöfer für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für seine Hilfe, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Einen großen Dank an Frau Prof. Dr. Erika Kothe für die Betreuung von Seiten der Universität Jena.

Vielen Dank an Prof. Dr. Wilhelm Boland für die Ermöglichung dieser Arbeit in der Abteilung für Bioorganische Chemie.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern der Botanischen Gärten vor allem bei Herrn Schottler aus München und Herrn Bopp aus Jena bedanken, die mir das Pflanzenmaterial zur Verfügung stellten. Besonderer Dank gilt hierbei Karin Schmieja vom Botanischen Institut München, die immer für Nachschub an Kannensaft gesorgt hat. Ebenso danke ich Herrn Knabe und besonders Herrn Fehring aus Jena, für die Hilfe beim Ablichten der Pflanzen, für das Halten der Leiter und die damit verbundene Vermeidung von Unfällen.

Ebenfalls ein großes Dankeschön an die gesamte Abteilung der Bioorganischen Chemie am MPI in Jena. Besonders danke ich Margit für die kritische Durchsicht des Manuskripts der hier vorliegenden Arbeit, die vielen guten Ratschläge und Diskussionen und nicht zu vergessen für die netten Abende in der Kneipe zum Ausklang der Arbeit. Heiko danke ich für die Tips zur Proteinanalytik und für den Transport der Kannensaftproben von München nach Jena. Einen Dank auch an Andrea und Regina für die gute Unterhaltung im Büro.

Weiter danke ich Annika, Stefan, Andreas, Birgit und Doreen für die netten Mittagspausen und die schönen Abende außerhalb des Labors, und Nicolas, Vera, Daniela, Vertica, Veronica, Stefano und Gen für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Anschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, besonders bei Tante Uta und Onkel Rob für die finanzielle Unterstützung vor allem gegen Ende des Studiums, bei meinen Eltern und meiner Oma, die mich durchfütterten, wenn das Geld mal wieder knapp wurde, und bei meiner Schwester Lysann.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die hier aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Jena, den 28.02.2006

Sandy Rottloff