

**Heterologe Expression pflanzlicher Katalasen
unterschiedlicher Lichtempfindlichkeit und Vergleich
ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Nicole Engel
aus Frankfurt am Main**

Frankfurt am Main 2004

(D F 1)

vom Fachbereich
der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS I

DEZIMALE ERWEITERUNGEN III

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 19

2. 1. CHEMIKALIEN	19
2. 2. DNA-ANALYSE: ALLGEMEINE TECHNIKEN	19
2.2.1. DNA-ISOLIERUNG	20
2.2.1.1. Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	20
2.2.1.2. Genomische DNA-Isolierung von <i>Pichia pastoris</i>	21
2.2.1.3. DNA-Isolierung aus <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen	22
2.2.2. RNA-VERDAU UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	23
2.2.3. RESTRIKTION DER DNA	23
2.2.4. POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	24
2.2.5. GELELEKTROPHORESE VON RESTRIKTIONSVERDAUTER DNA UND VON PCR-ANSÄTZEN	24
2.2.6. ELUTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS EINEM AGAROSEGEL	26
2.2.7. LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	26
2.2.8. SOUTHERN BLOT	26
2.2.9. SEQUENZIERUNG	28
2.3. ARBEITEN MIT <i>ESCHERICHIA COLI</i>	29
2.3.1. BAKTERIENANZUCHT	29
2.3.2. TRANSFORMATION UND CRACKING	30
2.4. HEFESYSTEME	32
2.4.1. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	32
2.4.1.1. Medien und Anzucht	33
2.4.1.2. Vektoren und Konstrukte	33
2.4.1.3. Transformation, Selektion und Induktion der Katalaseexpression	36
2.4.1.4. Hefeaufschluss	37
2.4.2. <i>PICHIA PASTORIS</i> UND <i>HANSENULA POLYMORPHA (PICHIA ANGUSTA)</i>	37
2.4.2.1. Medien und Anzucht	38
2.4.2.2. Vektoren und Konstrukte	39
2.4.2.3. Transformation, Selektion und Induktion der Katalaseexpression	41
2.4.2.4. Hefeaufschluss	43
2.5. DAS BACULOVIRUSSYSTEM	44
2.5.1. MEDIEN UND ANZUCHT	44
2.5.2. VEKTOREN UND KONSTRUKTE	45
2.5.2.1. <i>In vitro</i> Mutagenese der Katalase von <i>Soldanella alpina</i>	47
2.5.3. HERSTELLUNG REKOMBINANTER BACULOVIREN	49
2.5.3.1. Transfektion und Plaque-Test	51
2.5.4. HERSTELLUNG EINER VIRENARBEITSLÖSUNG	52
2.5.5. OPTIMIERUNG DER KATALASEEXPRESSION IN <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> -ZELLEN	53
2.5.6. HETEROLOGE KATALASEEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN	54

2.6. PROTEINEXTRAKTION UND PROTEINREINIGUNG	55
2.6.1. ISOLIERUNG VON KATALASE AUS ROGGENBLÄTTERN	55
2.6.2. ISOLIERUNG VON KATALASE AUS SONNENBLUMENKOTYLEDONEN	56
2.6.3. ALLGEMEINE PROTEINREINIGUNGSVERFAHREN	58
2.6.3.1. Chloroform-Ethanol-Fällung	58
2.6.3.2. Ammoniumsulfat-Fällung	58
2.6.3.3. Säulenchromatographie	59
2.6.3.3.1. Sephadex G-25	59
2.6.3.3.2. Sephacryl S 300 HR	59
2.6.3.3.3. Phenylsepharose	59
2.6.3.3.4. IMAC	60
2.7. PROTEINANALYSE	61
2.7.1. SDS-GELELEKTROPHORESE	61
2.7.1.1. Coomassie-Färbung	62
2.7.1.2. Western-Blot	63
2.7.2. PROTEINBESTIMMUNG	64
2.7.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry	65
2.7.2.2. Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	66
2.7.2.3. Proteinbestimmung mit Roti [®] -Nanoquant	66
2.7.3. NACHWEIS VON SPEZIFISCHER NADPH-BINDUNG	67
2.8. BESTIMMUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN	68
2.8.1. MESSUNG DER KATALASEAKTIVITÄT	68
2.8.1.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität von Katalasen	69
2.8.1.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten	69
2.8.1.3. Bestimmung des pH-Optimums der Katalase von <i>Secale cereale</i>	70
2.8.1.4. Einfluss von Inhibitoren auf die Katalaseaktivität	70
2.8.1.5. Einfluss von Ascorbat auf die Katalaseaktivität	71
2.8.2. BESTIMMUNG DER PEROXIDATISCHEN AKTIVITÄT VON KATALASEN	71
2.8.3. GLYCOLAT-OXIDASE-TEST	73
2.9. INKUBATIONEN	74
2.9.1. STARKLICHTINAKTIVIERUNG	74
2.9.2. INKUBATION MIT SUPEROXID	74
2.10. ELEKTRONENMIKROSKOPIE	75
2.10.1. RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	75
2.10.2. TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE	75
2.11. COMPUTERGESTÜTZTE STRUKTURANALYSEN	76
3. ERGEBNISSE	77
<hr/>	
3.1. DARSTELLUNG DER KATALASE-KLONE UND SEQUENZEN	77
3.2. KLONIERUNG UND MODIFIZIERUNG DER DNA UND VERSUCH DER HETEROLOGEN EXPRESSION FUNKTIONELLER PFLANZLICHER KATALASEN IN HEFE	80
3.3. KLONIERUNG UND MODIFIZIERUNG DER DNA UND HETEROLOGE EXPRESSION FUNKTIONELLER PFLANZLICHER KATALASEN IM BACULOVIRUSSYSTEM	86
3.4. VERGLEICH DER PHOTOOXIDATIVEN UND OXIDATIVEN INAKTIVIERUNG PFLANZLICHER KATALASEN	93
3.4.1. STARKLICHTINAKTIVIERUNG VON KATALASEN	93
3.4.2. SUPEROXID-VERMITTELTE INAKTIVIERUNG VON KATALASEN	95
3.4.3. NADPH-BINDUNG VON KATALASEN	97
3.5. VERGLEICH DER KATALYTISCHEN EIGENSCHAFTEN	101
3.5.1. ERMITTLUNG DER SPEZIFISCHE AKTIVITÄT PFLANZLICHER KATALASEN	101
3.5.2. BESTIMMUNG DER MICHAELIS-MENTEN KONSTANTEN	103
3.5.3. WIRKUNG VON INHIBITOREN UND ASCORBAT AUF DIE KATALASEAKTIVITÄT	105
3.5.4. VERGLEICH DER PEROXIDATISCHEN AKTIVITÄTEN	108

3. 6. VERGLEICH DER REKOMBINANTEN KATALASE VON <i>HOMOZYNE ALPINA</i> MIT KATALASEN VON <i>HELIANTHUS ANNUUS</i>	111
3. 7. <i>IN VITRO</i> MUTAGENESE UND STARKLICHTBEHANDLUNG MUTAGENISierter KATALASE VON <i>SOLDANELLA ALPINA</i>	118
4. DISKUSSION	123
5. ZUSAMMENFASSUNG	146
6. LITERATUR	148
7. ANHANG	163
8. DANKSAGUNG	171

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
A. bidest.	Bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin Diphosphat
ATP	Adenosin Triphosphat
APx	Ascorbatperoxidase
BDMA	N-Benzyl dimethylamin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BMG-Medium	gepuffertes Minimal Glycerol-Medium
BMGY-Medium	gepuffertes Glycerol-Komplexmedium
BMM-Medium	gepuffertes Minimal Methanol-Medium
BMMY-Medium	gepuffertes Methanol- komplexmedium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Car	Carotinoide
cDNA	complementary DNA
Chl	Chlorophyll
Cpd I	Compound I
CIAP	Calf Intenstine Alklaline Phosphatase
Da	Dalton (1 Da = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
DDSA	Dodecyenyl Succinic Anhydride
DHA	Dehydroascorbat
DHAR	Dehydroascorbat-Reduktase
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionkoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fg	Frischgewicht
F_m	maximale Fluoreszenz
F_v	variable Fluoreszenz
FKS	fötales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)1-Piperazin-Ethansulfonsäure
g	Gramm
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung
Hg.	Herausgeber
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IMAC	Immobilized-metal-ion-affinity chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
J	Joule

kat	Katal
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
m	Meter
M	Molar
max.	maximal
MCS	multiple cloning site
MD-Medium	Minimal Dextrose-Medium
MDA	Monodehydroascorbat
MDAR	Monodehydroascorbat-Reduktase
MDY-Medium	Minimal Glycerol-Medium
min	Minute
MM-Medium	Minimal Methanol
MNA	Methyl Nadic Anhydride
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NAD	Nikotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nikotinamidadenindinucleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nikotinadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pos.	Position
PMSR	Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PTS1	peroxisomale Targeting-Sequenz 1
PTS2	peroxisomale Targeting-Sequenz 2
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffformen
RT	Raumtemperatur
RubisCo	Ribulosebiphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sf9	Insektenzelllinie 9 von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TAP	Tris-Acetat-Puffer
TBE	Tris-Borat-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)n
Trolox	2-Carboxy-2,5,7,8-Tetramethyl-6-Chromanol
Tween 20	Polyoxy-Ethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
u. a.	unter Anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume per volume
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
Wdh.	Wiederholung
w/v	weight per volume
Xgal	5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
z. B.	zum Beispiel

Dezimale Erweiterungen

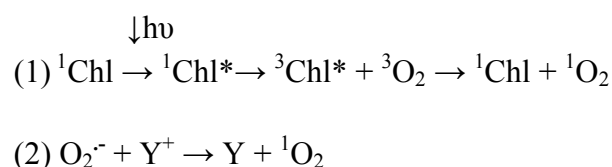
M	mega	x 1 000 000	x 10 ⁶
k	Kilo	x 1 000	x 10 ³
c	Zenti	/ 100	x 10 ⁻²
m	Milli	/ 1 000	x 10 ⁻³
μ	Micro	/ 1 000 000	x 10 ⁻⁶
n	Nano	/ 1 000 000 000	x 10 ⁻⁹

1. Einleitung

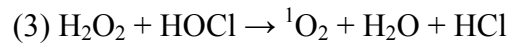
„Alle Wesen leben vom Lichte, jedes glückliche Geschöpf, die Pflanze selbst, kehrt freudig zurück zum Licht.“ (Friedrich Schiller, Wilhelm Tell)

Licht gilt nicht nur in der klassischen deutschen Literatur als einer der wichtigsten Faktoren für die Entstehung und Beibehaltung des Lebens. Durch die Autotrophie der Pflanzen kann diese immense Energie, welche im Sonnenlicht vorhanden ist, chemisch nutzbar gemacht werden, um so zur Lebenserhaltung beizutragen. Der Photosyntheseapparat der Pflanzen ermöglicht die Umwandlung von Lichtenergie in energiereiche organische Verbindungen. Dennoch ist die Energie des Lichtes nicht nur die treibende Kraft der Photosynthese, sie kann der Pflanze auch Schaden zufügen (Barber und Andersson, 1992). Die durch Lichtabsorption ausgelöste Entstehung von reaktiven Sauerstoffen (ROS) wird als photooxidativer Stress definiert (Foyer et al., 1994). Als ROS werden unvollständig reduzierte Sauerstoffe bezeichnet, welche durch erhöhte Reaktionsfreudigkeit selbst unter moderaten Reaktionsbedingungen eine große Bandbreite von Biomolekülen oxidieren und somit schädigen können. Da Pflanzen nicht nur einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre ausgesetzt sind, sondern Sauerstoff selbst während der Photosynthese produzieren, sind sie im Vergleich zu Tieren, Bakterien und Pilzen einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt (Baier und Dietz, 1999). Die dabei im Chloroplasten entstehenden Produkte Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) und der Singulett-Sauerstoff (1O_2), müssen entgiftet werden, da sie sonst irreversible Schäden in der Zelle verursachen (Fridovich, 1978; Asada und Takahashi, 1987; Salin, 1989; Lidon und Henriques, 1993; Foyer et al., 1994; Asada, 1999).

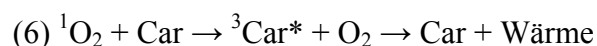
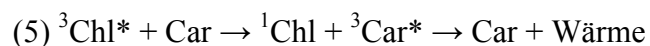
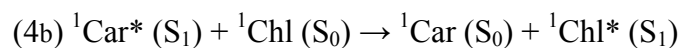
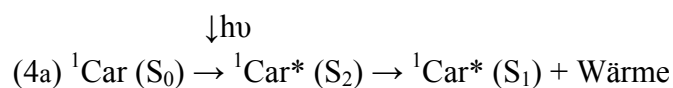
Singulett-Sauerstoff kann bei Pflanzen z. B. durch Energieübertragung von einem angeregten Chlorophyllmolekül auf molekularen Sauerstoff (Gleichung 1) oder mittels Elektronenübertragung von Superoxid auf einen oxidierten Elektronenakzeptor (Gleichung 2) entstehen.



Bei tierischen Zellen wird Singulett-Sauerstoff ebenfalls gebildet. So kann z. B. während der Phagocytose von Neutrophilen H_2O_2 durch HOCl oxidiert werden (Gleichung 3), dabei entsteht als Nebenprodukt $^1\text{O}_2$ (Asada und Takahashi, 1987; Salin, 1987; Lidon und Henriques, 1993; Foyer et al., 1994; Asada, 1999).



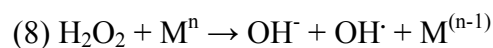
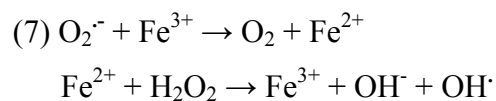
Im Chloroplasten ist Singulett-Sauerstoff an einer Vielzahl von Schäden beteiligt, unter anderem an der Photoinhibition des PSII: Durch hohe Lichtintensitäten kommt es zur Überreduktion der Elektronenakzeptoren Q_A und Q_B und des Plastochinonpools. Das dabei durch Ladungsrekombination zwischen $\text{P680}^+/\text{Phe}^-$ entstehende Triplet-Chlorophyll P680 (*P680) wird durch $^3\text{O}_2$ gequenchet, was zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führt. $^1\text{O}_2$ verursacht dann die oxidative Schädigung des D1 Proteins, was zu seinem proteolytischen Abbau führt (Lidon und Henriques, 1993; Aro et al., 1993; Keren et al., 1997; Trebst et al., 2002). Zur Entgiftung und Vermeidung von Singulett-Sauerstoff fungieren im Chloroplasten die Carotinoide, die als Antennenpigmente an der Weitergabe der Lichtenergie zum photosynthetischen Reaktionszentrum beteiligt sind (Gleichung 4a und 4b). Überschüssige Energie geben sie dabei in Form von Wärme ab (Gleichung 4a). Aufgrund dieser Eigenschaft können sie der Entstehung von $^1\text{O}_2$ vorbeugen, indem sie angeregtes Triplet-Chlorophyll wieder in den Grundzustand zurückversetzen (Gleichung 5) oder mit Singulett-Sauerstoff direkt interagieren (Gleichung 6) (Young and Britton, 1990; Pallett und Young, 1993; Demming-Adams und Adams III, 1993).



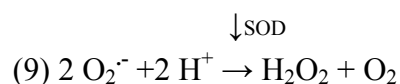
Die Carotinoide des Xanthophyll-Zyklus sind als weiterer Schutz vor photooxidativem Stress bekannt. Das Xanthophyll Zeaxanthin führt überschüssige Anregungsenergie sehr effizient in Form von Wärme ab, seine Bildung ist über den Xanthophyllzyklus lichtreguliert: Durch hohe Lichtintensitäten wird Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert, was unter anderem über die Ansäuerung des Thylakoidlumens reguliert wird. Bei niedrigen Lichtintensitäten wird Zeaxanthin zurück zu Violaxanthin epoxidiert (Demming-Adams und

Adams III, 1993; Pfündel und Bilger, 1994; Demming-Adams und Adams III, 1996). Weiterhin wird diskutiert, ob die Carotinoide des Xanthophyllzyklus als Membranstabilisatoren im Chloroplasten fungieren und damit die Lipidperoxidation verringern (Havaux, 1998).

1951 wurde von Mehler die lichtabhängige Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid in Thylakoiden nachgewiesen. Als primäres Produkt dieser Photoreduktion von Sauerstoff entsteht das Superoxid-Anion (Übersicht: Foyer, 1997; Asada, 1999). Unter hohem Lichteinfluss bildet sich vermehrt Superoxid durch direkte Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff an der Akzeptorseite des Photosystem I oder durch Elektronenübertragung via reduziertem Ferredoxin nach Überreduktion der Elektronentransportkette (Halliwell, 1991; Foyer et al., 1994; Asada, 1999; Baier und Dietz, 1999). Die Gefährlichkeit des Superoxids besteht hauptsächlich darin, dass es zusammen mit Wasserstoffperoxid an der Entstehung des weitaus reaktiveren Hydroxylradikals durch die Haber Weiss-Reaktion (Gleichung 7) beteiligt ist. Es reduziert Fe^{3+} zu Fe^{2+} , welches dann mit H_2O_2 , ähnlich in der metallkatalysierten Fenton-Reaktion (Gleichung 8), das Hydroxylradikal bildet (Fridovich, 1978; Foyer et al., 1994; Willekens et al., 1995; Aruoma, 1997; Asada, 1999).



Die Entgiftung von Superoxid und Wasserstoffperoxid ist daher auch als Prävention gegen das Hydroxylradikal notwendig (Polle, 1997). Als direkter enzymatischer Entgiftungsmechanismus von Superoxid ist im Chloroplasten die Superoxid-Dismutase (SOD) bekannt (Gleichung 9), welche mit Hilfe von 2 Protonen das Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff umwandelt (Fridovich, 1978; Asada, 1999).



Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird im Chloroplasten durch den Ascorbat-Glutathion-Zyklus entgiftet (Abb. 1b): Die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser erfolgt durch die Ascorbatperoxidase (APX). Im Chloroplasten gibt es eine Thylakoidgebundene Form der APX, sowie eine im Stroma lokalisierte. Im Durchschnitt liegen 50% der

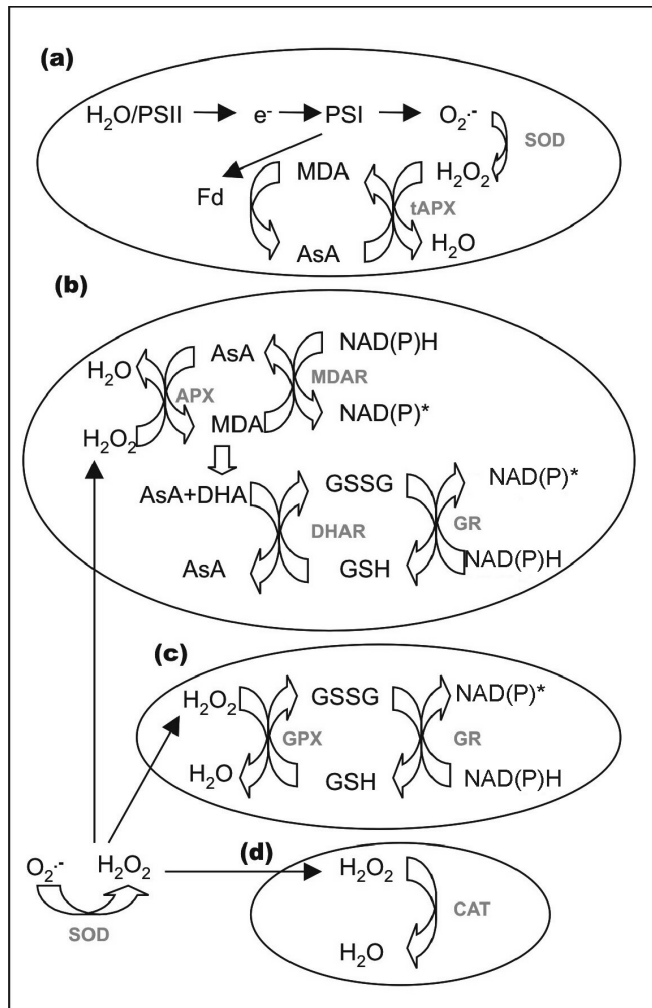


Abbildung 1:
Schematische Darstellung verschiedener Stoffwechselwege zur Entgiftung von ROS in Pflanzen.
a) Der Wasser-Wasser-Zyklus,
b) der Ascorbat-Glutathion-Zyklus,
c) der Glutathion-Peroxidase-Zyklus,
d) die Katalase.
a) und b) sind im Chloroplasten lokalisiert, c) im Cytosol (daher im Text nicht erwähnt) und d) im Peroxisom.
Modifiziert aus Mittler, 2002.

plastidären APX thylakoid-gebunden vor; zu finden ist sie, wie das PSI auch, in den Stroma-Thylakoiden. Weiterhin sind in der Zelle peroxisomale, cytosolische und mitochondriale Isoformen bekannt, die sich jedoch sowohl in ihrer Substratspezifität, als auch in ihrer Aminosäuresequenz von den plastidären Isoformen unterscheiden. Reguliert wird die chloroplastidäre Ascorbat-Peroxidase unter anderem durch den Ascorbat-Gehalt (Inaktivierung bei niedrigen Ascorbat-Konzentrationen) und durch Licht (Asada, 1997, 1999; Jimenez et al., 1997). Bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid werden pro H_2O_2 jeweils 2 Moleküle Ascorbat zu Monodehydroascorbat (MDA) oxidiert. MDA ist ein kurzlebiges Radikal und kann auf verschiedene Arten wieder reduziert werden. Nicht enzymatisch kann MDA mit reduziertem Ferredoxin spontan wieder zu Ascorbat regeneriert werden, wie es beim „Wasser-Wasser-

Zyklus“ (siehe unten) der Fall ist. Weiterhin kann sich MDA zu Ascorbat und Dehydroascorbat (DHA) umwandeln. Das spontan gebildete DHA wird unter Oxidation von Glutathion durch die Dehydroascorbatreduktase (DHAR) wieder zu Ascorbat regeneriert. Das oxidierte Glutathion wird wiederum mittels der Glutathion-Reduktase reduziert. Als Elektronendonator fungiert NADPH. Zur enzymkatalysierten Reduktion von MDA im Chloroplasten durch die Monodehydroascorbatreduktase (MDAR) wird ebenfalls ein Elektronendonator benötigt, z. B. NADPH während des Ascorbat-Glutathion-Zyklus` (Übersicht: Foyer, 1997; Mullineaux und Creissen, 1997; Noctor und Foyer, 1998; Asada, 1999; Mittler, 2002). Ascorbat und Glutathion sind demnach wichtige Antioxidantien in der

Pflanze. Weiterhin haben sie unter anderem bei der Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung wichtige Funktionen. Ist z. B. der Ascorbat-Gehalt in Meristemen reduziert, so verharrt die Zelle in der G1-Phase (Noctor und Foyer, 1998).

Als neue Schutzvariante vor reaktiven Sauerstoffformen im Chloroplasten wird seit einigen Jahren der sogenannte „Wasser-Wasser-Zyklus“ diskutiert (Abb. 1a). Der „Wasser-Wasser-Zyklus“ beinhaltet bereits bekannte Elemente der chloroplastidären Zyklen und Reaktionswege, nämlich die photosynthetische Elektronentransportkette und Bestandteile des Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Elektronen aus der Wasserspaltung am PSII werden über die photosynthetische Elektronentransportkette bis zum PSI transportiert. Dort werden sie entweder auf Ferredoxin oder auf molekularen Sauerstoff übertragen. Das dabei entstehende Superoxid wird mittels der SOD-Reaktion zu Wasserstoffperoxid reduziert, welches über die thylakoidgebundene APX zu Wasser reduziert wird. Das oxidierte Ascorbat (= MDA) wird, wie oben bereits geschildert, unter Zuhilfenahme von reduziertem Ferredoxin wieder zu Ascorbat regeneriert. Während des „Wasser-Wasser-Zyklus“ findet Elektronentransport ohne damit verbundene CO₂-Assimilation statt. Unter hoher Lichteinstrahlung wird dadurch überschüssige Anregungsenergie durch erhöhten Elektronentransport unter vermehrter Wasserbildung (und vorangegangener –Spaltung am PSII) abgeleitet und der Excitonendruck herabgesetzt. Durch diese Ableitung der überschüssigen Anregungsenergie wird der Photosyntheseapparat vor Photoinhibition geschützt. Zusätzlich werden durch diese Maßnahme lichtinduzierte ROS (O₂⁻ und H₂O₂) minimiert. (Asada, 1999).

Wasserstoffperoxid kann nicht nur im Chloroplasten Schäden verursachen. Dort oxidiert es z.B. Enzyme des Calvin-Zyklus, wie die Seduheptulose-bisphosphatase oder die Fructose-bisphosphatase. H₂O₂ kann durch Membranen diffundieren und kann, neben seiner schädigenden Wirkung außerhalb des Organells oder der Zelle (Willekens et al., 1995), auch als Signalmolekül fungieren. Dazu werden in Pflanzen H₂O₂-Gradienten über Biomembranen aufgebaut, welche regulativ in Prozesse der Signaltransduktion oder Apoptose eingreifen können (Antunes und Cadenas, 2000). Außerhalb der Chloroplasten entsteht H₂O₂ vermehrt in den Peroxisomen. Während der β -Oxidation der Fettsäuren wird es durch die Dehydrogenierung von Acyl-CoA durch die Acyl-CoA-Oxidase gebildet. Ebenfalls entsteht es durch Oxidation von Glycolat zu Glyoxylat während der Photorespiration (Willekens et al., 1995). Als Photorespiration wird die O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe im Licht in photosynthetisch aktiven Zellen bezeichnet (Straßburger, 1998). Die lichtabhängige Sauerstofffixierung findet mittels der Oxygenasefunktion des Calvin-Zyklus Enzyms

Ribulose-1,5-bisphosphatase (RubisCo) statt. Während der Photorespiration wird CO_2 freigesetzt und ATP sowie NADPH verbraucht. Dadurch wird der Sauerstoffpartialdruck im Blatt gesenkt und es wird NADP^+ regeneriert, welches wieder als Akzeptor für die photosynthetische Elektronentransportkette fungieren kann. Dadurch wird die Elektronentransportkette bei hohen Lichtintensitäten und Wassermangel vor Überreduktion geschützt und der Bildung von Singulett-Sauerstoff und der daraus folgenden Photoinhibition vorgebeugt (Foyer, 1997; Foyer und Noctor, 2000). Das Maß an Einfluss der Photorespiration als Schutz vor lichtinduzierten Schäden wird kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu Osmond und Grace (1995) postulieren Wu et al. (1991), dass Photorespiration den Photosyntheseapparat effizienter vor Photoinhibition schützt als die Mehler-Reaktion, welche ebenfalls als Schutz vor Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette durch hohe Lichtintensitäten angesehen wird (Übersicht: Foyer, 1997; Foyer und Noctor, 2000).

Ein direkter Zusammenhang besteht zwischen der Photorespiration und der Carboxylase/Oxygenase Aktivität der RubisCo, die das Verhältnis von CO_2 zu O_2 im Chloroplasten widerspiegelt. Sinkt die CO_2 -Konzentration aufgrund eines Verschlusses der Stomata (z. B. bei Trockenstress) bei gleichbleibender Lichteinstrahlung ab, findet zur Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes im Blatt vermehrt Photorespiration statt. Die Rate der Mehler-Reaktion wird dadurch nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wird bei zunehmender Lichtintensität in trockengestressten Pflanzen sowohl die Photorespiration, als auch die Mehler-Reaktion in gleichem Verhältnis gesteigert (Foyer und Noctor, 2000; Noctor et al., 2002).

Das bei der Photorespiration und der Fettsäureoxidation im Peroxisom anfallende toxische Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase entgiftet. Da H_2O_2 durch Membranen diffundiert, kann die peroxisomal lokalisierte Katalase ebenfalls Wasserstoffperoxid entgiften, was in anderen Zellkompartimenten (z. B. bei Lichtstress im Chloroplasten) entsteht. Untersuchungen an Katalase-Mangelmutanten von Tabak zeigten, dass unter Lichtstressbedingungen Katalase den Hauptteil des zellulären Wasserstoffperoxids entgiftet, während Peroxidasen das restliche H_2O_2 reduzieren (Abb. 1d; Willekens et al., 1997).

Katalaseaktivität wurde 1818 zum ersten Mal von Thenard beobachtet. Dass der Abbau von H_2O_2 durch ein spezielles Enzym vonstatten geht, wurde 1901 von Loew beschrieben, welcher dieses Enzym als Katalase benannte. Die Hemmung der Katalase durch Cyanid entdeckte Warburg 1923 und er identifizierte Eisen als wichtigen Bestandteil des Holoenzym. Das Häm wurde 1930 als Cofaktor von Zeile und Hellstrom erkannt. Die erste

Katalaseisolierung aus Rinderleber mit anschließender Kristallisation wurde 1937 von Sumner und Dounce durchgeführt (Übersicht: Scandalios et al., 1997). Katalasen wurden seitdem in Bakterien (Übersicht: Loewen, 1997), Hefen und Pilzen (Übersicht: Ruis und Koller, 1997), Algen, tierischen Organismen (Übersicht: Switala und Loewen, 2002; Chelikani et al., 2004) und Pflanzen (Übersicht: Willekens et al., 1995a) entdeckt, klassifiziert und näher untersucht. Die Katalasen der verschiedenen Organismen werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt, welche auf funktionellen Unterschieden beruhen (Zamocky und Koller, 1999; Chelikani et al., 2004): Klasse 1 beinhaltet die Häm-haltigen, monofunktionalen Katalasen. Diese können noch in Untergruppen eingeteilt werden, je nach Größe der an der Bildung des Holoenzym beteiligt Untereinheiten. In der Klasse 2 sind die sogenannten Katalase-Peroxidasen zusammengefasst, die in ihrer Struktur und Sequenz stark mit Peroxidasen höherer Pflanzen verwandt sind. Katalase-Peroxidasen finden sich in Prokaryoten und Pilzen (Jakopitsch et al., 2003). In der 3. Klasse wurden die nicht hämhaltigen Katalasen eingeordnet. Diese werden auch Mangan-Katalasen genannt, weil sie Mangan in ihrem aktiven Zentrum besitzen. Sie befinden sich z.B. in Milchsäure-Bakterien.

Pflanzliche Katalasen, welche alle zu den monofunktionalen Klasse 1 Katalasen gehören, wurden von Willekens et al. (1985a) noch einmal in verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung basiert auf der jeweiligen Expression in den verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien, spiegelt jedoch keine phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wider:

Gruppe 1: Expression in photosynthetisch aktivem Gewebe, die Expression wird durch Licht stimuliert, z. B. *cat1* von *Nicotiana plumbaginifolia*.

Gruppe 2: Verstärkte Expression in vaskulärem Gewebe, z.B. *cat2* von *Nicotiana plumbaginifolia*.

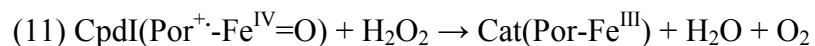
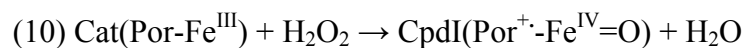
Gruppe 3: Expression in Samen und jungen Keimlingen, z. B. *cat3* von *Nicotiana plumbaginifolia*.

Alle Mitglieder dieser drei Katalasegruppen sind peroxisomal lokalisiert (Willekens et al., 1995a), außer CAT3 von *Zea mays*. CAT3 soll sich in den Mitochondrien befinden (Scandalios, 1990), neben ihr wurde bisher nur eine weitere mitochondriale Katalase bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen (Kujumdzieva et al., 2002).

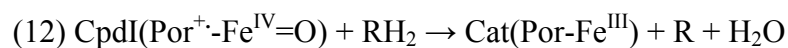
Peroxisomen besitzen, im Gegensatz zu den Mitochondrien, keine eigene DNA (Douglass et al., 1973), beide Organellen sind jedoch auf Proteinimport von im Cytosol synthetisierten Proteinen angewiesen. Dazu benötigen die Proteine Targeting-Sequenzen, welche für den spezifischen Import in das jeweilige Organell zuständig sind. Der mitochondriale Import wird über N-terminale Sequenzabschnitte koordiniert, die häufig während oder nach dem Import durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase abgespalten werden (Sjöling und Glaser, 1998). Der peroxisomale Import wird in den meisten Fällen über die C-terminale peroxisomale Targeting-Sequenz 1 (PTS1) oder die N-terminale PTS2 reguliert. Das Vorkommen von internen PTS wird ebenfalls postuliert (Übersicht: Rachubinski und Subramani, 1995; Elgersma und Tabak, 1996). Die für den peroxisomalen Import gebräuchlichste PTS ist die C-terminale PTS1, sie besteht aus dem Tripeptid Ser-Lys-Leu (Gould et al., 1989). Auch die Varianten Cys/Ala/Ser/Pro-Lys/Arg-Leu/Met können in höheren Pflanzen als PTS1 fungieren (Hayashi et al., 1997). Die N-terminale PTS2 ist bei weniger Proteinen als die PTS1 zu finden. Sie besteht aus den Varianten Arg/Lys-Leu/Val/Ile-X₅-His/Gln-LeuAla und wird bei höheren Pflanzen nach dem Import abgespalten (Gietl 1990; Gietl et al., 1994; Gietl et al. 1996; Subramani, 1996; Rehling und Kunau, 1996). Auch pflanzliche Katalasen werden im Cytosol synthetisiert, daher gehören sie ebenfalls zu den Proteinen, welche posttranslational in das Peroxisom importiert werden müssen. Katalasen besitzen jedoch weder eine klassische PTS1 noch eine PTS2. Kragler et al. identifizierten 1993 zwei peroxisomale Targeting-Sequenzen für Katalase A von *Saccharomyces cerevisiae*, eine C-terminale (-Ser-Ser-Asn-Ser-Lys-Phe) und eine interne. Diese Sequenzabschnitte scheinen jedoch nicht hochspezifisch für den peroxisomalen Import zu sein. So postulieren Petrova et al. (2004), dass bei oxidativ gestressten *Saccharomyces*-Zellen Katalase A mittels der peroxisomalen Targeting-Sequenzen auch in Mitochondrien importiert werden kann. Von Trelease et al. wurden 1996 die C-terminale peroxisomale Import-Sequenz von Rattenkatalase (Ala-Asn-Leu) identifiziert, welche fast komplett homolog zu der von menschlicher Katalase (-Lys-Ala-Arg-Leu) ist (Purdue und Lazarow, 1996). Baumwollkatalase soll dagegen über die bis dato unbekannt Variante der PTS1, -Pro-Ser-Ile, importiert werden (Mullen et al., 1997). Für den Import von Kürbiskatalase in das Peroxisom soll wiederum das an den Pos 13 bis 11 vor dem C-terminus befindliche Tripeptid -Gln-Lys-Leu- verantwortlich sein (Kamigaki et al., 2003). Die peroxisomale Targeting-Sequenz pflanzlicher Katalasen scheint demnach in ihrer Lokalisation und ihrer Aminosäureabfolge variabel zu sein. Diskutiert wird weiterhin, ob die Katalase bereits als fertig assembliertes Tetramer oder als Monomer in das Peroxisom importiert wird. Generell

sind Peroxisomen in der Lage, oligomere Proteine zu importieren (Glover et al., 1994; McNew und Goodman, 1994). Vom oligomeren Proteinimport existieren verschiedene Modellvorstellungen (Übersicht: McNew und Goodman, 1996). So wird für den Import menschlicher Katalase von Middelkoop et al. (1993) diskutiert, dass das Tetramer im Cytosol assembliert, es direkt vor dem Import wieder entfaltet wird um dann im Peroxisom wieder zu reassemblieren. Denn eine korrekte Tetramerisierung der Katalase spielt für ihre katalytische Tätigkeit eine wichtige Rolle (Putnam et al., 2000).

Katalase entgiftet das im Peroxisom anfallende Wasserstoffperoxid in einem Mechanismus, der aus zwei Schritten besteht (Nicholls et al., 2001; Chelikani et al., 2004): Im ersten Schritt reagiert das Wasserstoffperoxid mit dem Eisen des Häms (Gleichung 10). Das dabei entstehende Intermediat wird als Compound I (CpdI) bezeichnet und besitzt ein Oxyferryl-Zentrum mit einem Porphyrin-Kation-Radikal. Im zweiten Schritt wird Compound I durch erneute Reaktion mit H_2O_2 wieder zu aktiver Katalase regeneriert (Gleichung 11).



Bei niedrigen Wasserstoffperoxidkonzentrationen ($<10^{-4}\text{M}$) kann Compound I mit einem alternativen Wasserstoffdonor reagieren, um wieder reduziert zu werden (Gleichung 12).



Daher hat Katalase eine Doppelfunktion, neben ihrer klassischen katalytischen Aktivität (Gleichung 11) kann sie ebenfalls peroxidatisch (Gleichung 12) wirksam sein (Deisseroth und Dounce, 1970; Sichak und Dounce, 1986; Scandalios, 1994). Neben Compound I können auch noch die Katalaseintermediate Compound II und Compound III entstehen (Abb. 2).

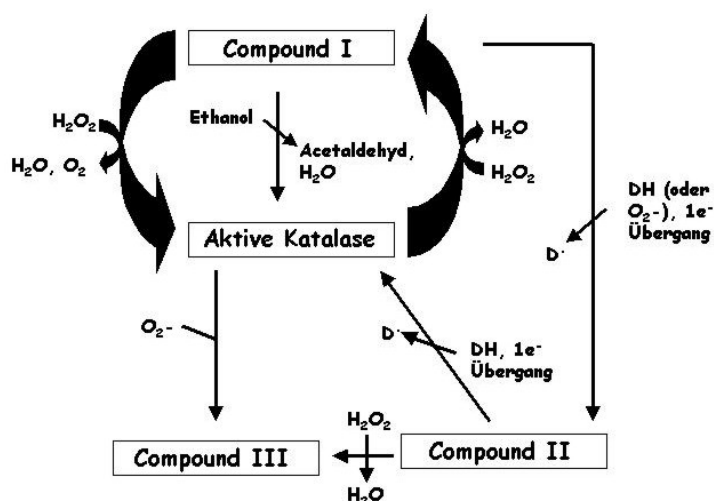
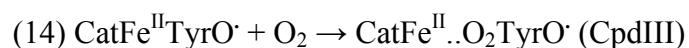
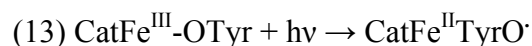


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Reaktionszyklus von Katalasen und der Entstehung der inaktiven Katalaseintermediate Compound II und Compound III, modifiziert aus Kirkman et al., 1999.

Compound II entsteht durch Reduktion von Compound I durch einen 1-Elektronendonator. Compound II besitzt ebenfalls noch das Fe^{IV} im Zentrum des Häms, jedoch kein Porphyrin-Kation-Radikal mehr. Wird Compound II durch ein weiteres H_2O_2 -Molekül oxidiert, entsteht Compound III (Übersicht: Lardinois et al., 1996). Weiterhin kann Compound III auch direkt durch Interaktion von aktiver Katalase mit Superoxid gebildet werden (Kono und Fridovich, 1982). Compound II und Compound III sind inaktiv, könnten aber, wenn H_2O_2 und Superoxid direkt nach ihrer Bildung entfernt würden, spontan wieder in aktives Enzym überführt werden. Ein längeres Verbleiben der Katalase in einem dieser Zustände hat eine irreversible Inaktivierung zur Folge (Kirkman et al., 1999).

Da Katalasen in photooxidativ gestressten Pflanzen das durch die Photorespiration vermehrt anfallende H_2O_2 entgiften, ist es ein Paradoxon, dass die Katalase selbst durch Licht inaktiviert wird. Nakatani untersuchte 1961 den Einfluss von Licht auf die Aktivität von Rinderleberkatalase. Dabei stellte er fest, dass durch Licht eine Oxidation der Histidin-Seitenketten ausgelöst wird. Die *in vitro* Lichtinaktivierung der Katalasen von Rinderleber, Bakterien (am Beispiel von *Micrococcus lysodeikticus*) und Spinat wurde 1969 detailliert von Björn untersucht. Cheng und Packer stellten 1979 an isolierten Rattenhepatocyten eine *in vivo* Inaktivierung von Katalase durch sichtbares Licht fest. Auch bei Cyanobakterien ist die Katalase lichtsensibel (Tytler et al., 1984). Inkubationen von Blattsegmenten von Roggen, Sonnenblume, Erbse und Kürbis mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid zeigten, dass Katalase auch in den Blättern höherer Pflanzen durch Licht inaktiviert wird (Feierabend und Engel, 1986). Der Grad der durch Licht ausgelösten Inaktivierung ist von der Katalasekonzentration abhängig. Das Enzym ist in der Lage, sich selbst zu schützen, externe Zugabe von Proteinen, z. B. BSA, haben keinen Effekt. Weiterhin schützen peroxidatische Substrate, wie z. B. Ethanol, die Katalase vor Aktivitätsverlust (Cheng et al., 1981). Ausgelöst wird die Photoinaktivierung durch die Eigenabsorption des enzymgebundenen Häms im Blaulichtbereich unter aeroben Bedingungen (Cheng et al., 1981; Grotjohann et al., 1997; Shang und Feierabend, 1999). Doch auch im Rotlicht wird die Katalaseaktivität *in vivo* in Anwesenheit von ausbleichenden Herbiziden (z. B. Aminotriazol) signifikant herabgesetzt (Feierabend und Kemmerich, 1983). Durch Chloroplasten-vermittelte ROS wird Katalase ebenfalls im Rotlicht photooxidativ geschädigt. (Engel und Feierabend, 1986; Feierabend et al., 1996; Shang und Feierabend, 1999). Demzufolge ist die Lichtinaktivierung von Katalasen, sowohl im Blau- als auch im Rotlichtbereich ein sauerstoffabhängiger Prozess. Trotzdem konnten Cheng et al. 1981 *in vitro* keinen schützenden Einfluss der Radikalfänger Saccharose (gegen OH^\cdot), Histidin (gegen $^1\text{O}_2$) und SOD (gegen O_2^\cdot) während der Katalaseinaktivierung

im Weißlicht feststellen. Shang und Feierabend (1999) wiesen dagegen einen Schutzeffekt des unspezifischen Radikalfängers Trolox, einem α -Tocopherol-Analogen, vor Chloroplasten-vermittelter Katalaseinaktivierung im Rotlicht nach. Weiterhin zeigten *in vitro* Experimente an Katalase von *Neurospora crassa*, dass deren Inaktivierung während einer 3stündigen Lichtinkubation durch Zugabe des Hydroxylradikalfängers Harnsäure vermieden werden kann (Lledias et al., 1998). Sauerstoffradikale sind demnach an der Lichtinaktivierung von Katalasen beteiligt. Studien an menschlichen Keratinozyten und Hamsterfibroblasten zeigten, dass in Katalase-überexprimierenden Zellen die ROS-Produktion unter UVB-Bestrahlung zunimmt (Heck et al., 2003). Von Aubailly et al. (2000) wird postuliert, dass Katalase während der Inaktivierung durch langwelliges UV-Licht (362nm) selbst Superoxid produziert. Folgende Reaktionen sollen daran beteiligt sein: Durch UV-Absorption wird bei Rinderleberkatalase das EisenIII des Häms durch internen Elektronentransfer reduziert (Gleichung 13). Unter Sauerstoffbindung entsteht das inaktive Katalaseintermediat Compound III mit einem EisenII des Häms und möglicherweise einem reaktiven Tyrosinradikal (Gleichung 14). Dieses instabile Produkt zerfällt in Superoxid und Katalase (Fe^{III}) mit einem Tyrosin-Radikal (Gleichung 15). Das Tyrosin-Radikal kann langsam (da es nur schwach reaktiv ist) mit einem unbekanntem, im Molekül befindlichen internen Elektronendonator reagieren und das Molekül wieder zu aktiver Katalase regenerieren. Das dabei entstehende Superoxid (siehe Gleichung 15) könnte wiederum mit Katalase reagieren und diese, zusätzlich zur UV-vermittelten Compound III-Bildung, inaktivieren.



Generell kann eine Inaktivierung von Katalasen durch Superoxid auch ohne Belichtung ausgelöst werden. Untersuchungen von Kono und Fridovich (1982) zeigten, dass Rinderleberkatalase nach 3stündiger Inkubation in einem Superoxid-erzeugenden *in vitro* System ca. 30% der Ausgangsaktivität einbüßt. Dieser Prozess wird von ihnen in zwei Stufen unterteilt: Die schnelle Inaktivierung und die langsame Inaktivierung. Der schnellen Inaktivierung liegt die Entstehung von Compound III zugrunde, durch Zugabe von SOD zur Eliminierung des im Ansatz befindlichen Superoxids wird die Inaktivierung rückgängig gemacht. Die langsame Inaktivierung führt durch Reaktion des Superoxid mit Compound I zur Akkumulation von Compound II, SOD hat darauf keinen Einfluss. In diesem

Zusammenhang wiesen Kirkman et al. (1999) an Rinderleberkatalase nach, dass der Anteil von Compound III in den ersten 1-2 Minuten nach Inkubation mit Superoxid nur gering ansteigt. Der Anteil von Compound II nimmt über einen längeren Zeitraum stark zu. Demzufolge liegt der Superoxid-vermittelten Katalaseinaktivierung *in vitro* eine vermehrte Compound II Bildung zu Grunde.

Die sauerstoffabhängige Starklichtinaktivierung pflanzlicher Katalasen findet sowohl *in vitro*, als auch im intakten Blatt statt (Feierabend und Engel, 1986). Pulse-chase Experimente von Hertwig et al. (1992) zeigten, dass *in vivo* das inaktivierte Protein durch stetige Neusynthese ersetzt wird. Die Syntheserate korreliert mit der Lichtstärke, Katalase hat demnach einen lichtabhängigen Turn-over. Obwohl von Nakatani (1961) während der Lichtinaktivierung eine Abnahme der Absorption bei 405nm (dem Absorptionsmaximum des Häms) beobachtet wurde, zeigten Untersuchungen von Feierabend und Dehne (1996), dass während der Photooxidation von Rinderleberkatalase das Häm nicht zerstört wird. Grotjohann et al. wiesen 1997 durch Untersuchungen an Sonnenblumenkatalase ebenfalls nach, dass der Häm-Abbau nicht mit der Menge an lichtinaktivierter Katalase korreliert. Starklichtinkubationen von Roggenblattsegmenten mit dem Porphyrin-Synthesehemmer Gabaculin zeigten, dass die Katalase-Neusynthese nicht durch die Hemmung der Häm-Synthese beeinträchtigt ist. Daher wird das Häm durch Lichteinwirkung nicht zerstört, sondern es wird nach Inaktivierung und Abbau des Apoproteins während der Neusynthese wiederverwendet (Feierabend und Dehne, 1996; Feierabend et al., 1996). Reguliert wird der lichtabhängige Katalase Turn-over post-transkriptional, da der Katalase-mRNA-Gehalt nicht mit der Lichtintensität korreliert. Vielmehr ist er bei dunkelinkubierten Roggenblättern im Vergleich zu lichtinkubierten Blättern noch erhöht. Die Translation wird über die Verfügbarkeit des Häms, sowie über die Methylierung der Katalase-mRNA-Cap-Struktur reguliert (Feierabend et al., 1996; Schmidt et al., 2002). Die Lichtinaktivierung von Katalasen im photosynthetisch aktiven Blatt ist eine generelle Eigenschaft und kommt auch unter moderaten Lichtbedingungen vor (Feierabend und Engel, 1986). Da der Katalaseverlust in der Regel durch Neusynthese kompensiert wird (Hertwig et al., 1992), hat dies keinerlei negative Auswirkungen auf die Pflanze. Wenn der Proteinsyntheseapparat jedoch durch zusätzliche Stressoren wie Hitze (Feierabend et al., 1992), Salze (Streb et al., 1993; Streb und Feierabend, 1996) oder Alterungsprozesse (Kar et al., 1993) gehemmt wird, oder der oxidative Stress durch Herbizide erhöht wird (Streb et al., 1993), kommt es zu einem apparenten Katalaseverlust in den Blättern, welcher dann weitere photooxidative Schäden zu Folge hat. Kälte ist ebenfalls ein Stressfaktor, der sich negativ auf die Proteinsynthesekapazität auswirken kann. Volk und Feierabend (1989) untersuchten in

diesen Zusammenhang an Roggenblättern die Wirkung der abiotischen Faktoren Kälte und Licht auf die Katalaseaktivität. Dabei stellten sie fest, dass alleinige Kältebehandlung keinen Effekt hat, eine zusätzliche Lichtinkubation jedoch zu einem erheblichen Enzymaktivitätsverlust *in vivo* führt. Vergleichende Untersuchungen an Roggen, Erbse, Kürbis und Mais zeigten, dass nach 24stündiger Inkubation im Licht bei $520 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR und 7°C die Katalaseaktivität in allen Pflanzen stark absank. Der Temperaturbereich, in dem die Blätter einen nicht mehr über Neusynthese kompensierbaren Katalaseaktivitätsverlust zeigten, ist jedoch unterschiedlich. So zeigten Roggen und Erbse eine erhöhte Toleranz gegenüber niedrigen Temperaturen, deren Katalaseverlust war erst bei Lichtinkubationen unter 15°C sichtbar. Der lichtinduzierte Aktivitätsverlust der Katalase in Mais- und Kürbisblättern konnte schon bei Temperaturen unter 25°C nicht mehr ausgeglichen werden (Feierabend et al., 1992). Da Kälte neben der Proteinsynthese auch andere enzymatische Reaktionen verlangsamt, führt eine kälteinduzierte Reduktion des Calvin-Zyklus im Licht auch zu vermehrter ROS-Produktion durch Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette. Dadurch werden bei kältesensiblen Pflanzen die antioxidativen Systeme schneller inaktiviert und es folgen auch unter moderaten Lichtbedingungen photooxidative, irreversible Schäden. Kältetolerantere Arten besitzen eine erhöhte Kapazität, ihre antioxidativen Systeme aufrechtzuerhalten, um so mit dem kälteinduzierten photooxidativen Stress umzugehen (Wise, 1995). Untersuchungen an kälteadaptierten Roggenblättern zeigten, dass diese unempfindlicher gegen photooxidativen Stress sind, als nicht adaptierte Roggenblätter. Zurückzuführen ist diese Beobachtung unter anderem darauf, dass bei kälte-akklimatisierten Roggenblättern der Proteinsyntheseapparat eine erhöhte Reparaturkapazität bei niedrigen Temperaturen besitzt, als bei nicht akklimatisiertem Roggen. Lichtinaktivierbare Proteine wie die Katalase, aber auch das D1-Protein, werden demnach schneller ersetzt und der photooxidative Stress damit reduziert (Streb et al., 1999; Shang et al., 2003).

Alpenpflanzen sind an ihrem natürlichen Standort sowohl hohen Lichtintensitäten als auch tiefen Temperaturen ausgesetzt. Tägliche Temperaturschwankungen, Schnee und je nach Wetterlage stark schwankende Lichtintensitäten sind wesentliche Bestandteile des alpinen Klimas. In den französischen Alpen wurden im Jahre 1992 am Col du Galibier Lichtintensitäten bis zu $2700 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR und während des Tagesverlaufes Unterschiede der Blattemperatur von bis zu $14,5^\circ\text{C}$ gemessen (Streb, 1994). Für Alpenpflanzen sind diese umweltbedingten Extreme jedoch Normalität und sie haben sich durch Anpassung dieses Umfeld als Lebensraum nutzbar gemacht (Körner, 1999). Diese

Anpassungen können schnell und reversibel oder längerfristig angelegt sein. Untersuchungen von Streb et al. (2003) zeigten, dass die Alpenpflanze *Ranunculus glacialis* nach einer 3wöchigen Wachstumsperiode bei 22°C und Schwachlicht (100 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR) anfälliger gegen lichtinduzierten oxidativen Stress war, als Vergleichspflanzen aus ihrem natürlichen Habitat. Als Kennzeichen der Lichtstressanfälligkeit wurden der Chlorophyllgehalt, die Katalaseaktivität, Sauerstoffentwicklung als Maß für die Photosyntheseaktivität und F_v/F_m als Indikator für die Photoinhibition bestimmt. Bei der Alpenpflanze *Soldanella alpina* waren diese Unterschiede nicht festzustellen. Daher ist die Anpassung von *Ranunculus glacialis* an die in den Alpen vorherrschenden klimatischen Bedingungen reversibel, die Anpassung von *Soldanella alpina* jedoch konstitutiv. Vergleichende Untersuchungen der Alpenpflanzen *Ranunculus glacialis*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* zeigten, dass die drei Pflanzen unterschiedliche Strategien entwickelt haben, um mit dem aus ihrem Lebensraum resultierenden oxidativen Stress umzugehen: So besitzen die Blätter der Alpenpflanze *Soldanella alpina* mehr Antioxidantien im Vergleich zu den Flachlandpflanzen *Secale cereale*, *Taraxacum officinale* oder *Ranunculus acris*: Der Gehalt an Carotinoiden des Xanthophyllzyklus, der Ascorbat- und Glutathiongehalt, sowie der α -Tocopherolgehalt sind signifikant erhöht (Streb et al., 1997; Streb et al., 1998). *Ranunculus glacialis* dagegen besitzt einen erhöhten Malatgehalt im Vergleich zu *Soldanella alpina*. Über einen Zusammenhang des Malatgehaltes mit der erhöhten Kapazität von *Ranunculus glacialis*, seine photosynthetische Elektronentransportkette oxidiert zu halten, wird noch diskutiert (Streb et al., 2003). In Blättern von *Homogyne alpina* wurde keine signifikante Akkumulation der Antioxidantien Ascorbat und Glutathion festgestellt. Inkubation ihrer Blättern mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid unter natürlichen Lichtbedingungen und anschließender Katalaseextraktion und -aktivitätsbestimmung zeigten jedoch, dass die Katalase von *Homogyne alpina* nach sechs Stunden noch zu 100% aktiv war. Die Katalase der Alpenpflanze *Soldanella alpina* war dagegen nach identischer Behandlung inaktiviert (Streb et al., 1997). *In vitro* Inkubationen der partiell gereinigten Katalasen aus Blättern der Alpenpflanzen *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina*, der Flachlandpflanze *Secale cereale* und von Rinderleberkatalase bei einer Lichtstärke von 640 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR bestätigten diese Beobachtung (Abb. 3): Während die Rinderleberkatalase und die isolierten Blattkatalasen von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* nach 6stündiger Lichtinkubation 70-90 % ihrer Ausgangsaktivität einbüßten, wurde die Katalase von *Homogyne alpina* um weniger als 10% inaktiviert. Eine lichtstabile Blattkatalase scheint

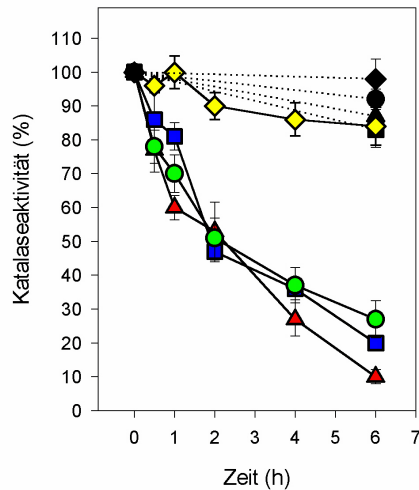


Abbildung 3:

Starklichtinkubation partiell gereinigter Blattkatalasen von *Soldanella alpina* (◻ blau), *Secale cereale* (○ grün), *Homogyne alpina* (◇ gelb) und Rinderleberkatalase (△ rot) bei 25°C und $640 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR. Die schwarzen Symbole repräsentieren die dazugehörigen Dunkelkontrollen. (modifiziert aus Streb et al, 1997).

demnach Bestandteil der Anpassung an den alpinen Lebensraum von *Homogyne alpina* zu sein.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob in den Blättern von *Homogyne alpina* tatsächlich eine mRNA vorhanden ist, welche für eine lichtstabile Katalase codiert. Nach Isolierung einer Katalase-cDNA aus Blättern von *Homogyne alpina* (zu Verfügung gestellt von M. Schmidt, Universität Frankfurt) wurde diese funktionell heterolog exprimiert, isoliert und charakterisiert. Zum Vergleich wurden die ebenfalls heterolog exprimierten Katalasen der Flachlandpflanze *Secale cereale* und der Alpenpflanze *Soldanella alpina* herangezogen. Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass in Blättern von *Helianthus annuus* Katalasen mit erhöhter Lichtstabilität vorkommen (Grotjohann et al., 1997, Erläuterung später). Da die abgeleitete Aminosäuresequenz von *cata3* von *Helianthus annuus* mit CAT1 von *Homogyne alpina* fast identisch ist, wurde die *cata3*-cDNA von *Helianthus annuus* isoliert, ebenfalls heterolog exprimiert und in einige Untersuchungen miteinbezogen.

Nach heterologer Expression der pflanzlichen Katalasen von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* in *Escherichia coli* konnten zwar rekombinante Katalaseuntereinheiten, jedoch kein funktionelles Enzym nachgewiesen werden (M. Schmidt, Universität Frankfurt, persönliche Mitteilung). Daher sollte in dieser Arbeit die heterologe Expression in Hefen erprobt werden. Als Alternativstrategie sollte das Baculovirussystem eingesetzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass das Baculovirussystem als tierisches Expressionssystem im botanischen Bereich eher selten angewendet wird, werden seine Grundlagen an dieser Stelle näher erläutert (Übersicht: Kuzio und Faulkner, 1993; Jarvis, 1993): Heterologe Proteinexpression im Baculovirussystem basiert auf Infektion von Insektenzellen mit gentechnisch verändertem Baculovirus. Baculoviren gehören zur Familie der *Baculoviridae* und sind insektenpathogene

DNA-Viren, welche keine morphologische und biochemische Ähnlichkeit zu Wirbeltier- oder Pflanzenviren haben. Sie werden in drei Untergruppen eingeteilt, die Kernpolyeder-Viren, die Granulose-Viren und die „nonoccluded“-Viren. Die Kernpolyeder-Viren (nuclear polyhedrosis viruses) und die Granulose-Viren können nach erfolgreicher Infektion im Wirt Einschlusskörper (Virionen und Polyhedra, Erklärung s. u.) bilden. Unter natürlichen Bedingungen erzeugt das Virus nach Infektion zwei unterschiedliche Vermehrungseinheiten: Die Virionen und die Polyhedra. Virionen sind reife infektiöse Virenpartikel, welche in einem frühen Infektionsstadium (Beginn: ~10-12 h nach Infektion) in der Zelle entstehen. Sie dienen der Weitergabe der Viren-Nukleinsäure von einer Zelle zur anderen. Virionen sind jedoch nur im Organismus selbst stabil, werden sie nach dem Tod des Wirtes freigesetzt, gehen auch sie zu Grunde. Daher bilden Baculoviren die Polyhedra als stabile Vermehrungseinheit. In Polyhedra sind Virionen in einer stabilisierenden Proteinhülle, bestehend aus Polyhedrin, zusammengefasst. Sie entstehen in einem späteren Stadium des Infektionszyklus (Beginn: ~18-24 h nach Infektion). Nach dem Tod des Wirtes werden die Polyhedra freigesetzt und

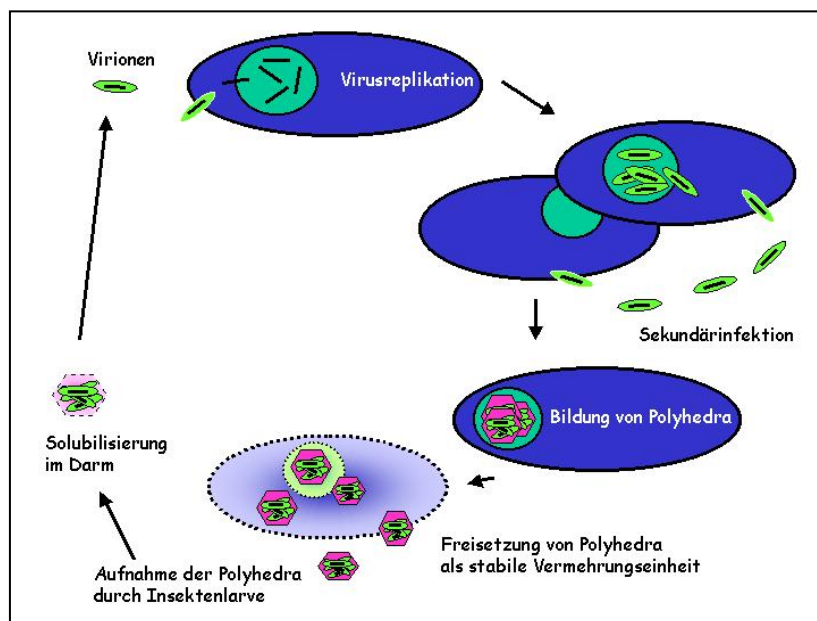


Abbildung 4:

Schematische Darstellung des Baculovirus-Infektionszyklus.

Nach Dissoziation der Polyhedra im Mitteldarm des Wirtes infizieren die freigesetzten Virionen die Zellen. Die Virenreplikation findet im Kern statt und es werden weitere Virionen für die Sekundärinfektionen gebildet. Durch Bildung der Polyhedra kommt es zu Zelllyse und der Wirt stirbt. Die freigesetzten Polyhedra überdauern als Dauerstadium bis zur erneuten Aufnahme durch ein anderes Insekt (modifiziert aus Luckow und Summers, 1988)

wiederum von einem neuen Insekt über die Nahrung aufgenommen. Durch das alkalische Milieu im Mitteldarm des Insekts dissoziieren die Polyhedra und setzen die Virionen frei. Diese infizieren die Mitteldarmzellen und der Infektionszyklus beginnt von Neuem (Abb. 4).

Da bei Infektion von Zellen in Zellkultur die Polyhedra zur Virenvermehrung nicht benötigt werden, nutzt man den Polyhedrinpromotor zur Expression von fremden Genen während der Infektion von Insektenzellen. Die infizierten Zellen produzieren dann das fremde Gen, welches sich auf dem Virengenom unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors befindet. Als Wirtstamm stand die Insektenzelllinie Sf9, welche aus der Larve des Schmetterlings

Spodoptera frugiperda stammt, zur Verfügung. Als Baculovirus wurde *Autographa californica*, das zu den Kernpolyeder-Viren gehört, verwendet. Nach heterologer Expression funktioneller Katalasen von *Homogyne alpina*, *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und (zu einem späteren Zeitpunkt) CATA3 von *Helianthus annuus* wurde deren Stabilität im Starklicht untersucht. Damit sollte geprüft werden, ob die cDNA der *Homogyne*-Katalase und die *cata3*-cDNA von Sonnenblume für eine lichtstabile Katalase, und die Katalase-cDNAs von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* für lichtempfindliche Katalasen codieren.

Helianthus annuus besitzt Blattkatalasen mit einer erhöhten Lichtstabilität. Von den aus Sonnenblumenkotyledonen isolierten Isoformen CATA2 bis CATA8 sind CATA2-CATA5 lichtstabiler als CATA6-CATA8. Analysen der untersuchten Katalasen zeigten, dass die lichtsensibleren Isoformen als Homotetramere mit Untereinheiten von je 55 kDa, die lichtstabileren Isoformen als Heterotetramere mit Untereinheiten mit einer apparenten Größe von 55 kDa und 59 kDa vorliegen. Alle Katalase-Isoformen sind peroxisomal lokalisiert (Grotjohann et al., 1997). In den Peroxisomen der Sonnenblume sind semikristalline Strukturen, sogenannte Cores zu finden (Tenberge und Eising, 1995; Eising et al., 1996). Frederick und Newcomb identifizierten 1969 in Cores von *Nicotiana tabacum* die Katalase als einen der Bestandteile. Bei *Glycine max* ist Katalase hauptsächlich in peroxisomalen Cores und weniger in der Matrix zu finden (Vaughn, 1989). Während in Tabak, *Conyza bonariensis* und *Parthenium argentatum* auch Glycolat-Oxidase in Cores nachgewiesen wurde (Thomas und Trelease, 1981; Vaughn 1989), ist diese in Sonnenblumencores nicht zu finden; dort gilt Katalase als das Hauptprotein (Tenberge und Eising, 1995; Kleff et al., 1997; Heinze et al., 2000). Daher ist die Katalase in den Peroxisomen von *Helianthus annuus* sowohl in der Matrix als lösliches Protein, als auch in semikristallinen Strukturen, den sogenannten Cores, organisiert (Tenberge und Eising, 1995). Die Core Katalase besteht primär aus 59 kDa großen Untereinheiten und zu einem kleineren Teil aus 55 kDa großen Untereinheiten, während in der Matrix ausschließlich die kleinere Katalaseuntereinheit aufzufinden ist (Kleff et al., 1997). Da, wie oben bereits erwähnt, die 59 kDa große Untereinheit mit einer gesteigerten Lichtstabilität korreliert, wurden von Eising et al. (1998) Core- und Matrixkatalase isoliert und im Blaulicht inkubiert. Die Corekatalase wurde weniger photoinaktiviert als die Matrixkatalase. Da auch solubilisierte Cores lichtstabiler waren, führten Eising et al. (1998) die erhöhte Lichtstabilität nicht auf die Integration der Katalase in Cores zurück, sondern die auf molekularen Eigenschaften der 59 kDa Untereinheit. *Homogyne alpina* gehört ebenso wie *Helianthus annuus* zu den *Asteraceae*. Daher sollte überprüft werden, ob die von Streb et al. (1997) nachgewiesene lichtstabile Blattkatalase von *Homogyne alpina*, ebenso wie die von

Helianthus annuus, *in vivo* in Cores organisiert ist. Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wurde die cDNA-Sequenz von *cata3* von *Helianthus annuus* ebenfalls heterolog exprimiert und das rekombinante Enzym mit aus Sonnenblumenkotyledonen isolierter Core- und Matrixkatalase vergleichend auf Lichtstabilität untersucht.

Die rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* sollte, nachdem sie auf Lichtinaktivierbarkeit untersucht wurde, näher charakterisiert werden. Dazu sollte sie in ihren enzymatischen Eigenschaften mit den rekombinanten lichtempfindlichen Katalasen von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* und mit Rinderleberkatalase verglichen werden. In diesem Zusammenhang wurden die Michaelis-Menten-Konstanten der verschiedenen Katalasen ermittelt, Inhibitorstudien durchgeführt, die peroxidatische Aktivität und die spezifische Aktivität bestimmt. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die Katalase von *Homogyne alpina* in ihren enzymatischen Grundeigenschaften von denen anderer Katalasen unterscheidet. Weiterhin sollte der Mechanismus, dem die Lichtinaktivierbarkeit von Katalasen zu Grunde liegt, näher untersucht werden. Dazu wurden Lichtinkubationen der rekombinanten lightsensiblen Katalase von *Secale cereale* im Vergleich zu aus Roggenblättern isolierter Katalase und Rinderleberkatalase unter Zugabe von peroxidatischen Substraten durchgeführt. In diesem Rahmen stellte sich die Frage, ob der Mechanismus der sauerstoffabhängigen Starklichtinaktivierung mit dem der eingangs geschilderten superoxid-vermittelten Inaktivierung vergleichbar ist. Dazu wurden rekombinante und aus Blättern isolierte pflanzliche Katalasen und Rinderleberkatalase in einem Superoxid-generierenden System ohne zusätzlichen Lichteinfluss inkubiert und es wurde geprüft, ob Superoxid die Katalaseaktivität reduziert. Auch auf diese Reaktion wurde der Einfluss von peroxidatischen Substraten untersucht. Um weitere Aufschlüsse über Lichtstabilität bzw. Lichtempfindlichkeit pflanzlicher Katalasen zu bekommen, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten die Lichtinaktivierbarkeit pflanzlicher Katalasen, sowie den dahinter stehenden Mechanismus näher charakterisieren, denn:

Die Natur kreiert nichts ohne Bedeutung (Aristoteles).

2. Material und Methoden

Alle Arbeiten wurden unter Beachtung der S1-Sicherheitsbestimmungen durchgeführt. Wenn es erforderlich war, wurden sterile Arbeitsmaterialien eingesetzt und bei Arbeiten mit Hefen, Bakterien, Insektenzellen und Baculoviren wurden die Experimente unter einem Reinraumgerät (Gelaire BSB 4A) vollzogen. Die cDNAs einer Blattkatalase von *Secale cereale cat1*, *Soldanella alpina cat1*, *Homogyne alpina cat1* und *Helianthus annuus cata3*, sowie die am 5'-Ende mit einem 6 x His-tag versehenen Katalase-cDNAs von *Secale cereale cat1*, *Soldanella alpina cat1* und *Homogyne alpina cat1* wurden von Dr. M. Schmidt (J.W. von Goethe-Universität, Frankfurt am Main) zu Verfügung gestellt. Die cDNA Sequenzen von *Secale cereale cat1*, *Soldanella alpina cat1*, *Homogyne alpina cat1* und *Helianthus annuus cata3* sind in der EMBL-EBI Datenbank (<http://srs.ebi.ac.uk>) unter den Accession-Nummern Z54143 (*cat1 Secale cereale*), Z99633 (*cat1 Soldanella alpina*), AJ616025 (*cat1 Homogyne alpina*) und AF243518 (*cata3 Helianthus annuus*) erhältlich. Alle cDNA-Sequenzen sind im Anhang beigefügt.

2. 1. Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien für Puffer und Lösungen wurden von folgenden Firmen bezogen:

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD

MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD

Amersham Bioscience, Freiburg, BRD

Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, BRD

2. 2. DNA-Analyse: Allgemeine Techniken

Die zu Verfügung gestellten Blattkatalase-cDNAs lagen in folgenden Plasmiden vor:

pYEX-BX (Clontech, Heidelberg, BRD): *cat1 Secale cereale*, *cat1-5'-His-tag Secale cereale* und *cat1 Soldanella alpina*.

pBluescript SK(-) (Stratagene, Heidelberg, BRD): *cat1-5'-His-tag Soldanella alpina*

pGEM-T (Promega, Mannheim, BRD): *cat1 Homogyne alpina*, *cat1-5'*-His-tag *Homogyne alpina*

pGEM-T Easy (Promega, Mannheim, BRD): *cata3 Helianthus annuus*.

Weiterhin wurden die Vektoren pUC18 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD), pGemT-Easy (Promega, Mannheim, BRD), pGAPZ A, pHIL-D2, pPIC3.5 und pPIC3.5K, pVL1392, pVL1393 (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) verwendet.

Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen, und sonstige DNA-modifizierenden Enzyme (z. B. Ligasen, Kinasen, Phosphorylasen) stammten von den Firmen MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, BRD und Promega, Mannheim, BRD.

DNA-Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD und MWG AG Biotech, Ebersberg, BRD hergestellt.

2.2.1. DNA-Isolierung

2.2.1.1. Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Plasmidisolierungen aus über Nacht angezogenen Flüssigkulturen von *Escherichia coli* wurden entweder nach der modifizierten Methode von Sambrook et al. (1989), oder mit dem „Wizard® plus SV Minipreps DNA purification System“ (Promega, Mannheim, BRD) bzw. QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, BRD) durchgeführt.

Nach Sambrook et al. (1989) wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung 1	50 mM Glucose	Lösung 2	0,2 N NaOH
	50 mM Tris/HCl, pH: 8,0		1% SDS (w/v)
	10 mM EDTA		
	Lysozym (4 mg/ml)		
Lösung 3	3 M NaAc, pH: 4,8	TE-Puffer	10m M Tris/HCl, pH: 8,0
			1 mM EDTA

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol: 25:24:1

1-3 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert, in 100 µl Lösung 1 rückgelöst, 5 min auf Eis inkubiert; mit 200 µl Lösung 2 versetzt; nach weiteren 5 min auf Eis mit 150 µl Lösung 3 vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C wurde der Überstand mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 10 min bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und die DNA für 30 min bei -80°C gefällt. Nach weiterer Zentrifugation für 15 min bei 4°C wurde die sedimentierte DNA zwei Mal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Plasmidisolierung mittels des Qiagen und Promega Isolations-Kit beruhten auf dem Prinzip der DNA-Bindung an eine Silicagel-Membran unter Hochsalzbedingungen. Das Isolierungsprotokoll wurde dem Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, BRD) beiliegenden Handbuch entnommen: 3-5 ml einer flüssigen Übernachtskultur wurden sedimentiert, in 250 µl Cell Resuspension Solution resuspendiert und mit 250 µl Cell Lysis Solution versetzt. Nach Mischen des Ansatzes wurden 10 µl alkalische Phosphatase Solution dazugegeben, nach erneuter Durchmischung wurde der Ansatz mit 350 µl Neutralization Solution versetzt. Der Ansatz wurde wiederum durchmischt und dann für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Zentrifugationssäule gegeben, welche eine Silica-Membran enthielt. Durch Zentrifugation bindet die DNA unter diesen Bedingungen spezifisch an die Säule, der Durchlauf konnte verworfen werden. Nach zweimaliger Waschung der Silica-Membran und der daran gebundenen DNA mit ethanolhaltigem Waschpuffer konnte die DNA mit A. bidest. eluiert werden.

2.2.1.2. Genomische DNA-Isolierung von *Pichia pastoris*

Die Isolierung genomischer DNA der Hefe *Pichia pastoris* erfolgte nach dem Protokoll des „Pichia Expression Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe, BRD).

SCED: 1 M Sorbitol
10 mM Natrium-Citrat pH: 7,5
10 mM EDTA
10 mM DTT

Nach Anzucht der rekombinanten Hefen in minimalem Methanol- oder Glycerolmedium (siehe Kap. 2.4.2.1.) bis zu einer OD₆₀₀ von 5-10 wurden die Zellen bei 1500 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde mit sterilem A. bidest. gewaschen, in 2 ml SCED

resuspendiert, mit 0,1-0,3 mg Zymolase versetzt und bei 37°C für 50 min inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml 1 % SDS (w/v) wurde der Ansatz gemischt und für 5 min auf Eis gesellt. Es folgte die Gabe von 1,5 ml 5 M Kaliumacetat pH: 8,9, nach gründlicher Durchmischung wurde bei 10.000 x g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Falcon-Tube überführt, mit 2 Vol 96 % Ethanol versetzt, 15 min bei RT inkubiert und die gefällte genomische DNA bei 10.000 x g für 20 min bei 4°C sedimentiert. Nach Resuspendierung in 700 µl TE-Puffer wurde mit 1 Volumen Phenol Chloroform 1:1 (v/v) extrahiert, die Oberphase mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, die wässrige Phase mit ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat, pH: 7,5, und 2 Volumen 96 % Ethanol vermischt und die DNA für 60 min bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 min bei 4°C wurde das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer rückgelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (Kap. 2.2.2.) konnte die genomische DNA bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.3. DNA-Isolierung aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen

Der Isolierung von Gesamt-DNA aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen liegen die allgemeinen Laborbücher von Summers und Smith (1987) und O'Reilly et al. (1992) zugrunde.

Die mit Baculovirus infizierten *Spodoptera frugiperda*-Zellen wurden sedimentiert, in 300µl Lysepuffer resuspendiert und bei 50°C für 12-18 h im Wasserbad geschüttelt.

Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl
25 mM EDTA
100 mM NaCl
0,5% SDS (w/v)
pH: 8,0
Proteinase K (0,1 mg/ml)

Nach Zugabe von ½ Volumen Phenol und ½ Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde in einer Eppendorffzentrifuge bei max. Upm zentrifugiert. Die Oberphase wurde noch zwei Mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und die DNA im Anschluss mit 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat bei -80°C für 30 min gefällt. Nach Sedimentation der DNA wurde diese zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer rückgelöst.

2.2.2. RNA-Verdau und Konzentrationsbestimmung

Zur Eliminierung der RNA aus den DNA-Isolationsansätzen wurden entweder 0,5-2 μ l RNase-Stammlösung (4 mg/ml in 300 mM NaAc, pH: 6,0) direkt in den Restriktionsansatz gegeben (Kap. 2.2.3.), oder pro 50 μ l Plasmid-DNA-Lösung wurde 1 μ l RNase-Stammlösung zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation im Heizblock (Techne Ori-Block DB1) bei 37°C wurde der Ansatz mit ½ Volumen Phenol und ½ Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) phenolisiert und die DNA mit 2 ½ Volumen 96 % Ethanol und 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH:4,8) bei -80°C gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion von 500fach verdünnter DNA-Lösung bei 260nm im Photometer (Pharmacia Ultrospec Plus) bestimmt und die Konzentration in μ g/ μ l nach folgender Formel berechnet:

$$\text{dsDNA: Verdünnung (x500) x } E_{260} \times 0,05 = C_{\text{dsDNA}}[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$\text{ssDNA: Verdünnung (x500) x } E_{260} \times 0,04 = C_{\text{ssDNA}}[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Der DNA-Reinheitsgrad kann ebenfalls photometrisch bestimmt werden. Beträgt der Quotient von $E_{260}/E_{280} \leq 1,8$ liegen Verunreinigungen durch Proteine und Polyphenole vor (Sambrook et al., 1989), ist der Quotient von $E_{230}/E_{260} \geq 0,6$ liegt eine Verunreinigung durch Polysaccharide vor (Steinbiß, 1983).

2.2.3. Restriktion der DNA

Für die Restriktion der DNA mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen wurde standardmäßig nach Herstellerangaben der Restriktionsenzyme folgender Ansatz für 1 h bei 37°C im Heizblock inkubiert:

0,5-1 μ g DNA

1/10 Volumen enzymespezifischer 10 x Puffer

1 U Restriktionendonuklease

ggf. 0,5-2 μ l RNase-Stammlösung (4mg/ml)

A. bidest., Endvolumen: 20-100 μ l

Der Restriktionsansatz oder die über PCR (Kap.2.2.4.) erhaltenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.2.5.). Dazu wurden sie mit 1/10 Vol 10fach Ladepuffer (50 % TE-Puffer, 50 % Glycerin, v/v) versetzt.

2.2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation bzw. Modifikation von DNA-Fragmenten, sowie zur Identifizierung positiver Hefe-Transformanten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion angewandt. Mittels Bindung spezifischer Primer an den zu amplifizierenden Doppelstrang unter Zugabe einer thermostabilen Polymerase fand die Reaktion unter Beachtung folgender Parameter statt:

Start: 2 min 94°C

a) Denaturierungsreaktion: 45 s – 1 min 94°C

b) Annealingreaktion: Die Annealingtemperatur wurde aus dem [GC] und dem [AT]-Gehalt der spezifischen Primer nach folgender Formel berechnet:

$$[GC] \times 4^{\circ}\text{C} + [AT] \times 2^{\circ}\text{C} = ^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} = \text{Annealingtemperatur } (^{\circ}\text{C})$$

Die Dauer der Annealingtemperatur variierte zwischen 45s und 1min.

c) Polymerasereaktion: 1min / 1000 zu amplifizierende bp bei 72°C

Wdh. a)-c): 30-35 Zyklen

Endzyklus: 7-10 min bei 72°C

Die Polymerasekonzentration betrug 5 U/Ansatz, die jeweilige Primerkonzentration 1 pmol/µl, die MgCl₂-Konzentration 1,5 mM, die dNTP-Konzentration 200 µM und die BSA Konzentration 0,1 µg/µl. Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze mit 1/10 Vol Ladepuffer (50 % TE-Puffer, 50 % Glycerin, v/v) versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.5. Gelelektrophorese von restriktionsverdauter DNA und von PCR-

Ansätzen

Die Auftrennung restriktionsverdauter DNA oder von PCR-Ansätzen erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Sambrook et al. (1989). Als DNA-Längenstandards wurden bei der Gelelektrophorese der pUC Mix Marker 8, Generuler&trade 100bp DNA Ladder Plus und λ-DNA/BstEII (MBI, St. Leon-Rot) mit folgenden Größen eingesetzt:

pUC Mix Marker8:	λ - Marker:	Generuler:
1116 bp	8453 bp]	3000 bp
883 bp	7242 bp]	2000 bp
692 bp	6369 bp]	1500 bp
501 bp]	5687 bp]	1200 bp
489 bp]	4822 bp]	1031 bp
404 bp	4324 bp]	900 bp
331 bp	3675 bp	800 bp
242 bp	2323 bp	700 bp
190 bp	1929 bp	600 bp
147 bp	1371 bp]	500 bp
111 bp]	1264 bp]	400 bp
110 bp]	702 bp	300 bp
		200 bp
		100 bp

Es wurde ein 0,8-1 % Agarosegel (w/v in 1 x TAP) gegossen. Pro ml Gellösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Die Maße des Minigels betragen 7,5 x 5 x 0,5 cm; die des präparativen Gels 15 x 12,5 x 0,5 cm. Nach einer Laufzeit von 90 min (Minigel) bzw. 4 h (präparatives Gel) bei 80 mA wurde das Gel fotografiert, die Fragmente eluiert (Kap. 2.2.6.), oder ein Southern-Transfer (Kap. 2.2.8.) durchgeführt.

10 x TAP:	0,4 M Tris/HAc
(Sambrook et al.1989)	0,2 M NaAc
	10 mM EDTA
	pH: 7,5

Zur Erkennung besonders geringer Größenunterschiede (≤ 100 bp) zwischen den Fragmenten wurde die DNA auf einem 12 % Acrylamidgel (8,5 x 9 x 0,01 cm) aufgetrennt.

10 x TBE:	89 mM Tris
(Sambrook et al. 1989)	89 mM Borsäure
	2 mM EDTA
	pH: 8,3
Gel:	4 ml 30 % Acryl/Bisacrylamid 30:0,8 (w/v)
(Sambrook et al. 1989)	1 ml 10 x TBE
	4,93 ml A. bidest.
	70 μl 10 % APS (w/v)
	5 μl TEMED

Nach einer Laufzeit von 1 h bei 8,5 mA wurde zum Nachweis der DNA das Gel für 30 min in 20 ml Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) gefärbt und im Anschluss für 30 min in A. bidest. entfärbt.

2.2.6. Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der restriktionsverdauten Plasmide bzw. der PCR-Ansätze wurden die Fragmente aus dem Agarosegel mit Hilfe des QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, BRD) durchgeführt.

Das Fragment wurde aus dem Agarosegel herausgeschnitten und pro 100 mg mit 300 µl QX1-Puffer versetzt. Bei Fragmenten > 4 kb wurden pro 100 mg 300 µl QX1-Puffer und 200 µl A. bidest. eingesetzt. Nach Zugabe von 10-30 µl QUIAEX II-Silica-Gelpartikel wurde der Ansatz 10 min bei 50°C inkubiert und alle 2 min gevortext. Die an das Silica gebundene DNA wurde sedimentiert, ein Mal mit 500 µl QX1-Puffer und zwei Mal mit je 500 µl PE-Puffer gewaschen, luftgetrocknet und mit 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH: 8,5 eluiert.

2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Fragments in ein Plasmid wurden das Fragment und linearisierter Vektor ggf. mittels T4-Polynucleotid-Kinase phosphoryliert bzw. mittels CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Weiterhin wurden nicht kompatible überhängende Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt bzw. mit T4-Polymerase entfernt. Dazu wurden die den Enzymen beiliegenden Standardprotokolle angewandt.

Zur Ligation wurden Fragment und Vektor in einem Verhältnis 2:1 bis 6:1 eingesetzt. Nach Zugabe von T4-DNA-Ligase und enzympezifischem Puffer wurde entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C ligiert.

2.2.8. Southern Blot

Zum Nachweis eines bestimmten Gens bzw. der Integration von Fremd-DNA im Genom wurde nach Isolierung (Kap. 2.2.1.) und Restriktion (Kap. 2.2.3.) genomischer DNA, gefolgt von elektrophoretischer Auftrennung (Kap. 2.2.5.), ein Southern Transfer (Southern, 1975) mit daran anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde durchgeführt. Die Durchführung der Hybridisierung und der immunologischen Detektion, sowie die

Markierung der Sonde erfolgte nach dem modifizierten Protokoll des DIG-high-prime-Kit (Boehringer, Mannheim, BRD).

Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung (Kap.2.2.5.) wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 N HCl, zwei Mal für 10 min in Denaturierungslösung (0,4 N NaOH, 1,5 M NaCl), zwei Mal für 10 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH:7,2, 1,5 M NaCl und 1 mM EDTA pH:8,0) und 2 min in 20 x SSC geschwenkt.

20 x SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat
 pH: 7,0

Währenddessen wurde ein Schwamm in Gelgröße luftblasenfrei in einem mit 20 x SSC befüllten Gefäß positioniert. Der Blot wurde auf dem Schwamm folgendermaßen aufgebaut: 3 Filter (Whatman 3MM, Maidstone, England), das Gel, die Nylonmembran (Porablot NY amp, Macherey und Nagel, Düren, BRD), 6 Filter und eine 4 cm dicke Schicht saugfähiges Papier. Pro cm² Membranfläche wurde der Blot mit 2-3 g Gewicht versehen und über Nacht wurde die DNA auf die Nylonmembran transferiert. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese für 40s und 0,2 J/cm² in einem UV-Transilluminator (Herolab CL-1) belichtet und für 30 min bei 80°C im Vakuumofen (VTR 5022, Heraeus, Hanau) gebacken.

High-SDS-Lösung: 5 x SSC
 2 % Blockierungslösung (v/v)
 0,1 % n-Lauryl-Sarkoniat (w/v)
 7 % SDS (w/v)
 50 % Formamid (v/v)
 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH: 7,0

Zur Hybridisierung wurde der Membranfilter 10 min in 2 x SSC gewaschen und 1 h in 15 ml High-SDS-Lösung im Hybridisierungssofen (Techne Hybridisier HB-1D) bei 42°C vorhybridisiert.

Zur Markierung der spezifischen DNA-Sonde wurden 10 ng -3 µg zu markierende DNA mit A. bidest. auf ein Volumen von 16 µl eingestellt, 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis schockgekühlt und mit 4 µl DIG-high-prime-mix versetzt. Nach 1stündiger Inkubation bei 37°C im Heizblock wurden 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 96 % Ethanol zugegeben. Nach Fällung

der Sonde bei -80°C für 30 min, wurde sie zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μl TE-Puffer rückgelöst.

Nach der Vorhybridisierung wurde der Membranfilter mit 2,5 ml High-SDS-Lösung/100 cm^2 Filterfläche versetzt, die Sonde für 10min bei 95°C denaturiert und in einer Konzentration von 20 ng Sonde/ml High-SDS-Lösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Hybridisierungssofen.

Zur immunologischen Detektion wurde der Filter zwei Mal für 5 min in 2 x SSC + 0,1 % SDS (w/v) bei Raumtemperatur und zwei Mal für 15 min in 0,1 x SSC + 0,1 % SDS (w/v) bei 68°C gewaschen. Nach 1minütiger Inkubation des Filters in 10 ml Maleinsäurepuffer + 0,3 % Tween 20 (v/v) wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran für 30 min in 10 ml Maleinsäurepuffer + 1 % Blockierungslösung (v/v, Boehringer, Mannheim, BRD) blockiert.

Maleinsäurepuffer:	100 mM Maleinsäure	Substratpuffer 4:	0,1 M Tris/HCl
	150 mM NaCl		100 mM NaCl
	pH: 7,5		50 mM MgCl_2
			pH: 9,5

Nach weiteren 30 min in 10 ml Maleinsäurepuffer + 2% Blockierungslösung und 0,75 U Antidigoxigenin-alkalischer Phosphatase wurde die Membran zwei Mal für 15 min in Maleinsäurepuffer + 0,3 % Tween 20 gewaschen und für 5 min in Substratpuffer 4 inkubiert. Der Nachweis fand entweder über CSPD[®], einem Chemilumineszenzfarbstoff mit daran anschließender Röntgenfilmbelegung (Kodak, X-OMAT[™] AR X-AR5), oder über 1-2stündige Inkubation in Färbelösung (0,3 mg/ml NBT und 0,2 mg/ml BCIP in Substratpuffer 4) statt.

2.2.9. Sequenzierung

Alle Katalase-cDNA-Klone nebst den vorgenommenen Modifikationen wurden sequenziert bzw. ansequenziert. Alle Sequenzierungen, außer *cata3* von *Helianthus annuus*, wurden selbst oder von Dr. M. Schmidt, J. W. von Goethe-Universität Frankfurt, durchgeführt. Die Sequenzierung von *cata3 Helianthus annuus* wurde von der Firma MWG AG Biotech, (Ebersberg, BRD) ausgeführt. Alle Sequenzen sind im Anhang beigefügt.

Die Sequenzierungen beruhen auf der enzymatischen Didesoxymethode von Sanger et al. (1977) und wurden mit Hilfe des T7-sequencing-kit (Pharmacia, Freiburg, BRD), TAQ-

Polymerase-kit (Stratagene, Heidelberg), Seq.Kit 2.0 Sequenase (Amersham Bioscience, Freiburg, BRD) und Reader & trade; DNA sequencing kit (MBI, St. Leon-Rot, BRD) nach Protokollen in den beiliegenden Handbüchern durchgeführt. Die Ansätze wurden mit ^{35}S -dATP (Amersham Bioscience, Freiburg, BRD) markiert, auf einem 5-6%igem Polyacrylamidgel (50 cm x 18 cm x 0,2-0,6 mm) aufgetrennt und mit einem Röntgenfilm belegt. Nach Entwicklung des Autoradiogramms wurde die Sequenzen gelesen und computergestützt analysiert (siehe Kap. 2.11.).

2.3. Arbeiten mit *Escherichia coli*

Verwendet wurden folgende *Escherichia coli* Bakterienstämme:

XL1-Blue MRF': $\Delta(\text{mcrA})$ 183, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrrr})$ 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F' *proAB*, *lac*^qZ Δ M15, Tn10 (*tet*^r)] (Stratagene, Heidelberg, BRD)

DH5 α [®]: F-*gyrA96* (*nal*^r), *recA1*, *relA1*, *endA1*, *thi-1*, *hsdR17* (*r_K⁻m_K⁺*) *glnV44*, *deoR*, $\Delta(\text{lacZYA-argF})$, U169[Φ 80d $\Delta(\text{lacZ})$ M15]

Top10F': {*proAB*, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15, Tn10 (*Tet*^R)}*mcrA*, $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, Φ 80*lacZ* Δ M15, ΔlacX74 , *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(\text{ara-leu})$ 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(*Str*^R), *endA1*, *nupG* λ - (Invitrogen, Karlsruhe, BRD).

2.3.1. Bakterienanzucht

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden über Nacht in LB-Medium bei 37°C und 180 Upm auf einem Schüttelinkubator (Braun Certomat R), Plattenkulturen über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) angezogen.

LB-Medium (pro Liter):	10 g NaCl	LB-Agar:	LB-Medium
(Sambrook et al., 1989)	10 g Casein-Lysat		+ 2 % Agar (w/v)
	5 g Hefeextrakt		
	pH: 7,0		

Bei Anzucht transformierter Bakterien wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, bei Anzucht untransformierter Bakterien Tetracyclin (25 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben.

2.3.2. Transformation und Cracking

Transformation von *E.coli*-Bakterien mit einem Plasmid wurde entweder chemisch oder per Elektroporation durchgeführt. Die chemische Transformation wurde zum einen mittels des TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, BRD) und zum anderen mit chemisch kompetenten Bakterien nach der TFB-Methode (Qiagen, Hilden, BRD) durchgeführt.

Zur Herstellung der kompetenten Bakterien nach der TFB-Methode wurde von einer Übernachtskultur 1 ml in 100ml LB-Medium + 25 µg/ml Tetracyclin überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4000 x g und 4°C wurde das Sediment in 30 ml auf 4 °C temperiertes TFB1 resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min bei 4°C wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem TFB2 resuspendiert, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

TFB1:	100 mM RbCl	TFB2:	10 mM MOPS
	50 mM MnCl ₂		10 mM RbCl
	30 mM Kaliumacetat		75 mM CaCl ₂
	10 mM CaCl ₂		15 % Glycerin (v/v)
	15 % Glycerin (v/v)		pH: 6,8 mit KOH
	pH: 5,8		

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20-50 ng DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für 90 s und einer weiteren 10minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 3 ml LB-Medium versetzt und für 2 h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Danach wurden die Zellen in 200/400 oder 600 µl Portionen auf Selektionsplatten ausplattiert. Wurde ein Vektor mit Blau/Weiß-Selektion eingesetzt, wurde dem auszuplattierenden Ansatz jeweils 30 µl Xgal (2 % in DMF(w/v)) und IPTG (0,1 M in A. bidest.) zugesetzt.

Zur Transformation mittels des MBI-TransformAid™-Kit wurden die dem Kit beigelegten fertigen Lösungen A und B sowie Medium C verwendet. Von einer Übernachtskultur wurden 150 µl in 1,5ml auf 37°C vorgewärmtes C-Medium überführt und für 20 min bei 180 Upm bei 37°C geschüttelt. Pro 2 Transformationen wurden je 250 µl T-Lösung mit 250 µl A-Lösung

gemischt und auf Eis vorgekühlt. Der Bakterienansatz wurde für 1 min sedimentiert, in 300 µl T/A-Gemisch resuspendiert, wiederum sedimentiert und in 120 µl T/A-Gemisch rückgelöst. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurden 50 µl der Zellen mit 5 µl Ligationsansatz (Kap. 2.2.7.) vermischt, 5 min auf Eis inkubiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation wurden von einer Übernachtskultur 1 ml in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 angezogen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Materialien durchgeführt. Nach Sedimentation der Zellen für 20 min bei 2500 x g wurden die Zellen mit jeweils 1 Volumen, ½ Volumen und 1/10 Volumen 10 % Glycerin (v/v) gewaschen, in 150µl 10 % Glycerin resuspendiert, in 40µl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

SOB+-Medium:	2 % Trypton (w/v)	SOB+-Selektionsplatten:	SOB+Medium
	0,5 % Hefeextrakt		1 % Agar (w/v)
	10 mM NaCl		50 µg Ampicillin/ml
	2,5 mM KCl		
	10 mM MgCl ₂ /MgSO ₄		

Zur Elektroporation wurden die auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen mit 1-2 µl DNA (in A. bidest.) versetzt, in die Küvette überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Bei einer 0,1 cm Küvette wurde in einem Elektroporator (Eppendorf Elektroporator 2510) ein Pulse von 25 µF, 1500 V und 800 Ω gegeben und direkt im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml SOB+-Medium resuspendiert, für 1 h bei 37°C in Schüttelinkubator inkubiert und auf SOB+-Selektionsplatten ausplattiert.

Nach Transformation mit einem Konstrukt ohne Blau/Weiss-Selektion wurde zur Identifizierung positiver Transformanden das Cracking-Verfahren (Sambrook et al., 1989) angewandt. Das Cracking-Verfahren basiert auf der Isolierung ungeschnittener Plasmide mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. Anhand der Größe können Plasmide mit inkloniertem Fragment von denen ohne Fragment unterschieden werden.

Pro Ansatz wurde 1 Kolonie in 1 ml LB-Medium+Ampicillin (50 µg/ml) für 6 h auf einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 Upm angezogen. Nach Sedimentation bei 10.000 x g wurden die Bakterien in 30 µl Cracking-Puffer resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation wurden 10-15 µl auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen. Nach

Identifizierung von Plasmiden mit Fragment wurden die entsprechenden Bakterienklone über Nacht erneut angezogen (Kap. 2.3.1.) und zur weiteren Analyse einer Plasmidisolierung (Kap. 2.2.1.1.) mit entweder daran anschließendem Restriktionsverdau (Kap. 2.2.3.) oder PCR (Kap. 2.2.4.) unterzogen.

Cracking-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH: 6,8
 2 mM EDTA
 0,4 M Saccharose
 1 % SDS (w/v)
 0,01 % Bromphenolblau (w/v)
 1/10 Vol RNase-Stammlösung (4mg/ml)

2.4. Hefesysteme

Es wurde mit den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (DY150: Clontech, Palo Alto, USA), CEN.PK2 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Entian, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, BRD), *Pichia pastoris* (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) und *Hansenula polymorpha* (= *Pichia angusta*) (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. P Hollenberg, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, BRD) gearbeitet. Die Behandlung erfolgte nach den leicht modifizierten Protokollen der Firmen Clontech (Heidelberg, BRD) und Invitrogen (Karlsruhe, BRD).

2.4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Der verwendete Hefestamm DY150 ist defizient in der Uracil-, Leucin-, Tryptophan- Adenin- und Histidinsynthese und besitzt eine Kanamycinresistenz. Er weist demzufolge den Genotyp MATa, *ura3-52*, *leu2-3, 112*, *trp1-1*, *ade2-1*, *his3-11*, *can1-100* auf.

CEN.PK2 ist ebenfalls Uracil-, Tryptophan-, Leucin und Histidin-defizient. Es wurde mit dem Wildtyp und diversen Mutanten gearbeitet. Mutante Δ *ctt-1* weist einen Defekt im codierenden Bereich der cytosolischen Katalase auf, Mutante Δ *cta-1* ist defizient in der Expression peroxisomaler Katalase und Δ *ctt-1cta-1* ist in beiden Genen gestört. Alle Mutanten und der Wildtyp weisen zudem eine Kanamycinresistenz auf.

2.4.1.1. Medien und Anzucht

YEPD-Vollmedium:	1 % (w/v) Yeast Extract
	1 % (w/v) Bactopepton
	2 % (w/v) D-Glucose
YNB-Selektionsmedium:	0.67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base without Amino Acids
	2 % (w/v) D-Glucose
	20 mg/l Histidin
	20 mg/l Tryptophan
	nur bei DY150
	20 mg/l Adenin
YEPD-Platten:	YEPD-Medium + 2 % (w/v) Agar
YNB-Platten:	YNB-Medium + 2 % (w/v) Agar

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte in 200 ml YEPD-Medium über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 200 Upm und 30°C. Bei Verwendung von YNB-Selektionsmedium musste bei Anzucht untransformierter Hefen zusätzlich noch Leucin und Uracil in einer Konzentration von 20 mg/l Medium zugegeben werden. Zur Herstellung von Stammkulturen wurde 1 ml einer hochgewachsenen *Saccharomyces*-Kultur mit 200 µl 80% Glycerol (v/v) versetzt und bei -80°C gelagert.

2.4.1.2. Vektoren und Konstrukte

Als Vektor für die Klonierung der Katalase cDNAs wurde der Expressionsvektor pYEX-BX (Clontech, Heidelberg, BRD) verwendet. pYEX-BX ist 7,1 kb groß, beinhaltet einen Hefe CUP1 Promotor, das β -Lactamase-Gen für Ampicillin-Resistenz, einen Replikationsursprung für *Escherichia coli*, einen Hefereplikationsursprung (2 μ), das Uracil-Gen (*ura3*) und *leu2-d*, das Leucin-Gen mit einem Krüppelpromotor. Die Transkription der klonierten cDNA wurde durch externe Gabe von CuSO₄ induziert.

Als Alternativstrategie wurde der induzierbare CUP1 Promotor von pYEX-BX durch den konstitutiv exprimierenden GAP-Promotor aus pGAPZ A (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) durch Klonierung ergänzt (pYEX-GAP).

Zur heterologen Expression funktioneller, pflanzlicher Katalasen in *Saccharomyces cerevisiae* wurden folgende cDNA's eingesetzt:

Secale cereale cat1 (siehe Anhang)

Soldanella alpina cat1 (siehe Anhang)

Homogyne alpina cat1 (siehe Anhang)

Weiterhin wurden an diesen cDNA's Modifikationen vorgenommen, welche nach heterologer Expression zu folgenden Veränderungen führte:

- a) 5'-lokalisierter 6 x His-tag durch Klonierung o. g. Katalase-cDNAs in den Vektor pQE-31 bzw. PCR (zu Verfügung gestellt von Dr. M. Schmidt, Universität Frankfurt).
- b) 5'-lokalisierter 6 x His-tag und 3'- lokalisierte peroxisomale Targeting-Sequenz 1 (PTS1) mittels PCR (siehe unten).
- c) 3'-lokalierte peroxisomale Targeting-Sequenz 1 (PTS1) mittels PCR (nur *cat1 Homogyne alpina*; siehe unten)

Zur Herstellung der PTS1 wurden Oligonukleotide verwendet, welche die Aminosäuresequenz S-K-F codieren. S-K-F gilt als potentielle peroxisomale Targeting Sequenz für peroxisomale Katalase von *Saccharomyces cerevisiae* (Cohen et al., 1988; Murphy et al., 1996, Swiss.-Prot. Datenbank).

Folgende Primer wurden zur Konstruktion der Modifikationen b) und c) eingesetzt:

Secale cereale:

5'-Primer: 5'-G-GAA-TTC-ACC-ATG-GAT-CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-GG 3'

bindet am 6 x His-tag

3'-Primer: 5'-AAT-TCA-AAA-TTT-GGA-TGG-CTT-CAC-GTT-GAG-3'

3'-TTA-AGT-TTT-AAA-CCT-ACC-GAA-GTG-CAA-CTC-5'

Hefe-PTS: 3'-**F – K – S** – 5'

Soldanella alpina:

5'-Primer: 5'G-GAA-TTC-ACC-ATG-GAT-CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-GG-3'

bindet am 6 x His-tag

3'-Primer: 5'GG-AAT-TCA-AAA-TTT-GGA-TGG-CCT-CAC-ATT-CAA-GCG-3'

3'CC-TTA-AGT-TTT-AAA-CCT-ACC-GGA-GTG-TAA-GTT-CGC-5'

Hefe-PTS: 3'-**F - K - S** - 5'

Homogyne alpina:

5'-Primer: 5'CT-AG-ACC-ATG-GAT-CAC-CAT-CAC-CAC-CAC-G'

bindet am 6 x His-tag

3'-Primer: 5'-AAT-TCA-AAA-TTT-GGA-GGG-GCG-CAC-ATT-GAG-GCG-TGA-3'

3'-TTA-AGT-TTT-AAA-CCT-CCC-CGC-GTG-TAA-CTC-CGC-ACT-5'

Hefe-PTS: 3'-**F - K - S** - 5'

Homogyne alpina nur PTS:

5'-Primer: 5'-ATG-GAC/T-CCN-TAC/T-AAG/A-CAG/A-3'

3'-Primer: 5'-AAT-TCA-AAA-TTT-GGA-GGG-GCG-CAC-ATT-GAG-GCG-TGA-3'

3'-TTA-AGT-TTT-AAA-CCT-CCC-CGC-GTG-TAA-CTC-CGC-ACT-5'

Hefe-PTS: 3'-**F - K - S** - 5'

Es lagen für die heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae* folgende Konstrukte vor:

Secale cereale: cat1-pYEX-BX

cat1-5'His-tag-pYEX-BX

Soldanella alpina: cat1-pYEX-BX

cat1-5'His-tag-pYEX-BX

cat1-5'His-tag-3'PTS-pYEX-BX

cat1-5'His-tag-3'PTS-pYEX-GAP

Homogyne alpina: cat1-3'PTS-pYEX-GAP

cat1-5'His-tag-3'PTS-pYEX-GAP

2.4.1.3. Transformation, Selektion und Induktion der Katalaseexpression

Von einer in YEPD-Medium angezogenen Übernachtskultur wurden 5 ml bei 3000 x g für 10 min in der Zentrifuge (Hermle ZK 401) sedimentiert. Das Sediment wurde zwei Mal mit LiAc-TE-Puffer gewaschen und in 200 µl LiAc-TE resuspendiert. Davon wurden 100 µl mit 1-5 µg Plasmid-DNA und 10 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) vermischt und mit 350 µl PEG-LiAc-TE versetzt. Der Ansatz wurde für 45 min bei 30°C inkubiert, danach erfolgte die Zugabe von 1/10 Vol DMSO. Nach 15minütiger Inkubation bei 42°C wurde der Ansatz auf Eis gestellt und 1 ml steriles A. bidest. zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 1500 x g für 5 min bei 4°C wurde der Ansatz mit A. bidest. gewaschen und das Sediment in 150 µl bidestilliertem Wasser rückgelöst. Jeweils die Hälfte des Ansatzes wurde auf eine YNB-Selektionsplatte (Kap. 2.4.1.1.) ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Selektionsmarker dienten eine Defizienz im URA3 und LEU2-Gen, welche durch Aufnahme des Plasmids ausgeglichen wurde. Als positiv erachtete Transformanden wurden über Nacht in 10 ml YNB-Selektionsmedium bei 30°C und 200 Upm in einem Schüttelinkubator angezogen.

LiAc-TE:

100 mM Lithiumacetat, pH 7.5

10 mM Tris/HCl, pH: 7.5

1 mM EDTA

PEG-LiAc-TE:

40 % (w/v) PEG 3500 in LiAc-TE

Nach Transformation der Hefen mit der Katalase-cDNA in pYEX-BX wurden jeweils 1ml frischer Übernachtskulturen in 100 ml YNB-Selektionsmedium überführt und für 18 h bei 30°C und 200 Upm auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen für 5 min bei 550 x g wurden diese in 100 ml YNB-Selektionsmedium resuspendiert und für weitere 2 h bei 200 Upm und 30°C inkubiert. Wenn die Hefen eine OD₆₀₀ von 0,8-1,2 erreicht hatten, wurde die Expression des Katalase-Proteins mit CuSO₄ in einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Nach 1stündiger Inkubation bei 200 Upm und 30°C wurden die Hefezellen für 5 min bei 4000 x g sedimentiert.

Übernachtskulturen von Hefezellen, welche mit dem konstitutiv exprimierenden Plasmid pYEX-GAP transformiert wurden, wurden ebenfalls in 100ml YNB-Selektionsmedium überimpft, 20 h inkubiert und sedimentiert.

2.4.1.4. Hefeauflschluss

Der Hefeauflschluss erfolgte enzymatisch mittels Zymolase. Die sedimentierten Zellen wurden in 1,5 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen und bei 4000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Zymolasepuffer resuspendiert und für 2 h auf dem Schüttelinkubator bei 180 Upm und 37°C inkubiert.

Zymolasepuffer: 1,2 M Sorbitol
50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,4
14 mM β -Mercaptoethanol
Zymolase (2 mg/ml)

Nach Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 1500 x g sedimentiert und mit 1 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 6 Volumen eiskaltem A. bidest. resuspendiert und mit 5 μ l PefaBlock (125 mg/ml) versetzt. Um den Erfolg des Aufschlusses zu gewährleisten, wurde ein Aliquot mikroskopisch kontrolliert. Waren noch zu viele intakte Hefezellen vorhanden, wurde der Ansatz mit einer Spatelspitze Glaskügelchen (\varnothing 0,18 mm) versetzt und 10 x 10 s gevortext. Alternativ dazu wurden die Zellen 8 x 10 s mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter mikroskopischer Kontrolle wurde der Ansatz in einer Eppendorfszentrifuge (Sigma) für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, der das rekombinante Katalaseprotein enthalten sollte, wurde in ein frisches Eppendorfgesäß überführt und für den Katalaseaktivitätstest (Kap. 2.8.1.) bzw. Western Blot (Kap. 2.7.1.2.) eingesetzt oder bei 4°C zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2. *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*)

Pichia pastoris ist als methylotrophe Hefe in der Lage, Methanol zu verstoffwechseln und als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Umsetzung von Methanol erfolgt in den Peroxisomen durch das Enzym Alkohol-Oxidase, welche in *Pichia* durch zwei Gene codiert wird, *aox1* und *aox2*. Expression des *aox1*-Gens ist für den Hauptbestandteil aktiver Alkohol-Oxidase in *Pichia* verantwortlich. Dieser beträgt nach Induktion durch Methanol mehr als 30 % des gesamten löslichen Zellproteins. Das *Pichia*-Expressionssystem von Invitrogen macht sich diese Eigenschaft zu Nutze, indem durch single cross-over die cDNA des gewünschten Proteins unter der Kontrolle des *aox1*-Promotors in das *Pichia*-Genom integriert wird. Durch Linearisierung des zu transformierenden Konstrukts mit *StuI* ist der gerichtete Einbau im

his4-locus im *Pichia*-Genom möglich. Eine Transkriptionskontrolle ist durch Gabe von Glycerin (Hemmung) oder Methanol (Induktion) möglich.

Die verwendeten *Pichia pastoris* Hefestämme GS115 und KM71 weisen als Selektionsmarker einen Defekt im *his4* Gen auf. KM71 weist zusätzlich eine *aox1*-Defizienz auf, was zu einem verzögertem Wachstum auf methanolhaltigem Medium und somit zu dem Phänotypen *mut^s* (Methanol utilization slow) führt. *Hansenula polymorpha* (= *Pichia angusta*) MCT75 ist Katalase-defizient und besitzt als Selektionsmarker einen Defekt im *ura3*-Gen.

2.4.2.1. Medien und Anzucht

Die Anzucht untransformierter *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha*-Zellen in YEPD-Vollmedium erfolgte wie in Kap. 2.4.1.1. beschrieben. Das bei *Pichia* und *Hansenula* verwendete Selektionsmedium beinhaltete jedoch lediglich 0.67 % Yeast Nitrogen Base without Amino Acids und 2 % D-Glucose; welchem bei Anzucht nicht transformierter *Pichia* Histidin (40 mg/l) und bei Anzucht untransformierter *Hansenula* Uracil (40 mg/l) zugesetzt werden musste.

Zur Transformation, Selektion, und Induktion der Proteinexpression wurden folgende Medien bzw. Anzuchtspalten benötigt:

MD-Medium: 1,34 % YNB (w/v)
 4 x 10⁻⁵ % Biotin (w/v)
 2% Dextrose (w/v)
 ggf: + Histidin oder Uracil (40 mg/l)

MD-Platten: MD-Medium + 2 % Agar (w/v)

MM-Medium: 1,34 % YNB (w/v)
 4 x 10⁻⁵ % Biotin (w/v)
 0,5 % Methanol (v/v)
 ggf: + Histidin oder Uracil (40 mg/l)

MM-Platten: MM-Platte + 2 % Agar (w/v)

MGY-Medium:	1,34 % YNB (w/v) 1 % Glycerol (v/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) ggf: +Histidin oder Uracil (40 mg/l)
BMG-Medium:	100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 6,0 1,34 % YNB (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 1 % Glycerol (v/v)
BMM-Medium:	100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 6,0 1,34 % YNB (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 0,5 % Methanol (v/v)
BMGY-Medium:	1 % Yeast Extract (w/v) 2 % Pepton (w/v) 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 6,0 1,34 % YNB (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 1 % Glycerol (v/v)
BMMY-Medium:	1 % Yeast Extract (w/v) 2 % Pepton (w/v) 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 6,0 1,34 % YNB (w/v) 4×10^{-5} % Biotin (w/v) 0,5 % Methanol (v/v)

2.4.2.2. Vektoren und Konstrukte

Als Vektoren für die heterologe Expression der Katalase cDNA's in *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha* wurden die Vektoren pHIL-D2, sowie pPIC3.5K (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) verwendet. pHIL-D2 weist eine Größe von 8,2kb auf, besitzt einen durch Methanol induzierbaren *aox1*-Promotor mit Kozak-Sequenz, das *his4*-Gen zur Selektion mit

einer *StuI*-Schnittstelle zur Integration in das *Pichia*-Genom, eine 3' *aox1*-Terminationssequenz, eine Ampicillinresistenz und einen Replikationsursprung für *Escherichia coli*. pPIC3.5K ist 9,0kb groß und weist zusätzlich als Selektionsmarker eine Kanamycinresistenz auf, so dass mit Gabe von Kanamycin oder dessen Analogon G418 ebenfalls selektioniert werden kann.

Als Alternativstrategie wurde das Plasmid pPIC3.5 (Invitrogen, Karlsruhe, BRD), welches bis auf die Kanamycinresistenz homolog zu pPIC3.5K ist, durch den konstitutiv exprimierenden GAP-Promotor aus pGAPZ A (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) durch Klonierung ergänzt (pPIC-GAP), so dass zum einen eine konstitutive Expression unter der Kontrolle des GAP-Promotors, zum anderen eine Selektion über das *his4*-Gen möglich ist.

Da *Hansenula polymorpha* eine Uracil-Defizienz aufweist, wurde als zusätzliche Strategie der *aox1*-Promotor aus pPIC3.5K in den *Saccharomyces cerevisiae*-Expressionsvektor pYEX-BX umklontiert (pURA3), so dass eine methanolinduzierte Expression in *Hansenula* und eine Selektion über *ura3* stattfinden sollte.

Zur heterologen Expression funktioneller, pflanzlicher Katalasen in *Pichia pastoris* bzw. *Hansenula polymorpha* standen ebenfalls die Katalase-cDNA's von *Secale cereale cat1*, *Soldanella alpina cat1*, *Homogyne alpina cat1* nebst der in Kapitel 2.4.1.2. beschriebenen modifizierten cDNA's zur Verfügung.

Es lagen folgende Konstrukte vor:

Secale cereale: *cat1*-5'His-tag-pHIL-D2
 cat1-5'His-tag-3'PTS-pPIC3.5K

Soldanella alpina: *cat1*-5'His-tag-pPHIL-D2
 cat1-5'His-tag-pPIC-GAP
 cat1-5'His-tag-3'PTS-pPIC3.5K
 cat1-5'His-tag-3'PTS-pPIC-GAP

Homogyne alpina: *cat1*-5'His-tag-3'PTS-pPIC3.5K
 cat1-3'PTS-pPIC3.5K
 cat1-3'PTS-pURA3

2.4.2.3. Transformation, Selektion und Induktion der Katalaseexpression

Die Transformation von *Pichia* und *Hansenula* erfolgte entweder durch die PEG1000-Transformationsmethode oder per Elektroporation.

Puffer A: M Sorbitol
 10 mM Bicin, pH: 8,35
 3 % Ethylenglycol (v/v)

Zur Herstellung von kompetenten Zellen nach der PEG1000 Methode wurden Einzelkolonien in 10 ml YEPD-Vollmedium über Nacht bei 250 Upm und 30°C im Schüttelinkubator angezogen. Davon wurden Zellen in 100 ml frisches YEPD-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 (5 x 10⁶ Zellen) überführt. Eine weitere Inkubation erfolgte, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 erreicht ist. Die Zellen wurden bei 3000 x g bei RT sedimentiert, mit 50 ml Puffer A gewaschen und erneut bei 3000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml Puffer A resuspendiert. Jeweils 200 µl wurden in Eppendorfgefäße aliquotiert und mit 11 µl frischem DMSO versetzt. Die Ansätze wurden gut durchmischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Puffer B: 40 % PEG 1000 (w/v)
 0,2 M Bicin, pH: 8,35

Puffer C: 0,15 M NaCl
 10 mM Bicin
 pH: 8,35

Zur Transformation wurden maximal 1 µg mit *StuI* linearisierte Plasmid-DNA mit 40 µg denaturierter und beschallter Heringssperma-Carrier-DNA in einem Volumen von 20 µl in ein Eppendorfgefäß mit noch gefrorenen, kompetenten Hefezellen gegeben. Nach 5 Minuten bei 37°C und zweifachem Invertieren, wurde dem Ansatz 1,5 ml Puffer B hinzugefügt. Es folgte eine 1stündige Inkubation bei 30°C. Die Zellen wurden für 10 min bei RT und 2000 x g sedimentiert und in 1,5 ml Puffer C resuspendiert. Im Anschluss wurde der Ansatz ein weiteres Mal zentrifugiert, in 200 µl Puffer C rückgelöst, auf YNB-Selektionsplatten ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen für die Elektroporation wurde von einer hochgewachsenen Kultur 1 ml in 500 ml YEPD überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5

angezogen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1500 x g und 4°C wurden die Zellen einmal mit 500 ml und einmal mit 250 ml A. bidest. gewaschen. Das Sediment wurde in 20 ml 1 M Sorbitol versetzt und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 1 M Sorbitol rückgelöst und in 80 µl Aliquots portioniert. Die elektrokompetenten Zellen sollten direkt für die Transformation eingesetzt werden, da eine Lagerung bei -80°C die Transformationseffizienz signifikant absenkt.

Zur Elektroporation wurden 80 µl kompetenter Hefen mit 5-20 µg linearisiertem Plasmid versetzt und gut durchmischt. Nach Überführung des Ansatzes in eine Küvette (0,2 cm) wurde ein Pulse von 10 ms und 7500 V/cm gegeben. Der Ansatz wurde sofort mit 1 ml 1M eiskaltem Sorbitol versetzt. Entweder wurden 50-600 µl direkt, oder nach 2stündiger Inkubation bei 30°C auf MD-Platten ausplattiert.

Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte, je nach verwendetem Plasmid, entweder über die entsprechende Aminosäuredefizienz, oder über den Einsatz von G418 (200 µg/ml), einem Kanamycinderivat.

Um die Integration des linearisierten Plasmids in das *Pichia*- bzw. *Hansenula*-Genom zu überprüfen, wurde genomische Hefe-DNA (Kap. 2.2.1.b) isoliert und einer PCR-Analyse unterzogen (Kap. 2.2.4).

Nach erfolgreicher Transformation von *Pichia pastoris* GS115 oder *Hansenula polymorpha* MCT75 mit einer Katalase-cDNA unter der Kontrolle des methanolinduzierbaren *aox1*-Promotors wurde zur Induktion der Katalaseexpression jeweils eine Kolonie in 25 ml MGY /BMGY oder BMG angeimpft. Bei Anzucht in BMGY, einem gepufferten Vollmedium, erfolgte ein besseres Wachstum als bei Anzucht in BMG, dem gepufferten Selektionsmedium. Die Gefahr einer Kontamination durch untransformierte Hefen durch fehlenden Selektionsdruck im Vollmedium ist jedoch sehr hoch. MGY als nicht-gepuffertes Anzuchtsmedium setzt Proteaseaktivitäten herab, führt jedoch zu verzögertem Wachstum. Nach Inkubation bei 30°C und 250 Upm auf dem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6, wurden die Zellen bei 3000 x g sedimentiert und in MM/BMM oder BMMY resuspendiert auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Nach 3-4 tägiger Inkubation bei 250 Upm und 30° C und täglicher Methanolgabe (Endkonz: 0,5 % (v/v)) wurden die Zellen bei 11.500 x g sedimentiert.

Zur methanolinduzierten Proteinexpression in *Pichia pastoris* KM71 wurde nach erfolgreicher Transformation eine Kolonie in 100 ml MGY/BMG oder BMGY angeimpft und bei 30°C und 250 Upm ebenfalls bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 angezogen. Nach Sedimentation wurden die Zellen in 15 ml MM/BMM oder BMMY resuspendiert. Nach Inkubation bei 30°C, 250 Upm und täglicher Methanolgabe von 0,5 % (v/v) wurden die Zellen nach 3-4 Tagen bei 11.500 x g sedimentiert.

Hefezellen nach Transformation mit einem DNA-Konstrukt unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden GAP-Promotors wurden in 100 ml YEPD-Vollmedium +200 µg/ml G418 für 3-4 Tage bei 30°C und 250 Upm auf einem Schüttelinkubator angezogen und danach bei 11.500 x g sedimentiert.

2.4.2.4. Hefeaufschluss

Zum Aufschluss wurden die sedimentierten Hefezellen in 1,5 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen, bei 3000 x g zentrifugiert und in 1 ml Zymolasepuffer resuspendiert.

Zymolasepuffer: 1,2 M Sorbitol
 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,4
 14 mM β-Mercaptoethanol
 Zymolase (2mg/ml)

Nach 1stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit 1,2 M Sorbitol gewaschen, in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH: 7,4; 1,5 M NaCl und 5µg Pefablock resuspendiert und erneut bei 3000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH: 7,4 + 1,5 M NaCl und 2 % Triton-X-100 (v/v) rückgelöst, mit 1 Volumen säuregewaschener Glasperlen (Ø 0,5 mm) versetzt und 8 Mal für 30 s gevortext und 30 s auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand, der die rekombinante Katalase enthalten sollte, bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5. Das Baculovirussystem

Es wurde mit *Autographa californica* (Fam: *Baculoviridae*), einem insektenpathogenen DNA-Virus, und der Sf9 Insektzelllinie (*Spodoptera frugiperda*), gearbeitet. Die Sf9-Zellen stammten von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA; ATCC-Nr: CRL17-11). Als Sf900-Zellen wurden Sf9-Zellen bezeichnet, welche an fötales Kälberserum-freies Medium adaptiert waren und darin kultiviert wurden. Linearisierte *Autographa*-Viren-DNA BaculoGold™ wurde von der Firma Pharmingen (San Diego, USA) bezogen. Alle sterilen Verbrauchsmaterialien und die automatische Pipettierhilfe stammten von der Firma Fisher Scientific (Schwerte, BRD). Das Medium und die L-Glutamin-Lösung wurde von der Firma c.c.pro GmbH (Neustadt, BRD), das fötale Kälberserum (FCS-Gold) von der Firma PAA Laboratories (Linz, Österreich), Lipofektin™ und Sf900-Pulvermedium von Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe, BRD) und Gentamycin von Serva (Heidelberg, BRD) bezogen. Lösungen und Puffer wurden entweder bei 121°C und 1 bar Überdruck für 45 min in einem Dampfautoklav (Webeko) sterilisiert oder durch 0,2 µm Filter steril filtriert.

Das Prinzip des Baculovirussystems als heterologes Expressionssystem wurde bereits in der Einleitung erläutert (siehe auch Abb. 4 und Abb. 6).

2.5.1. Medien und Anzucht

Den hier beschriebenen Methoden liegen die allgemeinen Angaben von Summers und Smith (1987) und O'Reilly et al. (1992) zugrunde.

Es wurden Dauerkulturen zur Kultivierung der Insektzellen, sowie Nutzungskulturen zum Einsatz bei der heterologen Proteinexpression angezogen.

Dauerkulturen:

Die Insektzellen wurden in 25 cm² Nunclon™Δ-Zellkulturflaschen in 5 ml Medium bei 27°C im Brutschrank (Heraeus, Hanau) als Monolayer angezogen. Nach 4-6 Tagen wurden die Zellen abgeschlagen und 0,8 ml der Zellen in 5 ml Medium in einer frischen Nunclon™Δ-Flasche überführt. Dieser Vorgang wurde alle 4-6 Tage wiederholt.

TNM-FH-Vollmedium: 500 ml TNM-FH-Medium
 10,3 ml 200mM L-Glutamin
 1 ml Gentamycin (50mg/ml)
 5 % fötales Kälberserum (FKS) (v/v)

Mit Insektenzellen, welche an serumfreies Sf900-Medium adaptiert waren, wurde ebenso verfahren.

Sf900-Medium: 38,1 g Sf900 Pulvermedium
(Angaben/Liter) 800 µl Sf900II Supplement
 pH: 5,9 mit NaOH
 0,35 g Natrium-Hydrogencarbonat
 pH: 6,3

Nutzungskulturen:

Je nach späterer Verwendung wurden von hochgewachsenen Dauerkulturen folgende Volumina überimpft und bis zur Bildung einer einschichtigen Zellschicht bei 27°C angezogen:

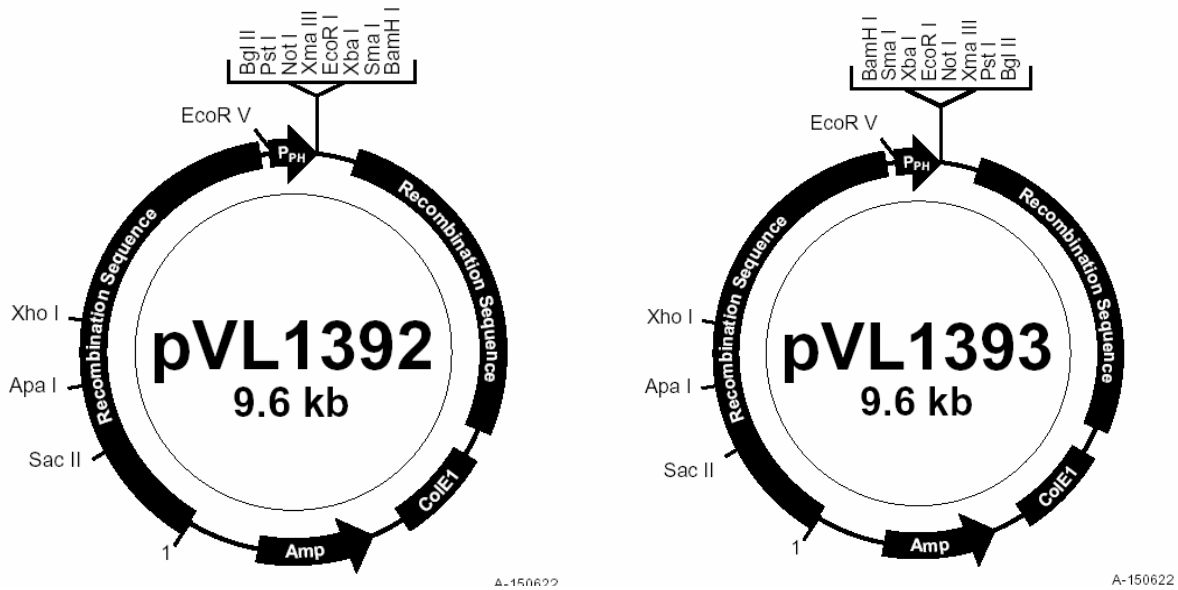
1,5 ml Zellen in 15 ml Medium (Nunclon™Δ EasyFlask, 75 cm² Kulturfläche)

5-10 ml Zellen in 30-50 ml Medium (Nunclon™Δ EasyFlask, 175 cm² Kulturfläche)

15 ml Zellen in 90 ml Medium (Nunclon™Δ TripleFlask, 500 cm² Kulturfläche)

2.5.2. Vektoren und Konstrukte

Als Vektoren für die Herstellung rekombinanter *Autographa californica* Baculoviren zur Infektion von *Spodoptera frugiperda* Sf9 und Sf900 Insektenzellen wurden pVL1392 und pVL1393 (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) eingesetzt. Beide Plasmide sind, bis auf ihre multiple cloning site, identisch. Sie sind 9,6 kb groß, weisen neben 2 Rekombinationssequenzen (ORF603+ und ORF 1629+) einen Replikationsursprung für *E.coli*, eine Ampicillinresistenz und den Polyhedrinpromotor auf (Abb. 5).

**Abbildung 5:**

Schema der Baculovirus-Expressionsvektoren pVL1392 und 1393. Beide Abbildungen stammen von der Firma Invitrogen und sind unter: <http://www.invitrogen.com>. erhältlich.

Als zu exprimierende cDNA's lagen folgende Konstrukte vor (siehe Kap.2.4.1.2.):

Secale cereale: *cat1*, *cat1*-5'His-tag

Soldanella alpina: *cat1*, *cat1*-5'His-tag

Homogyne alpina: *cat1*, *cat1*-5'His-tag

Da nicht bekannt war, ob der 5'-terminale His-tag die Assemblierung des tetrameren Katalaseproteins während der heterologen Expression stört, wurden als Alternativstrategie die cDNAs von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* über PCR (Kap. 2.2.4.) mit einem 3'-terminalen 6 x His-tag versehen. Dazu wurden folgende Primer eingesetzt:

***Secale cereale*:**

5'-Primer: 5'-GG-AAT-TCC-ATG-GAT-CCC-TGC-AAG-TTC-3'

3'-Primer: 5'-GG-AAT-TCA-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-CAT-GCT-TGG-CTT-C-3'

3'-CC-TTA-AGT-CAC-TAC-CAC-TAC-CAC-TAC-GTA-CGA-ACC-GAA-G-5'

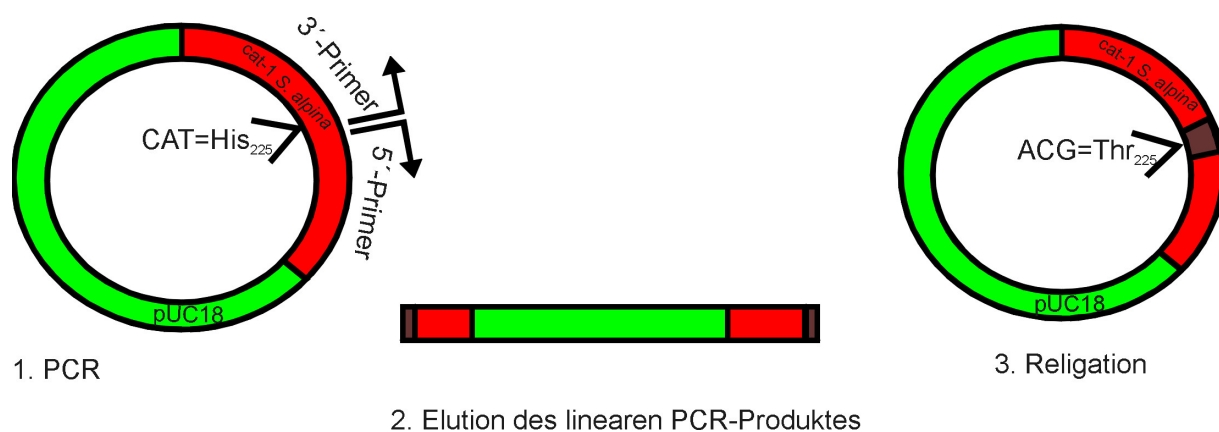
6 x His-tag

Soldanella alpina*:**5'-Primer: 5'-GG-AAT-TCC-ATG-GAT-CCT-TAC-3'3'-Primer: 5'-GG-AAT-TCA-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-CAT-GGT-TGG-CCT-C-3'3'-CC-TTA-AGT-CAC-TAC-CAC-TAC-CAC-TAC-GTA-CCA-ACC-GGA-G-5'**6 x His-tag**Homogyne alpina*:**5'-Primer: 5'-TTC-TAG-ACC-ATG-GAT-CCT-TAC-AAG-C-3'3'-Primer: 5'-G-TCT-AGA-TCA-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-ATA-GTT-GGG-GCG-C-3'3'-C-AGA-TCT-AGT-CAC-TAC-CAC-TAC-CAC-TAC-TAT-CAA-CCC-CGC-G-5'**6 x His-tag**

Weiterhin wurde *cata3* von *Helianthus annuus* (zu Verfügung gestellt von Dr. M. Schmidt, Universität Frankfurt) in den Baculovirus-Expressionsvektor pVL1392 kloniert und zur Expression in Insektenzellen eingesetzt.

2.5.2.1. *In vitro* Mutagenese der Katalase von *Soldanella alpina*

Die Primärstruktur der Katalase von *Soldanella alpina* wurde über *in vitro* Mutagenese der cDNA so verändert, dass ein Histidin, welches an Position 225 lokalisiert ist, durch ein Threonin ersetzt wurde. Um die Basensequenz so zu modifizieren, dass an dieser Position statt einem Histidin, ein Threonin codiert wurde, wurde eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt (Kap. 2.2.4.). Vor Beginn der PCR wurde die Katalase cDNA von *Soldanella alpina* in das Plasmid pUC18 umkloniert, da dieses mitamplifiziert wurde. Der *in vitro* Mutagenese lag folgende Strategie zu Grunde (Imai et al., 1991):



Die cDNA und das Plasmid wurden mit spezifischen Primern über PCR komplett amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde über Gelelektrophorese (Kap. 2.2.5.) aufgetrennt, das Fragment mit der richtigen Größe wurde eluiert (Kap. 2.2.6.) und ligiert (Kap. 2.2.7.). Die verwendeten spezifischen Primer veränderten die cDNA nicht nur so, dass statt ein Histidin ein Threonin codiert wurde; es wurde zusätzlich noch die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Eco72I* (**CACGTG**) miteingefügt. Diese zusätzliche Restriktionsschnittstelle vereinfachte die Identifizierung erfolgreich mutagenisierter cDNA-Klone über Restriktionsverdau (Kap. 2.2.3.). Zur Umsetzung der Strategie wurden folgende Primer eingesetzt:

5'-Primer: 5'-**CG**-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3'

3'-Primer: 5'-**T**-GAA-CTT-AAC-ATA-TTG-AGC-TTT-TC-3'

5'-Primer → **CG**-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3'

5' SaCat1-GGA-AAA-GCT-CAA-TAT-GTT-AAG-TTC-**CAT**-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3' SaCat1

G K A Q Y V K F **H** W K P T C G V

3'-CT-TTT-CGA-GTT-ATA-CAA-TTC-AAG-**T** ← 3'-Primer

Nach erfolgreicher Reamplifikation und Religation ergab sich folgende Sequenz:

Eco72I

5' SaCat1-GGA-AAA-GCT-CAA-TAT-GTT-AAG-TTC-**ACG**-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3' SaCat1

G K A Q Y V K F **T** W K P T C G V

Somit lagen für die Herstellung rekombinanter Baculoviren folgende Konstrukte vor:

<i>Secale cereale</i>	<i>Soldanella alpina</i>	<i>Homogyne alpina</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Kontrolle
<i>cat1</i> pVL1393	<i>cat1</i> pVL1393	<i>cat1</i> pVL1393	<i>cata3</i> pVL1392	pVL1392
<i>cat1</i> -5'His-tag-pVL1393	<i>cat1</i> -5'His-tag-pVL1393	<i>cat1</i> -5'His-tag-pVL1392		
<i>cat1</i> -3'His-tag-pVL1392	<i>cat1</i> -3'His-tag-pVL1392	<i>cat1</i> -3'His-tag (nur als Fragment)		
	<i>cat1</i> _{His225Thr} pVL1392			

Das 3'His-getaggte Katalase-Fragment von *Homogyne alpina* wurde nicht mehr in einen der Baculovirus-Expressionsvektoren (pVL1392 oder 1392) kloniert, da die Expression der 3'-His-getaggten Fragmente von *Soldanella alpina* und *Secale cereale* keine ausreichenden Proteinmengen ergaben.

2.5.3. Herstellung rekombinanter Baculoviren

Die Herstellung rekombinanter Baculoviren basiert auf Cotransfektion von Sf9-Zellen mit Plasmid-DNA und linearisierter BaculoGold™-Baculovirus-DNA. Die Baculoviren-DNA besitzt kein eigenes Polyhedringen, keinen Polyhedrinpromotor und es fehlt der C-terminale Teil des zur Virenvermehrung essentiellen ORF 1629+. Die Klonierung erfolgt durch homologe Rekombination der Viren-DNA mit den im Vektor enthaltenen Rekombinationssequenzen in den Sf9 Zellen während der Transfektion. Durch erfolgreiche Rekombination wird das Virengenom rezirkularisiert, besitzt einen vollständigen ORF 1629+ und die klonierte Katalase-cDNA ist unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors. Durch Vereinzelung im Plaque-Test werden erfolgreich rezirkularisierte Viren-DNA Klone identifiziert und isoliert. Durch Anreicherung der rekombinanten Viren-DNA wird eine Viren-Stammlösung hergestellt, mit der alle Folgeinfektionen durchgeführt werden. Nach Infektion der Insektenzellen mit rekombinanter Viren-DNA muss externes Häm hinzugefügt werden, da das endogene Häm der Insektenzellen nicht auszureichen scheint, um größere Mengen funktioneller pflanzlicher Katalase zu produzieren. Abbildung 6 stellt die Herstellung rekombinanter Baculoviren, sowie den Ablauf der heterologen Proteinexpression schematisch dar. Die Arbeitsmethoden basieren auf den allgemeinen Angaben von Summers und Smith (1987) und O'Reilly et al. (1992).

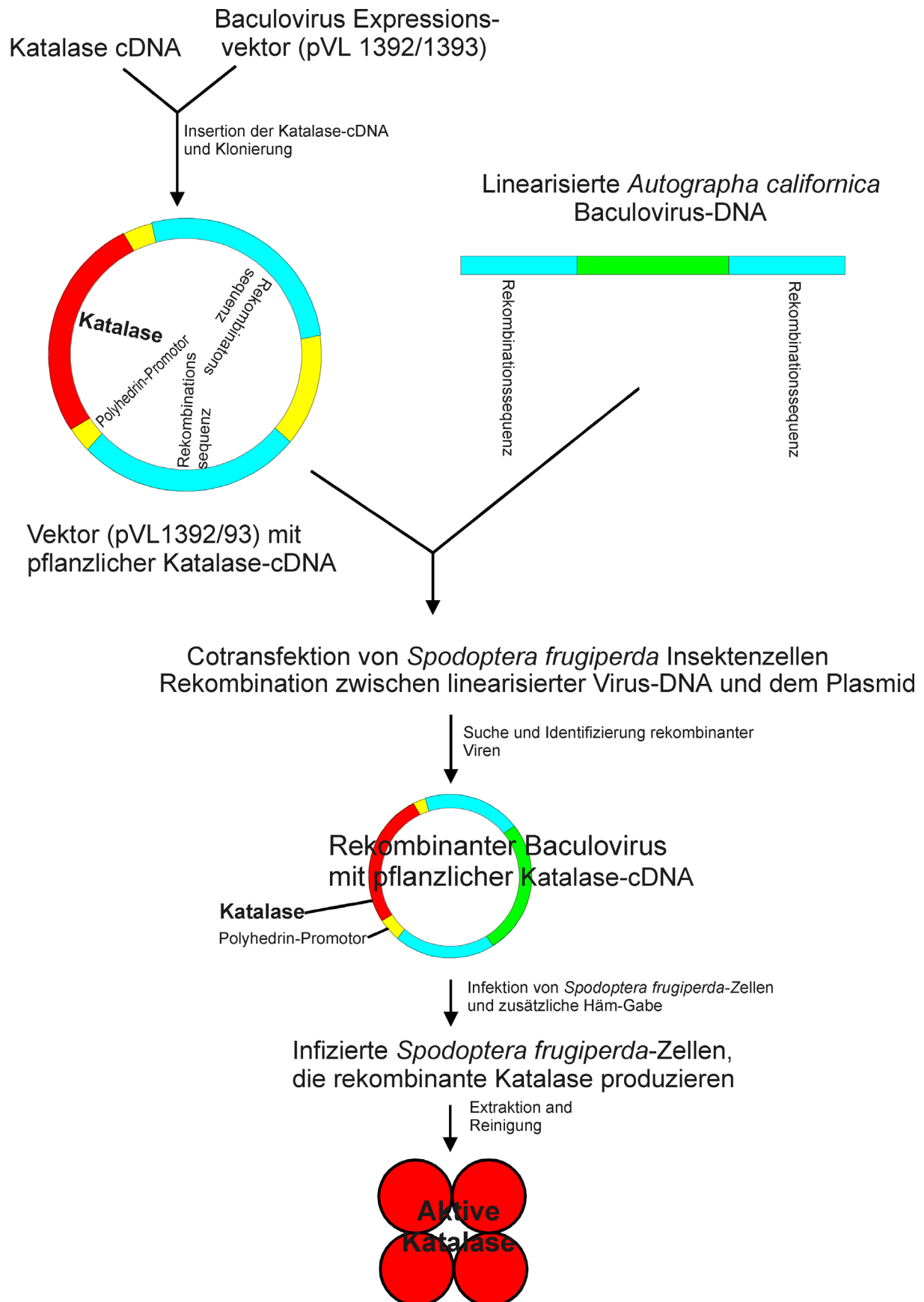


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herstellung rekombinanter Baculoviren und der erfolgreichen heterologen Expression aktiver pflanzlicher Katalasen.

2.5.3.1. Transfektion und Plaque-Test

Zur Transfektion der *Spodoptera frugiperda* Zellen wurden in Nunclon™-6er Multischalen pro Transfektionsansatz in eine Vertiefung 1,2 Millionen Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml ausgesät. Nach 1stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3 Mal in 5minütigen Abständen mit FKS-freiem TMN-FH Medium gewaschen.

Transfektionsmix: 0,4 µg Plasmid-DNA
 0,1 µg BaculoGold™
 30 µl Lipofekin™
 mit A. bidest.auf ein Endvolumen von 50 µl

Nach 15minütiger Inkubation des Transfektionsmix bei Raumtemperatur wurde er mit 1 ml TNM-FH-Medium ohne FKS versetzt und auf die Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde für 4-24 h bei 27°C in einer mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Schale inkubiert, im Anschluss daran wurde 1 ml TMN-FH-Medium mit 10 % FKS (v/v) zugegeben.

Nach 5-7 Tagen bei 27°C in einer ausreichend befeuchteten Schale konnte der Transfektionsansatz zur Vereinzelung der rekombinanten Viren dem Plaque-Test unterzogen werden.

Der Transfektionsansatz wurde komplett in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 4500 x g zentrifugiert. Vom Überstand, der die rekombinante Viren-DNA enthalten sollte, wurde mit TMN-FH-Vollmedium eine Verdünnungsreihe der Viren (10^{-2} bis 10^{-7}) in einem Endvolumen von 1 ml hergestellt.

Pro Transfektionsansatz wurden alle Vertiefungen einer Nunclon™-6er Multischale mit 1,35-1,4 Millionen Sf9-Zellen/2 ml TMN-FH-Vollmedium befüllt und 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Insektenzellen mit jeweils 1 ml verdünntem Transfektionsansatz überschichtet und 1-2 h bei RT inkubiert.

Für die Überschichtung der Sf9-Zellen in den 6er-Vertiefungsplatten mit Agarose wurden pro Vertiefung 1,5 ml 3 % Lowmelt-Agarose (w/v) aufgeschmolzen, auf 37°C abgekühlt und mit jeweils 1,5 ml auf 37°C vorgewärmtem TMN-FH-Medium mit 10 % FKS (v/v) vermischt. Die Agarosekonzentration betrug somit 1 % (w/v), die FKS-Konzentration 5 % (v/v).

Das Medium auf den Insektenzellen wurde abpipettiert und pro Vertiefung 3 ml Agarosegemisch zugegeben. Nach einer Aushärtungszeit von 1 h wurde die Agarose jeweils mit 1 ml TMN-FH-Vollmedium überschichtet und 4 Tage bei 27°C im Brutschrank in einer feuchten Schale inkubiert.

Durch erfolgreiche Rekombination und korrekte Insertion der Katalase cDNA wird im Baculovirengenom das lacZ-Gen unterbrochen. Um falsch positive Klone auszuschließen, wurde nach 4tägiger Inkubation der Blau/Weiss-Selektionstest begonnen. Positive Plaques erscheinen farblos, negative Plaques blau. Pro Vertiefung wurden 0,5 ml 3 % (w/v) Lowmelt Agarose aufgeschmolzen, mit TMN-FH-Vollmedium versetzt, auf 37°C abgekühlt und mit 200 µl Xgal (20 mg/ml in DMSO) vermischt. Das alte, auf den in Agarose-fixierten Sf9-Zellen befindliche Medium wurde durch das Xgal-haltige Agarosegemisch ersetzt und die Ansätze im Brutschrank bei 27°C in einer mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Schale inkubiert.

Nach 24 h wurden die Ansätze mikroskopisch (Olympus CK30) kontrolliert, Plaques im Zellrasen identifiziert, an der Schalenunterseite markiert und mit einer sterilen Pasteurpipette gestochen. Die gestochenen Plaques wurde auf in Nunclon™-6er Vertiefungsplatten frisch ausgesäte Sf9-Zellen (1,2 Millionen/2 ml) gegeben, welche in einer mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Schale für 27°C inkubiert wurden.

Nach 5-7 Tagen wurden die Ansätze in jeweils ein Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 20.000 x g zentrifugiert. 30 µl des Überstandes wurden mit 3 µl Xgal-Lösung zur erneuten Blau/Weiss-Selektion versetzt und nach 24 h ausgewertet. Der Rest des Überstandes galt nach erfolgreicher Auswertung als Viren-Primärstammlösung und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Aus den jeweiligen Sedimenten wurden DNA zur weiteren Analyse isoliert (Kap. 2.2.1.c).

2.5.4. Herstellung einer Virenarbeitslösung

Zur Herstellung einer Virenarbeitslösung wurden 50 µl der Virenprimärstammlösung auf eine hochgewachsene 5 ml Sf9-Kultur gegeben. Wurde das Volumen der Insektenzellkultur auf 30 ml erhöht, wurden 100 µl der Virenprimärstammlösung eingesetzt. Nach einer 7-10 tägigen Inkubation bei 27°C wurde der Ansatz für 5 min bei 15.000 x g zentrifugiert und der Überstand enthielt nun die infektiösen, rekombinanten Virenpartikel.

Zur Bestimmung des Titers einer Baculovirus-Lösung kann ein Plaque-Test, wie unter Kap. 2.5.3.1. beschrieben, durchgeführt werden und der Titer durch Auszählen der Plaques im Zellrasen einer Nunclon™-6er Multischale bei der jeweiligen Verdünnung berechnet werden. Standardmäßig wurde jedoch für jede Virenarbeitslösung das einzusetzende Volumen durch Ermittlung des Gehaltes an rekombinantem Protein (Katalaseaktivität/mg Frischgewicht) bestimmt.

2.5.5. Optimierung der Katalaseexpression in *Spodoptera frugiperda*-Zellen

Da Katalase ein tetrameres Enzym mit Häm als prosthetischer Gruppe ist, muss den Insektenzellen nach Infektion externes Häm zugeführt werden, damit sie in der Lage sind, funktionelle pflanzliche Katalase zu exprimieren. Daher wurden verschiedene Zeitreihen durchgeführt, um folgende Faktoren zu optimieren:

- a) Endkonzentration des extern zugeführten Häms
- b) Zeitpunkt der Hämgabe nach Infektion
- c) Erntezeitpunkt der infizierten Zellen nach Infektion und Hämgabe

Häm-Stammlösung (10 mM): 0,0652 g Hemin
 3 ml 1 M NaOH
 2 ml 200 mM Hepes/KOH, pH: 8,2
 mit 1 M HCl neutralisieren (pH: 7)
 A. bidest., Endvolumen: 10 ml
 Lagerung: -80°C

Dazu wurden in Nunclon™-6er Multischalen jeweils 1,2 Millionen Zellen/Vertiefung ausgesät. Je nach Ziel der Zeitreihe wurde entweder das Volumen der Häm-Stammlösung variiert, der Zeitpunkt der Hämgabe oder der Erntezeitpunkt, als Bezugsgröße wurde die Katalaseaktivität/Ansatz zu Grunde gelegt. Da die Expression in an serumfreies Medium adaptierten Sf900-Zellen wesentlich schlechter war als die Proteinexpression in Sf9-Zellen, wurden alle Folgeexperimente ausschließlich mit Sf9-Zellen durchgeführt.

2.5.6. Heterologe Katalaseexpression in Insektenzellen

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Expression pflanzlicher Katalasen wurden die Insektenzellen in TMN-FH-Medium angezogen. Nachdem die Zellen zu einer einschichtigen Zellschicht hochgewachsen waren, wurden sie mit rekombinantem Baculovirus infiziert. Das Volumen des eingesetzten Virus wurde, wie in Kap. 2.5.4. beschrieben, ermittelt, betrug jedoch meist 300-600 μ l/50 ml Ansatz. Jedem Infektionsansatz wurde ein Kontrollansatz zugeordnet, der entweder mit dem gleichen Volumen an rekombinantem Virus ohne Katalase-Insert versetzt, oder nicht infiziert wurde.

Nach 48h wurde allen Ansätzen Häm in einer Endkonzentration von 20 μ M und 65 μ g/ml PefaBlock zugegeben. Die rekombinante Katalase von *Secale cereale* wurde 90-100 h, von *Soldanella alpina* 100-120 h, die Katalase von *Homogyne alpina* 90-110 h und *Helianthus annuus* 110-120 h nach Infektion geerntet.

Zur Extraktion des Proteins wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche abgeschlagen und bei 2.500 x g für 10 min sedimentiert. Nach einer Frischgewichtsbestimmung wurden sie entweder bei -20°C gelagert oder direkt in Extraktionspuffer (1 ml/g FG) rückgelöst.

Extraktionspuffer: 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5
2 % Triton-X-100 (v/v)
DNase (0,1 mg/ml)

Nach 1-2stündiger Inkubation im Dunkeln auf Eis wurden die Zellen 5 x für 10 s mit Ultraschall (Sonifier B-12 Cell Disruptor, Branson Sonic Power Company) aufgebrochen. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C wurden 20 μ l des Überstandes für den Katalaseaktivitätstest (Kap. 2.8.1.) eingesetzt. Überstände mit rekombinanter Katalaseaktivität wurden vereinigt und zur weiteren Verwendung gereinigt (Kap. 2.6.3.).

2.6. Proteinextraktion und Proteinreinigung

2.6.1. Isolierung von Katalase aus Roggenblättern

Die Isolierung endogener Blattkatalase aus *Secale cereale* basiert auf dem Protokoll von Hertwig et al. (1992). Roggenkaryopsen (L.cv. Petkus „Halo“ Ernte 1999-2002) wurden zur Oberflächensterilisation für 10 min in filtrierter 3 % Chlorkalklösung (w/v) vakuumfiltriert, 30 min bei RT inkubiert, 90 min in entionisiertem Wasser gespült und mit KNOP-Nährlösung für 6 Tage bei 22°C und einer Lichtstärke von $96 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ PAR angezogen.

Für die KNOP'sche Nährlösung nach Feierabend und Schrader (1976) wurden folgende Stammlösungen benötigt:

- | | |
|--|---|
| a) 0,7 M KNO_3 | b) 0,1 M KH_2PO_4 |
| c) 0,95 M KCl | d) 0,12 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ |
| e) 0,115 M $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | f) 25 mM $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und 25 mM Na_2EDTA |

Spurenelemente Lösung:

- 26 mM $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 5 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,17 mM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
- 2 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 24 mM H_3BO_3

Für 1 l KNOP'sche Nährlösung wurden folgende Volumina in steriles A. bidest. zugegeben:

- 20 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
- 20 ml KNO_3
- 10 ml $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 10 ml KH_2PO_4
- 1 ml KCl
- 1 ml $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{EDTA}$
- 1 ml Spurenelemente-Lösung

Alle Isolierungsschritte wurden auf Eis und mit auf 4°C vorgekühltem Arbeitsmaterial durchgeführt. Es wurden ca. 500 g Blattmaterial geerntet, kleingeschnitten und in einem

Rasierklingenmixer (Braun) unter Zugabe von 1 Liter 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5 und 10 mM Natrium-Dithionit homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Mull (Hartmann Verbandmull ZZ) und eine Lage Miracloth (Calbiochem® Biosciences Inc. La Jolla, Californien, USA) filtriert und für 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Katalase-Aktivitätsmessung (Kap. 2.8.1.) direkt für die Chloroform-Ethanol-Fällung (Kap. 2.6.3.1.) eingesetzt.

2.6.2. Isolierung von Katalase aus Sonnenblumenkotyledonen

Die Isolierung von katalasehaltigen Core-Fractionen aus Peroxisomen von *Helianthus annuus* wurde nach dem modifizierten Protokoll von Tenberge et al. (1997) durchgeführt. Samen von *Helianthus annuus* wurden für 10 min in 3% Chlorkalklösung (w/v) vakuumfiltriert, 30 min bei RT inkubiert, 90 min in entionisiertem Wasser gespült und über Nacht in Wasser vorgequollen. Danach wurden sie in feuchtem Vermikulit ausgestreut, für 3 Tage im Dunkeln bei 22°C und für 3 Tage bei 22°C und einer Lichtstärke von 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$ PAR angezogen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit auf 4°C vorgekühlten Arbeitsutensilien durchgeführt. Nach Ernte von 80 g Sonnenblumenkotyledonen wurden diese zerkleinert und mit 250 ml Extraktionsmedium im Rasierklingenmixer homogenisiert.

Extraktionsmedium:

0,3 M Mannitol

10 mM Natrium-Dithionit

1 mM EDTA

20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5

0,1 % (w/v) BSA

Waschpuffer 1:

0,3 M Mannitol

10 mM Na-Dithionit

1 mM EDTA

10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5

0,1 % (w/v) BSA

Waschpuffer 2:

0,3 M Mannitol

1 mM EDTA

10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5

0,1 % (w/v) BSA

Verdünnungspuffer:

0,3 M Mannitol

1 mM EDTA

10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5

Der Rohextrakt wurde durch 3 Lagen Mull und 1 Lage Miracloth filtriert und für 15 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 10.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und das Sediment in 40 ml Waschpuffer 1 resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 15 min und 250 x g wurde der Überstand wiederum bei 6000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, das Sediment in 2 ml Waschpuffer 2 resuspendiert und jeweils 1ml auf einen Percoll-Stufengradienten geladen.

Die Percoll-Gradienten bestanden aus jeweils 3 ml 80%, 20 ml 38% und 2 ml 20% Percoll (v/v) in 0,3 M Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM Tricin/NaOH, pH: 7,5 und 0,1% BSA (w/v) (Endkonzentrationen) in Sorvall PK25 Zentrifugationsgefäßen.

Die beladenen Gradienten wurden in einer Ultrazentrifuge (Sorvall OTD 65 B, Rotor: AH-629) für 30 min bei 4°C und 40.000 x g zentrifugiert und in 0,5 ml Fraktionen fraktioniert. In den Fraktionen wurde die Katalaseaktivität bestimmt (Kap. 2.8.1.) und während der ersten Isolationen ebenfalls die Glycolat-Oxidase-Aktivität (Kap. 2.8.3.), um zu detektieren, ob es sich um reine Core-Katalase (ohne Glycolat-Oxidaseaktivität) oder um Mischfraktionen (Core- und Matrixkatalase) handelte. Zur weiteren Reinigung der Cores wurden alle Fraktionen mit Katalaseaktivität jeweils mit 2-3 Volumen Verdünnungspuffer versetzt und für 15 min bei 4000 x g zentrifugiert. Das Sediment enthielt die Core-Katalase, der Überstand die peroxisomale Matrix-Katalase, welche verworfen wurde. Die Cores wurden so lange mit jeweils 1 ml 10mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 gewaschen, bis die Überstände keine Katalaseaktivität mehr enthielten. Die nun hochgereinigten Cores waren bei 4°C lagerfähig.

Zur Isolierung größerer Mengen an löslicher peroxisomaler Matrixkatalase wurden Sonnenblumenkotyledonen wie oben beschrieben angezogen und geerntet. Pro Gramm Frischgewicht wurde 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5, sowie 10 mM Natrium-Dithionit zugegeben und die Blätter in einem Rasierklingenmischer homogenisiert. Nach Filtration des Rohextraktes durch 3 Lagen Mull und 1 Lage Miracloth wurde bei 20.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand erneut bei 27.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Um das Natrium-Dithionit aus dem Extrakt zu entfernen wurde dieser über eine NAPTM-10 Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) oder über die Sephadex-G25-Säule (Kap. 2.6.3.3.1.) gereinigt. Danach wurde der Extrakt erneut für 20 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die lösliche Matrixkatalase enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und war für ca. 1 Woche bei 4°C lagerfähig.

2.6.3. Allgemeine Proteinreinigungsverfahren

2.6.3.1. Chloroform-Ethanol-Fällung

Die Chloroform-Ethanol-Fällung wurde ausschließlich zur Reinigung von isolierter Blattkatalase und rekombinanter Katalase von *Secale cereale* eingesetzt, da bei allen anderen Katalasen die Aktivitätsverluste während der Reinigung zu groß waren. Sie wurde nach dem modifizierten Protokoll von Hertwig et al. (1992) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C vollzogen.

Der katalasehaltige Extrakt wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5 auf ein Endvolumen von 50 bzw. 500 ml eingestellt und über einen Scheidetrichter mit 40 bzw. 400 ml Chloroform/Ethanol (1:3, v/v) unter ständigem Rühren versetzt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 3000 x g bei 4°C wurden pro 100 ml Oberphasenvolumen 0,2 g silanisierte Glaskugeln (Ø 0,18 mm) zugegeben und der Extrakt über Scheidetrichter mit 2 Volumen 96 % Ethanol versetzt. Nach Zugabe des Ethanols wurde der Ansatz für 1 h bei 4°C gerührt und im Anschluss für 10 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Das sedimentierte Katalaseprotein wurde jeweils mit 80 % und 60 % Ethanol (v/v) gewaschen und danach mehrfach mit 100 mM K₂HPO₄ extrahiert. Die erhaltene Katalase-Lösung wurde mit 100 mM KH₂PO₄ auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und entweder direkt in den Versuch eingesetzt, mit Ammoniumsulfat gefällt oder über Säulenchromatographie weiter gereinigt.

2.6.3.2. Ammoniumsulfat-Fällung

Die Ammoniumsulfatfällung wurde für die Reinigung von rekombinanter und aus Blättern isolierter Roggenkatalase, sowie von rekombinanter *Soldanella alpina*-Katalase eingesetzt. Sie wurde nach dem modifizierten Protokoll von Hertwig et al. (1992) durchgeführt. Der Extrakt wurde im Dunkeln auf Eis mit gemörsertem Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 20 % Sättigung (113 g/l) unter Rühren versetzt und für 10 min bei 14.500 x g und 4°C zentrifugiert. Zur Kontrolle wurde ein Katalaseaktivitätstest (Kap. 2.8.1.) des Überstandes durchgeführt und die Katalase mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 50 % Sättigung (188 g/l) gefällt. Das Protein wurde bei 14.500 x g für 10 min sedimentiert, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5 resuspendiert und für 24 h bei 4°C gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5 dialysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 27.000 x g kann der Überstand entweder direkt eingesetzt werden, oder das Protein wird über Säulenchromatographie weiter gereinigt.

2.6.3.3. Säulenchromatographie

Zur Reinigung rekombinanter Katalasen von *Soldanella alpina*, *Homogyne alpina* und *Helianthus annuus* wurden auf verschiedenen Trenneigenschaften basierende Säulenmaterialien eingesetzt. Ebenso wurden die schon vorgereinigten Blattkatalasen von *Secale cereale* und *Helianthus annuus*, sowie die rekombinante *Secale*-Katalase über Säulen weiter aufgereinigt.

2.6.3.3.1. Sephadex G-25

Die Sephadex G-25 Säule basiert auf dem Molekularsiebprinzip. Zur Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen wurde eine Säule von 10 cm x 1 cm eingesetzt. Als Laufmittel diente 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5. Die Fliessgeschwindigkeit der Pumpe (Pharmacia LBK-Pump P-1) betrug 100-150 ml/h, der Fraktionsssammmler (ISCO Foxy™ 2200) portionierte 1 ml Fraktionen. Die Fraktionen mit Katalaseaktivität wurden vereinigt.

2.6.3.3.2. Sephacryl S 300 HR

Es wurde eine 10 cm x 1cm große, mit Sephacryl S 300 HR gefüllte Säule benutzt, welche ebenfalls als Molekularsieb fungierte. Als Laufmittel dienten 5 mM Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5. Fliessgeschwindigkeit der Pumpe und Fraktionsgrößen sind unter 2.6.3.3.1. beschrieben.

2.6.3.3.3. Phenylsepharose

Die Phenylsepharosesäule ist den HIC-Säulen (hydrophobic interaction column) zuzuordnen. Sie bindet die Katalase aufgrund hydrophober Interaktionen (Phenylsepharose™ High Performance, Pharmacia, Uppsala, Schweden). Durch Erhöhung der Hydrophobizität des Eluenten wird diese Bindung reversibel, und das Protein kann spezifisch von der Säule gewaschen werden. Die Reinigung basierte auf dem Protokoll von Herwig et al. (1992). Die Fliessgeschwindigkeit betrug 100-150 ml/h, und es wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen. Equilibriert wurde die Säule mit 20 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH:6,8. Das zu reinigende Katalaseprotein befand sich in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 + 1 M (NH₄)₂SO₄. Nach Beladung der Säule wurde mit 15 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und das Protein mit 45 % Ethylenglycol (v/v) in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH: 7,4 eluiert. Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde die Säule mit 10 ml 0,5 N NaOH gespült und dann mit einem Ethanolgradient bis zu einer Endkonzentration von 70 % gewaschen. Nach

Spülung der Phenylsepharose mit 25 ml A. bidest. konnte die Säule wieder neu equilibriert werden.

Das Ethylenglycol wurde über die Sephadex G-25 Säule oder eine Zentrifugationssäule (Vivaspin 20ml Concentrator Ø30kDa, Vivascience, Hannover, BRD) aus der Probe entfernt.

2.6.3.3.4. IMAC

Bei der IMAC-Säule (Immobilized-metal-ion-affinity chromatography) wird das Säulenmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Freiburg) mit Metallionen (hier: Zn^{2+}) beladen. Diese interagieren mit dem Häm bzw. den Histidinresten der Katalase. Es wurde das modifizierte Protokoll von Yang und DePierre (1998) angewandt. Die Flussrate betrug 100-150 ml/h, und es wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen. Sie wurde als Alternative zu der in Kapitel 2.6.3.3.3. beschriebenen Phenylsepharose-Säule eingesetzt.

Es wurde mit einer 10 cm x 1 cm Säule gearbeitet, welche zuerst mit 15 ml A. bidest. gespült wurde. Das Säulenmaterial wurde mit 25 ml 20 mM $ZnCl_2$ beladen und danach mit A. bidest. gespült. Der Durchlauf wurde mit Natrium-Carbonatlösung (50 mg/ml) getestet. Wenn nichts ausfiel, war das ungebundene Zink herausgewaschen. Equilibriert wurde mit 50 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH: 7,0 + 1 M NaCl. Die Säule wurde mit dem Extrakt (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH. 7,5) beladen und mit jeweils 10 ml Equilibrierungspuffer, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH: 6,0 + 0,5 M NaCl sowie 50 mM Natriumphosphatpuffer pH: 7 + 1 M Ammoniumchlorid gewaschen. Eluiert wurde mit 30 ml 50 mM Natriumdihydrogenphosphat + 0,2 M Imidazol pH: 7,0. Fraktionen mit Katalaseaktivität wurden vereinigt und das Imidazol mittels einer Zentrifugationssäule (Vivaspin 20 ml Concentrator Ø30k Da) und mehrfachem Spülen mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 (jeweils 60 min bei 6000 x g) herausgewaschen und das Volumen der Proteinprobe auf 2-5 ml eingeengt.

2.7. Proteinanalyse

Zur Analyse des isolierten und zum Teil vollständig gereinigten Proteins wurden SDS-Gelelektrophorese und Proteinbestimmungsmethoden durchgeführt.

2.7.1. SDS-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Gelelektrophorese nach der modifizierten Methode von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Es wurde ein 10%iges Trenngel (7,5 cm x 13 cm x 1,5 mm) mit einem 5%igen Sammelgel (3 cm x 13 cm x 1,5 mm) gegossen und in die Apparatur eingespannt, welche dann mit Laemmli-Puffer befüllt wurde. Es wurden auch SDS-Minigele mit dem Gesamtmaß 8,5 cm x 9 cm x 1,0 mm eingesetzt.

Laempuffer (Laemmli):	0,05 M Tris
	0,38 M Glycin
	0,1 % SDS
	pH: 8,3
10% Trenngel:	7,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl, pH: 8,8)
	120 µl 25 % SDS (w/v)
	10 ml Acryl/Bisacrylamid (30 : 0,8)
	12,4 ml A. bidest.
	46 µl TEMED
	40 µl 10 % Ammoniumpersulfat (w/v)
5% Sammelgel:	2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl, pH: 6,8)
	40 µl 25 % SDS (w/v)
	1,7 ml Acryl/Bisacrylamid (30:0,8)
	5,8 ml A. bidest.
	30 µl TEMED
	30 µl 10% Ammoniumpersulfat (w/v)

Die Proben wurden mit 4fach konzentriertem Ladepuffer verdünnt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

4 x Ladepuffer: 200 mM Tris/HCl pH: 6,8
 8 % SDS (w/v)
 0,8 % Bromphenolblau (w/v)
 40% Glycerin (v/v)
 400 mM Dithiothreitol

Das maximale Probenvolumen betrug inklusive Ladepuffer 100 µl. Um das aufzutragende Probenvolumen zu verkleinern, konnte vor Zugabe des Ladepuffers das Protein mit 5 Volumen auf 4°C temperiertem Aceton für 30 min bei –20°C gefällt werden. Das Protein wurde für 20 min bei 21.000 x g sedimentiert, der Überstand verworfen, das Sediment für 15 min bei RT inkubiert um das restliche Aceton abzdampfen und in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5 resuspendiert.

Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 6-8 mV durchgeführt. Als Proteinmarker diente der Protein Molecular Weight Marker und Prestained Protein Molecular Weight Marker von MBI-Fermentas (St. Leon-Rot, BRD) mit folgenden Größen (kDa):

Protein Molecular Weight Marker:		Prestained Marker:	
116	Beta-Galaktosidase	119	Beta-Galaktosidase
66,2	Rinderserumalbumin	79	Rinderserumalbumin
45	Ovalbumin	46	Ovalbumin
35	Laktat-Dehydrogenase	31	Carboanhydrase
25	RE <i>Bsp98I</i>	24	Beta-Laktoglobulin
18,4	Beta-Laktoglobulin	19	Lysozym
14,4	Lysozym		

2.7.1.1.Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von über Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden im SDS-Gel wurde das Gel für 2 h in Färbelösung und für 6 – 24 h in Entfärbelösung inkubiert.

Färbelösung: 0,25 % Coomassie Blau (w/v)	Entfärbelösung: 50% Methanol (v/v)
50 % Methanol (v/v)	10% HAc (v/v)
10 % HAc (v/v)	

Der Coomassiefarbstoff lagert sich in das Protein ein und bleibt nach Entfärbung des Gels sichtbar, so dass Proteinbanden detektiert werden können. Die Nachweisgrenze liegt bei 200-400 ng Protein/Bande (Rehm, 1997).

Das Gel wurde dann in einem Geltrockner (Savant, Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, BRD) für 4-6 h bei 65°C unter Vakuum getrocknet.

2.7.1.2. Western-Blot

Zum Nachweis von Katalase-Untereinheiten diente der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit daran anschließender Bindung eines spezifischen Antikörpers. Es wurden Antikörper gegen CAT1 von *Secale cereale* und CAT1 von *Homogyne alpina* eingesetzt. Zur Herstellung des Katalaseantikörpers von *Secale cereale* wurden Kaninchen mit isolierter und gereinigter Roggenblattkatalase immunisiert und im Anschluss daran das Antiserum isoliert (durchgeführt von Dr. M. Schmidt, Universität Frankfurt). Für das Antiserum gegen CAT-1 von *Homogyne alpina* wurde inaktive Katalase in *Escherichia coli* heterolog exprimiert und gereinigt (F. Badenhop, Universität Frankfurt). Die Immunisierung der Kaninchen mit der rekombinanten *Homogyne*-Katalase mit anschließender Isolierung des Antiserums wurde von der Firma Biotrend (Köln, BRD) durchgeführt.

Für den Western Blot wurden 6 Whatman-Filterpapiere (3MM Chr, Maidstone, England) und eine Nitrocellulosemembran NCP Ø 0,45 µm (Macherey und Nagel, Düren, BRD) auf Trenngelgröße zurechtgeschnitten und mit Transferpuffer (1:3 verdünnter Laemmli-Puffer) getränkt. Auf 3 Filter wurde die Nylonmembran, das Gel und wiederum 3 Filterpapiere in die Blotapparatur gelegt. Der Transfer erfolgte bei 4°C in einer Biometra-Apparatur bei einer angelegten Stromstärke von 1,5 mA/cm² x 1,5 h. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit 2 % Ponceaurot (w/v) in 3 % Trichloressigsäure (v/v) angefärbt und mit A. bidest. gespült (Rehm, 1997).

Die Membran wurde dann für 1,5 h in Blockierungslösung (1 x PBS + 5% Milchpulver, w/v) bei RT auf einem Schüttler inkubiert.

1 x PBS (pro Liter): 8 g NaCl
(Sambrook et al., 1989) 0,2 g KCl
 1,44 g Na₂HPO₄ oder 1,77 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,24 g KH₂PO₄
 pH: 7,4

Nach weiterer Inkubation für 1,5 h in Blockierungslösung mit Antikatalase-Serum (1:500 bis 1:1000) wurde die Membran zwei Mal für 10 min in Blockierungslösung gewaschen und mit Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper GOAT-Anti-Rabbit-IgG-POD (Paesel und Lorei, Frankfurt, BRD) 1:8.000 in Blockierungslösung für 1 h geschüttelt.

Zur Detektion wurde die Membran erst zwei Mal für 10 min in 1 x PBS gewaschen und dann in 50 ml 1 x PBS mit 1 ml 1 % Dianisidin (w/v in Methanol) und 12 µl 30% H₂O₂ inkubiert. Dort, wo der spezifische Katalase-Antikörper gebunden hat, wurde mittels des sekundären Antikörpers die Peroxidase gekoppelt. An diesen Stellen kommt es zu einer Umsetzung des Dianisidins und es entsteht ein bräunliches Signal.

Der Nachweis wurde alternativ durch Einsatz des ECL Western blotting detection reagents (Amersham Bioscience, Freiburg, BRD) über Chemilumineszenz durchgeführt, da dieses System sensitiver ist. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran wie oben beschrieben behandelt, allen Puffern wurde noch zusätzlich 0,1% Tween 20 (v/v) zugefügt. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die mit 1 x PBS gewaschene Membran mit einer Mixtur von Detection reagent 1 und 2 (1:1, v/v) beträufelt. Sie wurde zwischen zwei Schichten Klarsichtfolie gelegt und für 1min inkubiert. Danach wurde ein Autoradiogramm angefertigt.

2.7.2. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung wurden entweder die modifizierte Lowry-Proteinbestimmungsmethode (Lowry et al., 1951), der BCA-Test (Smith et al, 1985) oder das Roti[®]-Nanoquant Proteinbestimmungskit der Firma Roth GmbH & Co.(Karlsruhe, BRD) eingesetzt.

Musste das Volumen der zu bestimmenden Probe eingeengt werden oder in ein für die Bestimmung notwendiges anderes Reagenz überführt werden, wurde das Protein vor der Bestimmung entweder mit Trichloressigsäure (TCA) (beschrieben in Kap. 2.7.2.1) oder

Aceton (beschrieben in Kap. 2.7.1.) gefällt und in einem kleineren Volumen des gewünschten Reagenz zurückgelöst.

2.7.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) beruht darauf, dass die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine Verbindung eingehen. Diese gebundenen Cu^{2+} -Ionen reduzieren das Folinreagenz, was einen ein Farbumschlag des Folinreagenz (durch Reduktion) von gelb nach blau zur Folge hat. Die Blaufärbung gilt als Maß für die Proteinkonzentration und ist photometrisch bei 540nm messbar. Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

- | | |
|--|-------------------------------------|
| a) 2 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v) | b) 2 % Kalium-Natrium-Tartrat (w/v) |
| c) 10 % Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH (w/v) | d) Folin Reagenz |
| e) 20 % TCA (w/v) | f) 5 % TCA (w/v) |
| g) 0,5 N NaOH | h) 0,1 N NaOH |

Alle angesetzten Reagenzien mussten nach folgendem Schema jeweils frisch zusammenpipettiert werden und dunkel stehen:

- 1.) Cu-Reagenz: 1 ml 2 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
1 ml 2 % Kalium-Natrium-Tartrat
20 ml 10 % Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH
- 2.) Folin-Reagenz: 1 ml Folin-Reagenz
mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 10 ml

Zur Herstellung einer Eichgeraden wurden Ansätze mit 0-240 μg BSA/ml hergestellt. 1 ml der Proteinproben wurde jeweils über Nacht bei RT mit 10 ml 20% TCA gefällt und dann bei 20.000 x g für 15 min sedimentiert. Das Sediment wurde in 5% TCA resuspendiert, wiederum zentrifugiert, in 0,5 ml 0,1N NaOH resuspendiert und mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt Diese Probe wurde dann mit 1 ml Cu-Reagenz versetzt, für 5 min bei RT inkubiert, mit 3 ml Folin Reagenz gemischt und für 45-60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 540 nm photometrisch bestimmt. Anhand der BSA-Eichgeraden konnte nun der Proteingehalt bestimmt werden.

2.7.2.2. Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Auch der BCA-Test beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} zu komplexieren. Durch Bindung der Bicinchoninsäure (BCA) mit den Cu^{2+} -Ionen des Komplexes entsteht ein violetter Farbstoff, der bei 562 nm photometrisch bestimmbar ist. Der BCA-Test beruht auf dem modifizierten Protokoll von Smith et al. (1985). Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A:	1 g BCA	Lösung B:	0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
(100ml)	2 g Natriumcarbonat		in 10 ml A. bidest.
	0,16 g Natrium-Tartrat		
	0,4 g NaOH		
	0,95 g Natriumbicarbonat		
	pH: 11,25 mit 10 N NaOH		

Aus 50 Volumen Lösung A mit 1 Volumen Lösung B wurde die Arbeitslösung hergestellt. Zur Herstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Konzentrationsreihe von 0-50 μg in 20 μl hergestellt. Die Ansätze wurden mit je 1 ml Arbeitslösung versetzt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Nach Herunterkühlen der Proben auf RT wurde die Extinktion bei 562 nm bestimmt.

2.7.2.3. Proteinbestimmung mit Roti[®]-Nanoquant

Der Roti[®]-Nanoquant Proteinbestimmungs-Kit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) beruht auf einer Modifikation der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Durch die Bindung des Proteins an Coomassie Brilliant Blue G-250 verschiebt sich das Absorptionsspektrum in den längerwelligen Bereich. Diese Verschiebung gilt als Maß für die Proteinkonzentration.

Es wurde für die Arbeitslösung 20 ml Roti[®]-Nanoquant 5fachKonzentrat mit A. bidest. auf 100 ml aufgefüllt und für die BSA-Eichreihe Proben mit einem Proteingehalt von 0-20 μg BSA/200 μl hergestellt. Es wurden 200 μl Proteinlösung mit 800 μl Arbeitslösung vermischt und die Extinktionen bei 590 nm und 450 nm aller Ansätze gegen H_2O bestimmt. Zur Herstellung der Eichgeraden wurde der Quotient E_{590}/E_{450} gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. An dieser Eichgeraden konnte nun der Proteingehalt der Probe abgelesen werden.

2.7.3. Nachweis von spezifischer NADPH-Bindung

Zum Nachweis spezifischer NADPH-Bindung an Katalasen wurden Rinderleberkatalase, partiell gereinigte rekombinante Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* und Blattkatalase von *Secale cereale* mit und ohne NADPH inkubiert. Nach Fraktionierung der Ansätze wurde sowohl die Katalaseaktivität der einzelnen Fraktionen, als auch deren Fluoreszenz als Maß für die Anwesenheit von NADPH bestimmt. Um nachzuweisen, dass bei Rinderleberkatalase die NADPH-Bindung katalasespezifisch ist, und NADPH nicht generell an Proteine bindet, wurde die Rinderleberkatalase in einem Proteingemisch inkubiert. Die Zusammensetzung der Proteinmischung basierte auf dem Protokoll von Kurzok und Feierabend (1984).

Für die NADPH-Bindungsstudie an Rinderleberkatalase wurden folgende Substanzen in einem Endvolumen von 1 ml in 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 + 250 µg PefaBlock überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert:

0,25-1 mg Rinderleberkatalase

5 mg BSA

3 mg Ovalbumin(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD)

5 mg Cytochrom C (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD)

1 mM NADPH

Als Kontrolle dienten Ansätze ohne NADPH. Nach chromatographischer Auftrennung des Ansatzes über eine Sephacryl S 300 HR Säule (1,5 cm x 100 cm) mit 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 als Laufpuffer und einer Fliessgeschwindigkeit von 50 ml/h wurden 2,6 ml Fraktionen aufgefangen.

Die rekombinante Katalase von *Secale cereale* und isolierte Blattkatalase von Roggen wurden nach Chloroform-Ethanol-Fällung (Kap. 2.6.3.1.) mehrfach in einer Zentrifugationssäule (Vivaspin 20 ml Concentrator Ø30 kDa, Vivascience, Hannover, BRD) mit 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH: 7,5 gewaschen und aufkonzentriert. Die Katalase von *Homogyne alpina* wurde über Sephadex G-25 (Kap. 2.6.3.3.1.) und Sephacryl S 300 HR (Kap. 2.6.3.3.2.) gereinigt und ebenfalls in einer Zentrifugationssäule gewaschen und aufkonzentriert. Nach Proteinbestimmung (Kap. 2.7.2.) wurde jeweils ein Teil der Proteinextrakte über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.7.1.) und mit Coomassie gefärbt (Kap. 2.7.1.2.), um den Katalaseanteil in dem Proteingemisch abzuschätzen. Es wurden 0,25-0,5 mg Katalase mit

1 mM NADPH oder ohne NADPH (Kontrolle) in 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 + 250 µg PefaBlock in einem Endvolumen von 1 ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden über Sephacryl S 300 HR (30 cm x 1 cm) bei einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/h in 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 aufgetrennt und in 0,5 ml Fraktionen fraktioniert.

In allen Fraktionen wurden im Anschluss die Katalaseaktivität (Kap. 2.8.1.) und die Fluoreszenz (Perkin-Elmer Luminescence Spectrometer LS-3B) bei 455 nm nach Anregung mit 340 nm bestimmt.

2.8. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.8.1. Messung der Katalaseaktivität

Der Katalaseaktivitätstest wurde nach der modifizierten Methode von de Boer und Feierabend (1974) durchgeführt. Die Katalaseaktivität wurde anhand der Extinktionsabnahme des Substrates H₂O₂ bei 240nm pro Zeit bestimmt (ϵ von H₂O₂ bei 240nm = 36 M⁻¹ cm⁻¹).

Es wurden 20, 50, 100 oder 200 µl Katalase-Lösung mit Messpuffer auf ein Endvolumen von 3 ml eingestellt.

Messpuffer: 160 µl 30 % H₂O₂ pro 100 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5

Der Ansatz wurde gut durchmischt und es wurde unverzüglich im Photometer (Gilford 240) die Abnahme von E₂₄₀ gemessen. Über die aus dem Schreiberdruck ermittelte Steigung ($y = mx$) konnte die Extinktionsabnahme bestimmt werden und diese für die Katalaseaktivitätsberechnung eingesetzt werden:

$$\text{Aktivität (mkat/ml Extrakt)} = \frac{\Delta E \times V_1}{\epsilon \times d \times v \times S \times t}$$

ΔE = Ermittelte Extinktionsänderung

v = eingesetztes Extraktvolumen (ml)

t = Messzeit (s)

V_1 = Testvolumen (3ml)

ϵ = Extinktionskoeffizient (= 36 M⁻¹ cm⁻¹)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

S = Strecke in cm des Schreibers für eine Extinktionsänderung von 1

2.8.1.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität von Katalasen

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der Katalase in $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein wurde gereinigte rekombinante Katalase von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* eingesetzt. Es wurde jeweils ein Probenpaar parallel gereinigt und den Tests unterzogen. Von den jeweiligen Katalaselösungen wurde eine definierte Menge für einen Aktivitätstest (Kap. 2.8.1.) und eine Proteinbestimmung eingesetzt. Herkömmliche Proteinbestimmungsmethoden konnten nicht verwendet werden, da es trotz Einsatz aller in Kap. 2.6.3. angewandten Reinigungsverfahren nicht gelang, die rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* vollständig aufzureinigen. Daher wurde der Proteingehalt mittels eines neben der jeweiligen Probe auf einem SDS-Gel (Kap. 2.7.1.) aufgetragenen BSA-Konzentrationsstandards (0-17,5 μg BSA/Spur) und anschließender Coomassie-Gelfärbung (Kap. 2.7.2.) bestimmt. Aus der gemessenen Aktivität und der ermittelten Proteinmenge konnte die spezifische Aktivität in $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein berechnet werden.

2.8.1.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

Zur Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Konstanten der rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina*, *Soldanella alpina*, *Secale cereale* und von Rinderleberkatalase wurden von 20 μl der jeweiligen Katalaselösung Aktivitätsbestimmungen (Kap. 2.8.1.) mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Da das Substrat im Messpuffer über den Versuchszeitraum nicht zu 100 % stabil ist und für jeden Ansatz eine eigene Verdünnungsreihe hergestellt wurde, wurde vor jeder Messreihe die Substratkonzentration bei 240nm photometrisch bestimmt und errechnet (ϵ_{240} für H_2O_2 : $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Es wurden bei den verschiedenen Katalasen folgende H_2O_2 -Konzentrationen (mM) eingesetzt:

Rinderleber:	<i>Secale cereale</i> :	<i>Soldanella alpina</i> :	<i>Homogyne alpina</i> :
34,1	33,9	32,7	32,52
25,12	25,17	24,39	24,03
16,47	16,8	16,6	16,28
11,98	11,9	11,9	11,25
8,27	7,98	8,33	7,55
7,83	7,83	7,61	7,22
3,92	3,75	4,11	3,41

Mittels der Lineweaver-Burk-Gleichung wurde die Michaelis-Menten-Konstante in mM ermittelt.

2.8.1.3. Bestimmung des pH-Optimums der Katalase von *Secale cereale*

Um das pH-Optimum der Katalase zu ermitteln, wurden jeweils 0,8-1 μ kat rekombinante Roggenkatalase in Puffer mit verschiedenen pH-Werten überführt, um dann einer Aktivitätsbestimmung unterzogen zu werden (Kap. 2.8.1.).

Für die pH-Werte 4,5 und 5 wurde 0,2 M KH_2PO_4 mit 0,2 N NaOH, für die pH-Werte 6-8 0,1 M Kaliumphosphatpuffer und für die pH-Werte 9 und 10 0,2 M Glycin mit 0,2 M NaOH eingesetzt. Da in den sauren und basischen Bereichen kein signifikanter Aktivitätsverlust messbar war, wurde dieses Einzelexperiment nicht wiederholt.

2.8.1.4. Einfluss von Inhibitoren auf die Katalaseaktivität

Die Wirkung der Inhibitoren Natrium-Azid, 3-Amino-1,2,4-triazol und Kaliumcyanid auf die Aktivität der rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* und Rinderleberkatalase sollte ermittelt und verglichen werden. Dazu wurden die jeweiligen Inhibitoren in folgenden Endkonzentrationen (mM) eingesetzt:

a) NaN_3 :	0,1	b) KCN:	0,1	c) 3-Amino-1,2,4-triazol:	1,7
	1,0		1,7		8,5
	1,7		6,8		

Nach einer Vorinkubationszeit von 0,8-1 μ kat Katalaseprotein in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH. 7,5 bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 min wurde eine Aktivitätsbestimmung (Kap. 2.8.1.) durchgeführt und dann der Inhibitor in seiner jeweiligen Endkonzentration zugegeben. Die Kontrollansätze wurden stattdessen mit dem gleichen Volumen A. bidest. versetzt. Nach Zugabe von NaN_3 wurden die Ansätze für 30 min, die Ansätze mit KCN oder 3-Amino-1,2,4-triazol wurden für 5 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden wiederum Katalaseaktivitätsbestimmungen (Kap. 2.8.1.) durchgeführt.

2.8.1.5. Einfluss von Ascorbat auf die Katalaseaktivität

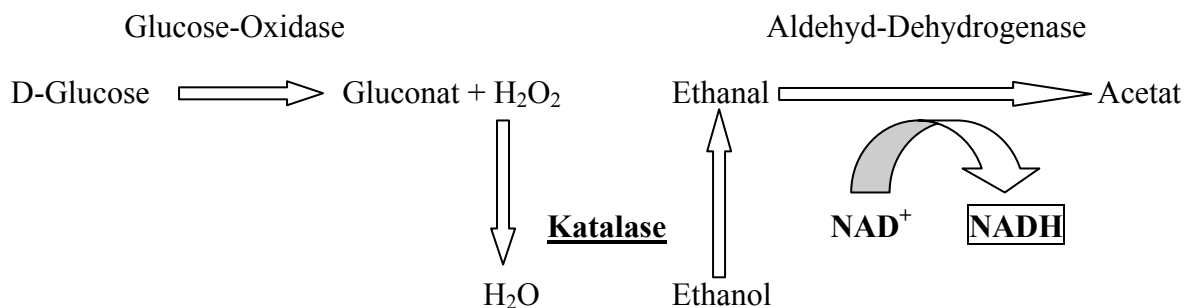
Die Inkubationen mit Ascorbat wurden nach dem modifizierten Protokoll von Davison et al. (1986) durchgeführt.

Jeweils 0,8-1 μ kat Katalase in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH: 7,5 wurden mit 2 mM Ascorbat versetzt und für 6h im Wasserbad bei 25°C im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Den Kontrollansätzen wurde kein Ascorbat zugegeben. In regelmäßigen Abständen wurde Katalaseaktivität (Kap. 2.8.1.) bestimmt.

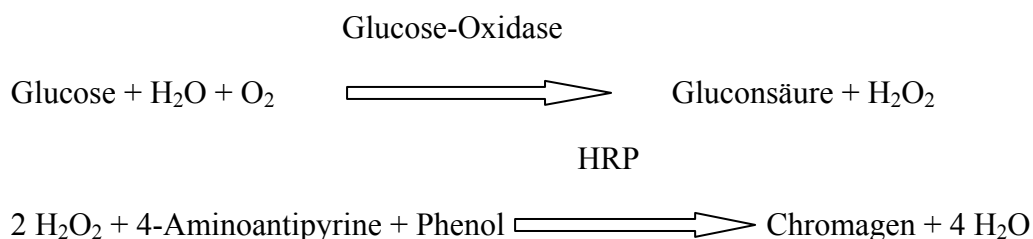
2.8.2. Bestimmung der peroxidatischen Aktivität von Katalasen

Die Bestimmung der peroxidatischen Aktivität wurde nach der modifizierten Methode von Oshino et al. (1973) durchgeführt. Sie basiert auf der Oxidation von Ethanol durch Katalase in einem schwach H_2O_2 -generierenden System. Das entstehende Ethanal und somit die Rate der peroxidatischen Katalaseaktivität bei einer spezifischen H_2O_2 -Konzentration wurde durch die Reduktion von NAD^+ zu $NADH$ indirekt ermittelt.

Folgende Reaktionen liegen dem Ansatz zu Grunde:



Da die H_2O_2 -Syntheserate (μ mol/l s) nach Zugabe verschiedener Units von Glucose-Oxidase (E.C. 1.1.3.4) nicht bekannt war, musste diese erst ermittelt werden. Dies geschah nach dem modifizierten Protokoll von Green und Hill (1984). Der Ansatz basierte auf folgendem Prinzip:



Das entstehende Chromagen wurde bei 505 nm photometrisch bestimmt und mittels des spezifischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{505} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet. Daraus konnte die Rate des entstehenden H_2O_2 ($\mu\text{mol}/\text{l min}$) nach Zugabe einer definierten Menge an Glucose-Oxidase berechnet werden. Zur Durchführung wurden folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz-Lösung:	0,234 g Phenol
(100ml)	0,1 g 4-Aminoantipyrin
	1 ml 0,1M Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,4
Stammlösung Horseradish-Peroxidase (HRP):	8 mg/10 ml in
	0,1M Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,4
Stammlösung H_2O_2 :	10 μl 30 % H_2O_2 /l

Es wurden 4 ml Reagenzlösung mit 70 μl HRP-Stammlösung, 101 μl H_2O_2 Stammlösung, 10 mM Glucose und 0,05 - 4,5 U Glucose-Oxidase (0,25-25 μl , 1:10 verdünnt in 3 M NaAc, pH: 4,8) mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde im Photometer bei 505 nm für 1 min bei RT gemessen. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Glucose-Oxidase. Es wurde eine Eichkurve erstellt (steigende Glucose-Oxidase-Menge gegen $[\text{H}_2\text{O}_2]$ –Entwicklung in $\mu\text{mol}/\text{l} \times \text{s}$). Der daraus resultierende Zusammenhang zwischen der zugegebenen Glucose-Oxidase-Menge und der dadurch vermittelten H_2O_2 -Bildung wurde in den Peroxidaseversuch übertragen. Umrechnungsfaktoren bezüglich der unterschiedlichen Volumina der Reaktionsansätze wurden berücksichtigt.

Es wurde die peroxidatische Aktivität bei der Katalase von Rinderleber, gereinigter rekombinanter Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* und der aus Roggen isolierten Blattkatalase bestimmt. Dazu wurden jeweils 0,1 und 1 μkat der Katalasen von Roggenblättern, Rinderleber und rekombinantem Protein von *Secale cereale*, sowie 0,1 μkat rekombinante *Homogyne*-Katalase eingesetzt.

Reaktionsansatz:	0,1 bzw. 1 μkat Katalase
	0,1 mM NAD^+
	0,5 U Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.5)
	50 mM Ethanol
	10 mM Glucose
	in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH: 7,4

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,6 U Glucose-Oxidase/ml Reaktionsansatz gestartet. Das Ansatzvolumen betrug 1 ml. Die Umsetzung von NAD^+ zu NADPH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt ($\epsilon_{340} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Messzeit betrug 60 s. Da die Reduktion des NAD^+ proportional zur Ethanal-Entstehung verläuft, wurde diese als Maß für die peroxidatische Aktivität angesehen werden. Die Menge an zugegebener Glucose-Oxidase entspricht einer H_2O_2 -Entstehungsrate von $89 \mu\text{mol/l min}$. Da der Bereich der H_2O_2 -Konzentration, in dem Katalase ihr Optimum an peroxidatischer Aktivität aufweist, nicht exakt bekannt war, wurden vorher für die Katalasen von Roggen und Rinderleberkatalase Optimumskurven (Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von unterschiedlichen H_2O_2 -Bildungsraten durch Zugabe verschiedener Glucose-Oxidase-Units) erstellt.

2.8.3. Glycolat-Oxidase-Test

Das Prinzip der Glycolat-Oxidase-Messung beruht auf der Oxidation von Glycolsäure zu Glyoxylsäure, welche bei 324 nm nach Zugabe von Phenylhydrazinhydrochlorid als Phenylhydrazon bestimmt werden kann (Feierabend und Beevers, 1972).

Es wurden folgende Reagenzien in abgedunkelten Reagenzgläsern zusammenpipettiert:

- 0,50 ml H_2O
- 2,20 ml 0,05 M Triäthanolaminpuffer, pH: 7,8 mit NaOH
- 0,05 ml 0,5 % Triton-X-100 (v/v)
- 0,05 ml 12 mM Flavinmononucleotid (FMN)
- 0,10 ml 0,1 M Phenylhydrazinhydrochlorid pH: 6,8 mit KOH
- 0,05 ml Extrakt

Zum Start der Reaktion wurde 0,05 ml 0,3 M Glykolsäure zugegeben. Pro Messansatz wurde eine Kontrolle mit H_2O statt Glykolsäure eingesetzt. Die Extinktionsänderung bei 324 nm wurde über 3 min photometrisch gemessen, anhand des Schreiberdruckes über die Steigung ΔE bestimmt und die Enzymaktivität mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 1,7 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mM}$ berechnet. Mit den Kontrollproben wurde ebenso verfahren und nach Subtraktion der Kontrollwerte von den Messwerten erhielt man die Glycolat-Oxidaseaktivität in mmol/ml.

2.9. Inkubationen

2.9.1. Starklichtinaktivierung

Mit partiell und vollständig gereinigten Katalasepräparationen aus Roggenblättern und Sonnenblumenkotyledonen, rekombinanter Katalase von *Secale cereale* CAT1, *Soldanella alpina* CAT1 und CAT1_{His225Thr}, *Homogyne alpina* CAT1 und *Helianthus annuus* CATA3, sowie mit käuflich erworbener lyophilisierter Katalase aus der Leber von *Bos taurus* (EC 1.11.1.6) wurden Inkubationen im Starklicht durchgeführt. Dazu wurde jeweils 0,8-1 μ kat/ml Katalase in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5 eingesetzt. Die Ansätze betragen 0,5-1 ml. Die Starklichtinkubation erfolgte im Wasserbad bei einer konstanten Temperatur von 25°C und einer Lichtstärke von 800 μ mol m⁻² x s⁻¹ PAR. Lichtdicht verpackte Dunkelkontrollen wurden parallel im Wasserbad inkubiert. Es wurden Halogenlampen (12V, 75W) benutzt und vor dem Wasserbad wurde ein Hitzeschutzglas (KG3) angebracht. Die Lichtintensität wurde mit einem Licor LI-189 (Walz, Mess- und Regeltechnik, Effeltrich, BRD) bestimmt. Bis zu einer Inkubation von 6 h wurde in regelmäßigen Abständen die Katalaseaktivität (Kap. 2.8.1.) bestimmt.

Die Starklichtinkubation wurde ebenfalls unter Zugabe von 1 mM NADPH oder 1 % (v/v, \approx 173,6 mM) Ethanol durchgeführt.

2.9.2. Inkubation mit Superoxid

Die Inkubation der Katalasen mit einem Superoxid-generierenden System wurden nach dem stark modifizierten Protokoll von Kono und Fridovich (1982) durchgeführt.

Das Superoxid-generierende System basiert auf der Umsetzung von Xanthin zu Urat mittels der Xanthin-Oxidase (E.C. 1.1.3.22), dabei entsteht Superoxid. Wegen der starken UV-Absorption des entstehenden Produktes Urat wurde als alternatives Substrat Acetaldehyd eingesetzt (Kono und Fridovich, 1982).

Es wurden jeweils 0,8-1 μ kat Katalase mit 30 mM Acetaldehyd und 1 U Xanthin-Oxidase in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH.7,5 und 0,1 mM EDTA bei 25°C im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Xanthin-Oxidase.

Die Superoxid-Inkubation wurde auch unter Zugabe von 1% (v/v, $\approx 173,6$ mM) Ethanol oder 0,75-1 mM NADPH durchgeführt. Die Ansätze mit Rinderleberkatalase und rekombinanter *Homogyne alpina* Katalase enthielten 0,75 mM NADPH, den Ansätzen mit Blattkatalase und rekombinantem Enzym von *Secale cereale* wurde 1 mM NADPH zugegeben. Die Katalaseaktivität (Kap. 2.8.1.) wurde vor Beginn der Inkubation und bis zu einem Zeitpunkt von 3 h in regelmäßigen Abständen bestimmt.

2.10. Elektronenmikroskopie

Die Aufnahmen am Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop und am Transmissionselektronenmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit Manfred Ruppel (Botanisches Institut, Universität Frankfurt) durchgeführt.

2.10.1. Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von gereinigter *Helianthus annuus* Core-Katalase wurden an einem S-4500 (Hitachi, Ratingen, BRD) angefertigt.

Dazu wurden die Katalase-Cores wie in Kap. 2.6.2. beschrieben isoliert und in einer Lyophilisierungsanlage (WKf L2 70°, Gesellschaft für elektrophysikalischen Apparatebau, Brandau i. Odw., BRD) gefriergetrocknet. Nach Überführung der gefriergetrockneten Probe auf einen Objektträger wurde diese für 30-40 s mit Gold beschichtet. Die Probe wurde in das Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop eingelegt und mit einer Beschleunigungsspannung von 25kV mikroskopiert.

2.10.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten von *Homogyne alpina* Blättern wurden an einem EM 902 (Zeiss, Oberkochen, BRD) Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt.

Das Blattmaterial wurde in den österreichischen Alpen im Gschnitztal in einer Höhe von ca. 1500 m gesammelt und zur Vorfixierung in 2 % Glutaraldehyd (v/v in 50mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 7,5) eingelegt. Die Fixierung erfolgte nach der stark modifizierten Methode von Karnovsky et al. (1965). Die vorfixierten Blätter wurden in 1cm² große Stücke geschnitten und vor Ort zur Entwässerung für jeweils 20 min in folgenden Acetonkonzentrationen (v/v in A. bidest.) inkubiert: 70%, 80%, 90%, 96%, 100%. Nach

Überführung der Proben ins Labor wurden diese wieder mit absteigenden Acetonkonzentrationen (100-30% in A. bidest.) für jeweils 20 min bewässert, um sie dann zur Fixierung und Kontrastierung für 1 h in 1%OsO₄-Lösung (w/v in A. bidest.) zu inkubieren. Danach wurden die Blattstücke wieder wie oben beschrieben mit aufsteigenden Acetonkonzentrationen entwässert. Die Einbettung in Kunststoff wurde nach der modifizierten Methode von Spurr (1969) durchgeführt. Für die Herstellung der Kunststoffmischung wurden 48 ml Agar100Resin[®], 26 ml DDSA, 26 ml MNA und 2 ml BDMA (Agar Scientific LTD, Essex, England) gut durchmischt. Die 1 cm² großen Blattstücke wurden geviertelt und für jeweils 1,5 Stunden in eine Aceton/Kunststoffmischung im Verhältnis 3:1; 1:1 und 1:3 überführt. Danach wurden sie für 2 h bei 40°C in 100 % Kunststoffmischung inkubiert. Die Blattstücke wurden in Einbettungskapseln aus Gelatine überführt, mit 100% Kunststoffmischung überschichtet, welche über Nacht bei 70°C polymerisierte. Von den im nun ausgehärteten Kunststoff befindlichen Proben wurden mit einem Ultramikrotom (Reichert Jung, Österreich) Ultradünnschnitte (ca. 80 nm) angefertigt. Diese wurden auf Kupfernetze übertragen und konnten dann für die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen eingesetzt werden.

2.11. Computergestützte Strukturanalysen

Analyse der sequenzierten DNA (Kap. 2.2.9.) und der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Homogyne alpina cat1* mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Arabidopsis thaliana cat1*, *Cucurbita pepo cat1*, *Ipomoea batata cat1*, *Helianthus annuus cata1* und *cata3*, *Phaseolus aureus cat1*, *Ricinus communis cat1*, *Soldanella alpina cat1*, *Secale cereale cat1*, *Zea mays cat3* und *Bos tauris cat* wurde mit Hilfe des Computerprogramms Omega 1.1 (Oxford Molecular Group, Oxford, USA, <http://www.oxmol.co.uk>) durchgeführt. Die zum Vergleich herangezogenen Katalasesequenzen stammten aus der EBI- und der Swiss.Prot.-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk> und <http://us.expasy.org>). Das dreidimensionale Katalasemodell wurde mit Hilfe des Swiss-Pdb-Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>, Guex und Peitsch, 1997)

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung der Katalase-Klone und Sequenzen

Vorangegangene Untersuchungen von Streb et al. (1997) zeigten, dass die Katalase aus Blättern der Alpenpflanze *Homogyne alpina* im Starklicht wesentlich stabiler ist, als die Blattkatalasen der Alpenpflanze *Soldanella alpina*, der Flachlandpflanze *Secale cereale* und Rinderleberkatalase (Abb. 3). Nach Isolierung und Sequenzierung einer Blattkatalase-cDNA von *Homogyne alpina* (Engel et al., 2004, Manuskript in Vorbereitung) zeigte ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der *Homogyne*-Katalase mit anderen pflanzlichen Katalasen und Rinderleberkatalase (Abb. 7), dass die Aminosäuresequenz der Katalase von *Homogyne alpina* den Katalasesequenzen anderer dikotyler Pflanzen sehr ähnlich ist. Sie unterscheidet sich von den anderen Katalasen in hochkonservierten Bereichen an sechs Positionen: Val124Thr, Leu135Ile, Leu189Trp, Gly206Ser, His225Thr und Lys291Met. Für die Lichtstabilität der *Homogyne*-Katalase können nur Sequenzveränderungen in Frage kommen, welche bei den ebenfalls lichtempfindlichen Katalasen monokotyler Pflanzen und Rinderleberkatalase in stark konservierten Regionen vorkommen, daher wurden diese Sequenzunterschiede besonders hervorgehoben. Da bei der Lichtinaktivierung von Katalasen die Oxidation eines Histidinrests eine große Rolle spielen soll (Nakatani, 1961), ist die Substitution an Position 225 besonders zu beachten. Dort ist bei der lichtstabilen *Homogyne*-Katalase ein Histidinrest durch einen Threoninrest ersetzt. An den anderen fünf Positionen sind die Aminosäuren durch andere, mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften, ersetzt. Ob die Aminosäuresubstitutionen jedoch tatsächlich mit der Lichtstabilität der Blattkatalase von *Homogyne alpina* in direktem Zusammenhang stehen, konnte nur überprüft werden, indem die cDNA funktionell in einem fremden System heterolog exprimiert und die rekombinante Katalase Starklichtinkubationen unterzogen wurde. Daher war es zunächst ein Ziel dieser Arbeit, die Katalase-cDNA von *Homogyne alpina* in einem Expressionssystem funktionell zu exprimieren. Als Vergleich sollten die für lichtensible Katalase codierenden cDNA's der Alpenpflanze *Soldanella alpina* und der Flachlandpflanze *Secale cereale* ebenfalls funktionell exprimiert werden.



Abbildung 7: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Homogyne alpina* CAT1 mit anderen pflanzlichen Katalasen und Rinderleberkatalase als Vertreter tierischer Katalasen. Bereiche in hellgrün markieren Homologien innerhalb der dargestellten pflanzlichen Katalasen, dunkelgrüne Bereiche repräsentieren Homologien der pflanzlichen und tierischen Katalasen. Gelb markiert sind Aminosäuresubstitutionen in hochkonservierten Regionen, bei denen zwischen ähnlich (▼) und auffällig (◻) differenziert wird. Alle zum Vergleich herangezogenen Sequenzen stammen aus der EBI- und Swiss.Prot.-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk> und <http://us.expasy.com>), durchgeführt wurde der Vergleich mit Hilfe des Computerprogramms Omega 1.1.

Zu Beginn dieser Arbeit waren folgende Katalase-cDNAs von Dr. M. Schmidt (Universität Frankfurt) isoliert und wurden zur Verfügung gestellt: Die cDNA jeweils einer Blattkatalase von *Secale cereale* (*cat1*) und *Soldanella alpina* (*cat1*) stammten aus den entsprechenden cDNA-Banken. Die cDNA einer Blattkatalase von *Homogyne alpina* (*cat1*) wurde über PCR mit Hilfe eines katalasespezifischen und eines Oligo-d(T)-Anchor Primers und 3'-5'-RACE Techniken amplifiziert; deshalb besitzt sie am 3'-Ende einen Adapter mit den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *MluI*, *ClaI* und *SalI*. Die Basensequenz der Katalasen sind in der EBI-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk>) unter den Acc.Nr. Z54143 für *Secale cereale cat1* (Schmidt und Feierabend, 2000), Z99633 für *Soldanella alpina cat1* und AJ616025 für *Homogyne alpina cat1* erhältlich. Alle drei Nukleotidsequenzen sind im Anhang beigefügt. Es wurden ebenfalls die oben genannten Katalase-cDNAs mit einem 5'-lokalisierten 6 x His-tag von Dr. M. Schmidt (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Vor Beginn dieser Arbeit lagen folgende Konstrukte vor:

a) *Secale cereale*:

cat1, Gesamtlänge: 1685 bp

EcoRI - Teil der 5'-UTR (16bp) - ATG - codierender Bereich - TGA - Teil der 3'-UTR (193bp) - *EcoRI*
cat1 + 5'-lokalisierter 6 x His-tag

EcoRI - ATG - GAT- 6 x His-tag- codierender Bereich - TGA - Teil der 3'-UTR (193bp) - *EcoRI*

b) *Soldanella alpina*

cat1, Gesamtlänge: 1772

EcoRI - Teil der 5'-UTR (43bp) - ATG - codierender Bereich - TGA - Teil der 3'-UTR (253bp) - *EcoRI*
cat1 + 5'-lokalisierter 6 x His-tag

EcoRI - ATG - GAT- 6 x His-tag- codierender Bereich - TGA - Teil der 3'-UTR (253bp) - *EcoRI*

c) *Homogyne alpina*

cat1, Gesamtlänge: 1725 bp

- ATG - codierender Bereich - TGA - Teil der 3'-UTR (249bp) Adapter: *MluI*-*ClaI*-*SalI*

cat1 + 5'-lokalisierter 6 x His-tag

ATG - GAT- 6 x His-tag codierender Bereich - TGA - Teil der 3'-UTR Adapter: *MluI*-*ClaI*-*SalI*

Die cDNA's waren in folgenden Plasmide kloniert:

pYEX-BX: *cat1 Secale cereale*, *cat1-5'His-tag Secale cereale*, *cat1 Soldanella alpina*.

pBluescript SK(-): *cat1-5'His-tag Soldanella alpina*.

pGEM-T: *cat1 Homogyne alpina*.

pGem-TEasy: *cat1-5'His-tag Homogyne alpina*.

3. 2. Klonierung und Modifizierung der DNA und Versuch der heterologen Expression funktioneller pflanzlicher Katalasen in Hefe

Für die heterologe Proteinexpression funktioneller Katalasen von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* in Hefe mussten die oben beschriebenen Konstrukte je nach Versuchsansatz modifiziert und in die entsprechenden Vektoren kloniert werden. Die „getaggt“ und „ungetaggt“ Katalase-cDNAs von *Secale cereale* und die „ungetaggt“ Katalase-cDNA von *Soldanella alpina* befanden sich schon im für die heterologe Proteinexpression benötigten Plasmid pYEX-BX. Somit konnten die Katalase-cDNAs von *Secale cereale* direkt für die heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden, die 5'-„getaggt“ cDNA von *Soldanella alpina* wurde ebenfalls in den Expressionsvektor pYEX-BX kloniert. Nach Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* DY150 mit den DNA-Konstrukten *cat1*-pYEX-BX und *cat1-5'His-tag*-pYEX-BX von *Secale cereale* und *cat1*-pYEX-BX und *cat1-5'His-tag*-pYEX-BX von *Soldanella alpina* bildeten sich Hefekolonien auf YNB-Selektionsplatten. Die Uracil- und Leucin-Defizienz konnte in transformierten Zellen über die Aufnahme des Plasmids ausgeglichen werden, Kontrollzellen ohne Plasmid wuchsen nicht. Die Genexpression stand unter der Kontrolle des CUP1-Promotors und wurde durch externe Gabe von CuSO₄ induziert. Nach Anzucht und Induktion der Katalaseexpression wurden die Zellen aufgebrochen und ein Katalaseaktivitätstest durchgeführt. Die Katalaseaktivität war zwar signifikant erhöht, dennoch konnte kein rekombinantes Protein über Western Blot nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass das im Cytosol translatierte rekombinante Protein dort akkumuliert und abgebaut wird, wurden alle 5'-„getaggt“ Katalase-cDNA's und die „ungetaggt“ Katalase-cDNA von *Homogyne alpina* so modifiziert, dass ein Import in das Hefeperoxisom gewährleistet sein sollte. Deshalb wurden sie über PCR mit der Sequenz TCC-AAA-TTT versehen (Abb. 8), die für die potentielle PTS1 in *Saccharomyces cerevisiae* (SKF) codiert (Murphy et al., 1995, Swiss-Prot Datenbank) Die „ungetaggt“ *Homogyne alpina* Katalase hatte durch den verwendeten

gewobbelten Primer am 5'-Ende (Kap. 2.4.1.2.) durch die PCR ihren dort lokalisierten *Bam*HI-Schnitt eingebüsst.



Abbildung 8:

Sequenzausschnitte der Katalase cDNAs von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* mit 5'-lokalisiertem 6 x His-tag und 3'-lokalisierter PTS1 für Hefen (grün), sowie der Katalase-cDNA von *Homogyne alpina* ohne 5'-terminalen 6 x His-tag (c, unterer Kasten).

Das Konstrukt *Soldanella alpina cat1*-5'His-tag-3'PTS wurde ebenfalls in pYEX-BX kloniert und in *Saccharomyces cerevisiae* DY150 transformiert. Auch hier gelang es nicht, rekombinantes Protein nachzuweisen. Da Kupfer als Stimulus für die Expression endogener Katalase von *S. cerevisiae* bekannt ist (Lapinskas et al., 1993), wurde hinter den durch CuSO₄ induzierbaren CUP1-Promotor von pYEX-BX ein konstitutiv exprimierender GAP-Promotor kloniert (pYEX-GAP, Abb. 9.)

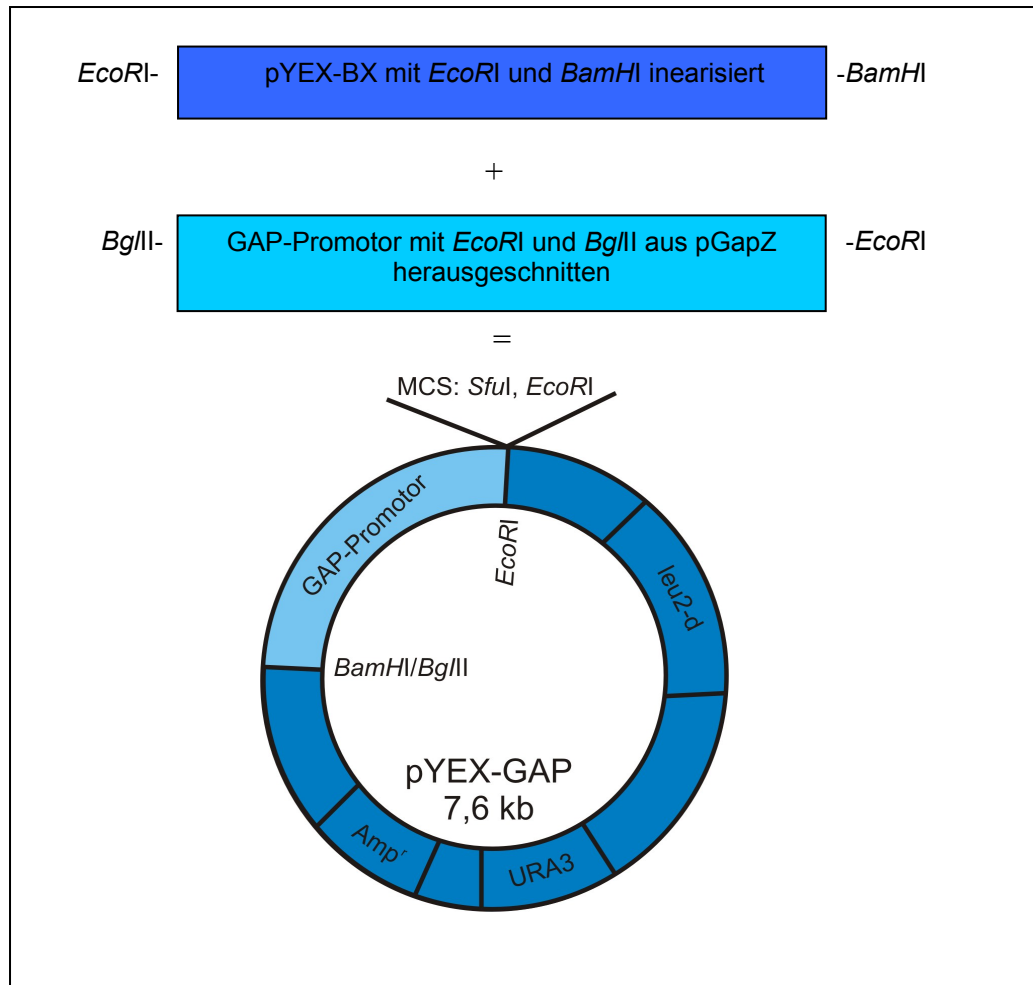


Abbildung 9:

Klonierungsstrategie zur Herstellung von pYEX-GAP aus den Plasmiden pYEX-Bx und dem GAP-Promotor aus pGAPZ.

Nach Transformation der Hefen mit *cat1-5'*His-tag-3'PTS von *Soldanella alpina* in pYEX-GAP, sowie Transformation mit *cat1-3'*PTS-pYEX-GAP und *cat1-5'*His-tag-3'PTS-pYEX-GAP von *Homogyne alpina* war ebenfalls kein pflanzliches rekombinantes Protein über Western Blot nachweisbar.

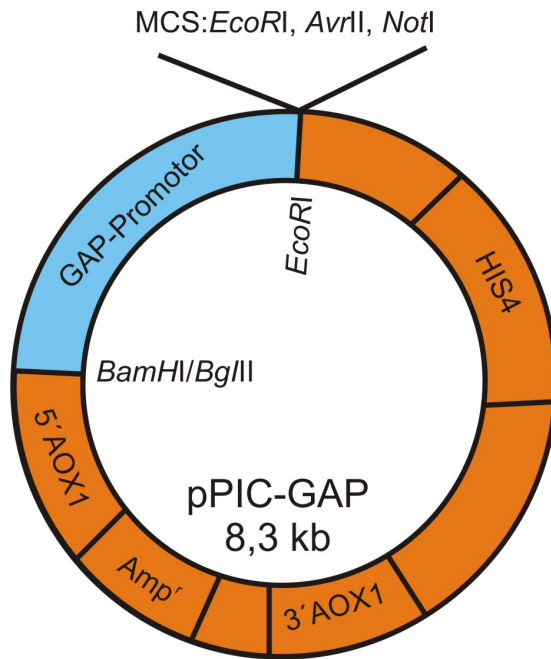
Transformation der in Tabelle 1 angegebenen Konstrukte in den *Saccharomyces*-Stamm CEN.PK2 mit genetischen Defekten im *cat-t1* (Δct , cytosolische Katalase), *cat-a1* ($\Delta act1$, peroxisomale Katalase), oder beiden Katalase-Genen ($\Delta ct/\Delta act1$) führten ebenfalls zu keiner heterologen Expression funktioneller, pflanzlicher Katalasen. Einmal gelang es, bei der Katalase-Doppelmutante CEN.PK $\Delta ct/\Delta act1$, rekombinante Katalase-Untereinheiten nach Transformation mit *cat1-5'*His-tag-pYEX-BX von *Secale cereale* über Western Blot nach Bindung eines spezifischen Antikörpers gegen Blattkatalase von Roggen nachzuweisen. Dieses Ergebnis konnte allerdings nach Anzucht größerer Mengen des Hefeklons und anschließender Extraktion nicht reproduziert werden.

Hefestamm	<i>Secale cereale</i>	<i>Soldanella alpina</i>	<i>Homogyne alpina</i>
DY 150	<i>cat1</i> -pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-pYEX-BX	<i>cat1</i> -pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pYEX-GAP	<i>cat1</i> -3'PTS-pYEX-GAP <i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pYEX-GAP
CEN.PK2	<i>cat1</i> -pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-pYEX-BX	<i>cat1</i> -5'His-tag-pYEX-BX	

Tabelle 1:

Zusammenfassung der modifizierten und nicht modifizierten Katalase-cDNAs in den entsprechenden Vektoren, welche zum Versuch der heterologen, funktionellen Proteinexpression pflanzlicher Katalasen in den unterschiedlichen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen eingesetzt wurden.

Bei Nutzung von Hefesystemen zur heterologen Proteinexpression ist eine potenzielle Instabilität der positiven Klone nach Transformation mit einem Plasmid bekannt (Sreekrishna et al., 1997; Cereghino und Cregg, 1999). Um instabile, nur transient exprimierende Transformanten zu vermeiden, wurden statt *Saccharomyces cerevisiae* *Pichia pastoris* bzw. *Hansenula polymorpha* (= *Pichia angusta*) eingesetzt. In *Pichia*-Zellen wird das linearisierte Plasmid über Rekombination in das Genom integriert, was zu stabileren Transformationslinien führt. Weiterhin glycosyliert *Pichia* das zu exprimierende Protein nicht so stark wie *Saccharomyces* (Cereghino und Cregg, 2000). Die eingesetzten cDNAs der pflanzlichen Katalasen weisen nur wenige potentielle Glycosylierungsstellen (N-X-S/T, Cereghino und Cregg, 2000) auf (vergl. Abb. 7), durch die Verwendung des *Pichia*-Systems waren somit mögliche negative durch Glycosylierung ausgelöste Folgen minimiert. Für die Expression in den *Pichia pastoris*-Zellen mussten die Katalase-cDNAs in die entsprechenden Vektoren pHIL-D2 und pPIC3.5K umkloniert werden. Durch Klonierung in pHIL-D2 konnten die Transformanten über den Ausgleich der Histidin-Defizienz selektioniert werden. Da pPIC3.5K noch eine Kanamycin-Resistenz besitzt, konnte zusätzlich zur Histidin-Defizienz noch über die Gabe von Kanamycin bzw. G418 selektioniert werden. Da *Pichia* in der Lage ist, Methanol als Kohlenstoffquelle zu nutzen, stand die Expression der cDNAs in den Vektoren pHIL-D2 und pPIC3.5K unter der Kontrolle eines Methanol-induzierbaren AOX1 Promotors. Als Alternativstrategie wurde durch Klonierung das Plasmid pPIC-GAP hergestellt: Das Plasmid pPIC3.5, welches bis auf die Kanamycinresistenz homolog zu pPIC3.5K ist, wurde durch den konstitutiv exprimierenden GAP-Promotor aus pGAPZ A durch Klonierung ergänzt (Abb. 10). So sollte zum einen eine konstitutive Katalase-Expression unter der Kontrolle des GAP-Promotors durch Verwendung von pPic-GAP, zum

**Abbildung 10:**

Schematische Darstellung von pPIC-GAP. Nach Linearisierung von pPIC3.5 (orange) mit *EcoRI* und *BamHI* wurde der aus pGAPZ mit *EcoRI* und *BglII* herausgeschnittene GAP-Promotor (blau) in pPIC3.5 ligiert.

anderen eine Methanol-induzierbare Expression unter der Kontrolle des AOX-1-Promotors durch die Verwendung von pHIL-D2 bzw. pPICK3.5K möglich sein. Die verwendete Stämme von *Pichia pastoris* GS115 oder KM71 wurden mit den in Tabelle 2 dargestellten Konstrukten transformiert. Nach Selektion wurde bei vermeintlichen Transformanten eine genomischen DNA-Isolierung mit anschließendem Southern Blot durchgeführt. Signale, welche den korrekten Einbau des linearisierten Plasmids in das Genom repräsentierten, konnten nicht detektiert werden. Ebenfalls gelang es nicht, pflanzliche Katalase über Western Blot mittels spezifischem Antikörper nachzuweisen.

Hefestamm	<i>Secale cereale</i>	<i>Soldanella alpina</i>	<i>Homogyne alpina</i>
KM71	<i>cat1</i> -5' His-tag-pHIL-D2	<i>cat1</i> -5' His-tag-pPHIL-D2 <i>cat1</i> -5' His-tag-pPIC-GAP	
GS115	<i>cat1</i> -5' His-tag-pHIL-D2 <i>cat1</i> -5' His-tag-3' PTS-pPIC3.5K	<i>cat1</i> -5' His-tag-pPHIL-D2 <i>cat1</i> -5' His-tag-3' PTS-pPIC3.5K <i>cat1</i> -5' His-tag-pPIC-GAP <i>cat1</i> -5' His-tag-3' PTS-pPIC-GAP	<i>cat1</i> -3' PTS-pPIC3.5K <i>cat1</i> -5' His-tag-3' PTS-pPIC3.5K

Tabelle 2:

Zusammenfassung der verschiedenen modifizierten Katalase-cDNAs in den entsprechenden Vektoren, welche zum Versuch der heterologen, funktionellen Proteinexpression pflanzlicher Katalasen in den Stämmen von *Pichia pastoris* GS115 und KM71 eingesetzt wurden.

Die Katalase-defiziente Mutante MCT75 von *Hansenula polymorpha* wurde von Hansen und Roggenkamp (1989) nach Transformation mit *catA* von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich komplettiert. Daher wurde der Versuch unternommen, diese Mutante mit pflanzlichen Katalasen zu transformieren.

Hansenula polymorpha ist ebenfalls in der Lage, Methanol zu verstoffwechseln, so dass Genexpression unter der Kontrolle des AOX-1-Promotors möglich ist. Allerdings besitzt sie keine Histidin-Defizienz, sondern ist nicht in der Lage, Uracil selbst zu synthetisieren. Deshalb wurde ein Plasmid mit AOX-1 Promotor und dem Uracil-Gen durch Klonierung hergestellt: Der AOX-1-Promotor wurde zusammen mit *cat1* von *Homogyne alpina* aus *cat1*-

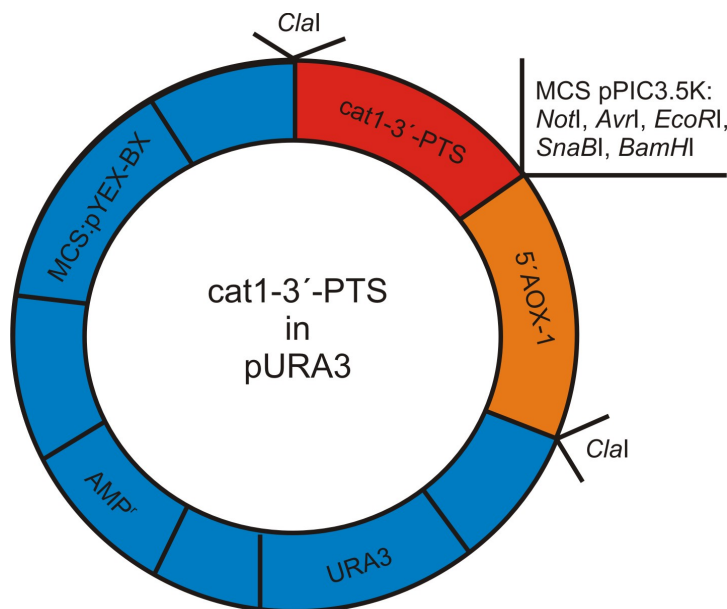


Abbildung 11:

Schematische Darstellung des Plasmids pURA. Der AOX-1 Promotor, Teile der MCS aus pPIC3.5K (orange) und das *cat1*-3'-PTS-Konstrukt von *Homogyne alpina* (rot) wurden in die *ClaI*-Schnittstelle von *yEX-BX* (blau) kloniert.

3'-PTS-pPIC3.5K mit *ClaI* herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *ClaI* linearisierten *Saccharomyces cerevisiae*-Expressionsvektor pYEX-BX hinein ligiert (Abb. 11). Allerdings wurde bei dieser Klonierungsstrategie nicht die 3'-Terminationssequenz des AOX-1-Promotors mitkloniert, da der an *Homogyne alpina cat1* befindliche Adapter eine *ClaI*-Schnittstelle enthält (Kap. 3.1.). Daher war unklar, ob dieser Vektor für die heterologe Expression in *Hansenula polymorpha* geeignet war.

Mit Hilfe dieses Konstrukts sollte eine methanolinduzierte Katalase-Expression in *Hansenula* und eine Selektion über URA3 stattfinden. Die Transformation von MCT75 mit *cat1*-3'-PTS-pURA3 von *Homogyne alpina* ergab zwar Transformanden, doch auch hier konnte keine rekombinante Katalase über Western Blot detektiert werden. Um auszuschließen, dass die fehlende 3'-Terminationssequenz des AOX-1-Promotors die Ursache für die fehlende Proteinexpression war, wurde *Hansenula* MCT75 mit Konstrukten transformiert, bei denen die Selektion auf externe Gabe von Kanamycin bzw. G418 beruhte (Tab. 3). Da auch diese Transformationen zu keinerlei rekombinantem Enzym führten, wurde der Versuch unternommen, *Hansenula polymorpha* MCT75 mit DNA-Konstrukten, welche für die heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt wurden, zu transformieren. Die Selektion beruhte weiterhin auf Uracil-Defizienz, da die verwendeten Vektoren pYEX-BX und pYEX-GAP diese ausgleichen. In Tabelle 3 sind alle Konstrukte dargestellt, mit denen MCT75 transformiert wurde.

<i>Secale cereale</i>	<i>Soldanella alpina</i>	<i>Homogyne alpina</i>
<i>cat1</i> -5'His-tag-pPIC3.5K <i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pPIC3.5K	<i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pPIC3.5K	<i>cat1</i> -3'PTS-pURA3 <i>cat1</i> -3'PTS-pPIC3.5K <i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pPIC3.5K
<i>cat1</i> -5'His-tag-pYEX-BX	<i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-pYEX-BX <i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pYEX-GAP	<i>cat1</i> -5'His-tag-3'PTS-pEx-GAP

Tabelle 3:

Zusammenfassung aller Konstrukte, mit denen *Hansenula polymorpha* MCT75 transformiert wurde. Die Plasmide pPIC3.5K und pURA3 sind integrative, die Plasmide pYEX-BX und pYEX-GAP sind zirkuläre Expressionsvektoren.

Alle in *Hansenula polymorpha* MCT75 unternommenen Katalase-Expressionsversuche führten, ebenso wie die heterologe Expression in *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen zu keiner rekombinanten pflanzlichen Katalase. Die Tatsache, dass es lediglich nur einmal gelang, rekombinante Katalase-Untereinheiten über Western Blot nachzuweisen (nach Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK $\Delta ct1/\Delta cta1$ mit *cat1*-5'His-tag-pYEX-BX von *Secale cereale*) zeigt, dass Hefen als Expressionssystem nicht geeignet sind, funktionelle pflanzliche Katalasen in größeren Mengen zu produzieren.

3. 3. Klonierung und Modifizierung der DNA und heterologe Expression funktioneller pflanzlicher Katalasen im Baculovirussystem

Da sich Hefen als Expressionssystem für die Herstellung rekombinanter, funktioneller pflanzlicher Katalasen als ungeeignet erwiesen, wurde für einen weiteren Versuch der heterologen Katalaseexpression das Baculovirussystem eingesetzt. Das Baculovirussystem wird vielfach als eukaryotisches Expressionssystem zur Herstellung komplexer rekombinanter Proteine eingesetzt (Kost und Condreay, 1999). Es basiert auf der Herstellung eines rekombinanten Baculovirus, bei dem die „Fremd“-DNA unter der Kontrolle des starken Polyhedrinpromotors steht. Das rekombinante Virus infiziert *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen und nutzt deren Proteinbiosyntheseapparat zur Herstellung des „Fremd“-proteins statt des vireneigenen Hüllproteins Polyhedrin. Um in diesem System eine erfolgreiche heterologe Expression funktioneller pflanzlicher Katalasen durchzuführen, wurden die in Kap. 3.1. beschriebenen Katalase-cDNA's *cat1*, *cat1*-5'His-tag von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* in die *EcoRI*-Schnittstelle des Baculovirus-Expressionsvektors pVL1393 kloniert. Das *NotI/ApaI*-*cat1*-Fragment von *Homogyne alpina* wurde in die *NotI*-Schnittstelle von

pVL1393, *cat1*-5'His-tag von *Homogyne alpina* als *NsiI/ApaI*-Fragment in den *NotI/PstI* geschnittenen Baculovirus-Vektor pVL1392 kloniert. Beide Plasmide enthalten u. a. den Polyhedrinpromotor und sind, bis auf die Reihenfolge der Schnittstellen in der MCS, identisch (Abb.5).

Da nicht bekannt war, ob der 5'-lokalisierte His-tag die Assemblierung von aktiver Katalase in den Insektenzellen stört, wurden über PCR noch Katalase-Konstrukte mit 3'-lokalisiertem His-tag hergestellt (Abb. 12).

a) *Secale cereale*:

```
5'-G-AAT-TCC-ATG-GAT-CCC-TGC-AAG-TTC.....AAG-CCA-AGC-GTA-
      EcoRI

CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-TGA-ATT-CC-3'
      6 x His-tag      EcoRI
```

b) *Soldanella alpina*:

```
5'-GG-AAT-TCC-ATG-GAT-CCT-TAC.....AGG-CCA-ACC-ATG-
      EcoRI

CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-TGA-ATT-CC-3'
      6 x His-tag      EcoRI
```

c) *Homogyne alpina*:

```
5'-TTC-TAG-ACC-ATG-GAT-CCT-TAC-AAG.....CGC-CCC-AAC-TAT-

CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-TGA-TCT-AGA-C-3'
      6 x His-tag
```

Abbildung 12:

Sequenzausschnitte der Katalase cDNAs von *Secale cereale* (a), *Soldanella alpina* (b) und *Homogyne alpina* (c) nach PCR zur Herstellung des 3'-lokalisiertem 6 x His-tags.

cat1-3'-His-tag von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* (als *ApaI/SpeI*-Fragment) wurden ebenfalls in den Expressionsvektor pVL1392 über *NotI/XbaI* kloniert. Alle Konstrukte, welche zur Erzeugung von rekombinanter *Autographa californica* Viren-DNA hergestellt wurden, sind in Tabelle 4 dargestellt.

<i>Secale cereale</i>	<i>Soldanella alpina</i>	<i>Homogyne alpina</i>	Kontrolle
<i>cat1</i> pVL1393	<i>cat1</i> pVL1393	<i>cat1</i> pVL1393	pVL1392
<i>cat1</i> -5'His-tagpVL1393	<i>cat1</i> -5'HistagpVL1393	<i>cat1</i> -5'HistagpVL1392	
<i>cat1</i> -3'His-tagpVL1392	<i>cat1</i> -3'HistagpVL1392	<i>cat1</i> -3'Histag nur Fragment	

Tabelle 4:

Übersicht der Katalase-cDNA Konstrukte, welche für die Transfektion von *Spodoptera frugiperda*-Zellen in die Vektoren pVL1392 oder pVL1393 kloniert wurden (außer *cat1*-3'His-tag von *Homogyne alpina*).

Vor Beginn der Transfektion wurden alle Plasmide ansequenziert (Kap. 2.2.9.), um sicherzustellen, dass jede cDNA korrekt in den Vektor eingebaut war. Als Kontrolle diente rekombinanter Virus, der mit pVL1392-Plasmid ohne Fragment transfektiert wurde.

Nach erfolgter Transfektion musste das rekombinante Virus isoliert und überprüft werden. Dazu wurde aus den verschiedenen Ansätzen jeweils aus infizierten, intakten Insektenzellen Gesamt-DNA isoliert und ein Southern-Blot mit anschließender Hybridisierung mit spezifischen cDNA-Sonden durchgeführt (Abb. 13).

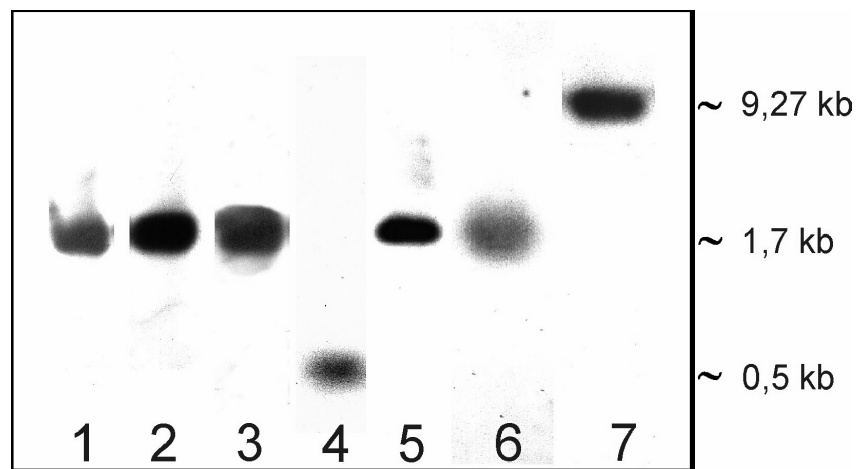


Abbildung 13: Southern Blot Analyse von mit *EcoRI* verdauter Gesamt-DNA aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen nach Infektion mit:

Spur 1: *Accat1*pVL1393, *Secale cereale*

Spur 2: *Accat1*-3'His-tagpVL1392, *Secale cereale*

Spur 3: *Accat1*-5'His-tagpVL1393, *Secale cereale*

Spur 4: *Accat1*pVL1393, *Homogyne alpina*

Spur 5: *Accat1*pVL1393, *Soldanella alpina*

Spur 6-7 als Kontrollen: Spur 6: Mit *EcoRI* verdauter Vektor pVL1393 mit

cat1 von *Soldanella alpina*. Spur 7: *AcpVL92*, *EcoRI* verdaut.

Zur Hybridisierung wurden folgende cDNA-Sonden benutzt:

Spur 1-3: *cat1 Secale cereale*

Spur 4: *cat1 Homogyne alpina*

Spur 5-6: *cat1 Soldanella alpina*

Spur 7: pVL1392, mit *EcoRI* linearisiert.

Da vor dem Transfer die DNA-Ansätze mit *EcoRI* verdaut wurden, ist bei allen Ansätzen von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* das zu erwartende 1,7 kb-Fragment und bei *Homogyne alpina* das 0,5 kb-Fragment detektiert worden. Zur Herstellung der rekombinanten, pflanzlichen Katalasen wurden *Spodoptera frugiperda*-Zellen mit dem jeweiligen rekombinanten Virus infiziert. Nach externer Hämgabe konnte das Protein aus den Zellen extrahiert werden, da ohne zusätzliche Hämgabe kein rekombinantes Protein nachgewiesen werden konnte. Um eine hohe Proteinausbeute im Baculovirussystem zu gewährleisten, musste das System nach folgenden Parametern optimiert werden:

- a) Zeitpunkt der externen Häm-Gabe nach Infektion
- b) Konzentration des Häms
- c) Erntezeitpunkt nach Infektion und Hämgabe

Zur Ermittlung dieser Parameter wurden Zeit- und Konzentrationsreihen durchgeführt. Abbildung 14 zeigt als Beispiel die Bestimmung der Parameter b) für *Secale cereale* und c) für *Secale cereale* und *Soldanella alpina*.

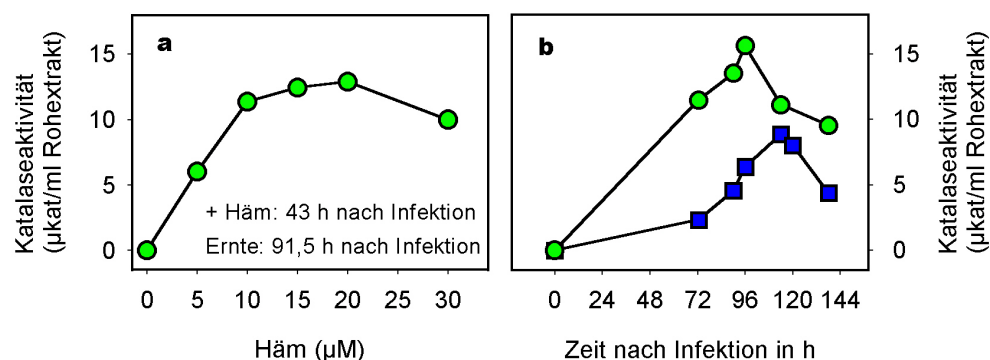


Abbildung 14:

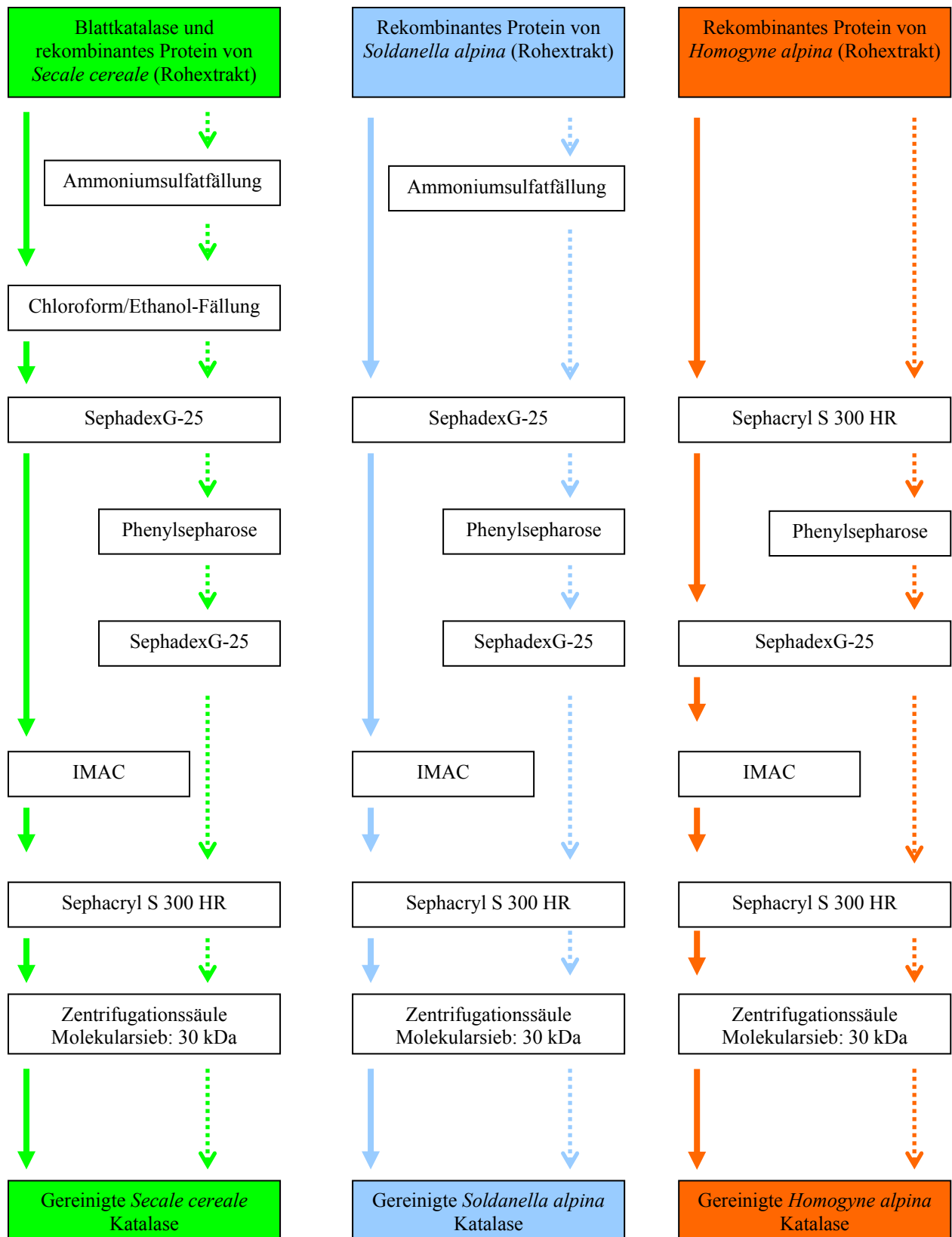
Darstellung der Bestimmung von a) der optimalen, extern zugegebenen Hämkonzentration zur heterologen Expression funktioneller *Secale cereale*-Katalase (o, grün), Hämzugabe: 43 h nach Infektion, Ernte: 91,5 h nach Infektion und b) den optimalen Erntezeitpunkte für die Katalasen von *Secale cereale* (o, grün) und *Soldanella alpina* (□, blau) Hämzugabe: 48 h nach Infektion, Endkonzentration: 20µM.

Da nach Infektion mit den 5'- und 3'-His-, „getaggt“ Konstrukten weder im Aktivitätstest (Kap. 2.8.1.), noch im Western Blot (Kap. 2.7.1.2.) ausreichende Proteinmengen detektiert werden konnten, wurden diese bei der Optimierung des Systems nicht berücksichtigt. Als optimalen Zeitpunkt der Hämgabe erwies sich bei Expression aller Proteine 2d nach Infektion, die Endkonzentration des Häms betrug 20µM. Der Bereich des Erntezeitpunktes variierte geringfügig:

- a) *Secale cereale*: 90-100 h nach Infektion
- b) *Soldanella alpina*: 100-120 h nach Infektion
- c) *Homogyne alpina*: 90-110 h nach Infektion

Weiterhin wurde versucht, Sf900-Zellen, *Spodoptera frugiperda*-Zellen, welche an FKS-freies Medium adaptiert waren, zu etablieren. Sf900-Zellen exprimierten jedoch wesentlich geringere Mengen an rekombinanter aktiver Katalase, als Sf9-Zellen (z. B. bei Katalase von *Soldanella alpina* um den Faktor 4,5). Außerdem hatte die Adaptation an serumfreies Medium eine Erhöhung der internen, zelleigenen Katalase zur Folge. Daher erwiesen sich Sf900-Zellen für die Expression funktioneller, pflanzlicher Katalasen als ungeeignet.

Nach Optimierung des Baculovirussystems konnten die rekombinanten Proteine effizient exprimiert, extrahiert und gereinigt werden. Da nur die „ungetaggteten“ cDNA-Konstrukte nach heterologer Expression funktionelle rekombinante Katalase ergaben, musste auf konventionelle Proteinreinigungsmethoden (Säulenchromatographie und Fällung) zurückgegriffen werden. Das Reinigungsprotokoll wurde während dieser Arbeit mehrfach modifiziert, um Aktivitätsverluste während der Reinigung zu minimieren. Abbildung 15 zeigt alle eingesetzten Reinigungsverfahren, bei einigen Versuchsansätzen wurden jedoch nicht alle Reinigungsschritte durchgeführt. Zur Reinigung konnte rekombinante Roggenkatalase mit Chloroform/Ethanolgemisch gefällt werden. Dieser Reinigungsschritt entfiel für rekombinante Katalase von *Homogyne* und *Soldanella alpina*, da sie während der Fällung fast vollständig inaktiviert wurden. Zu Beginn der Arbeit wurden die rekombinanten Proteine von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* zusätzlich mit Ammoniumsulfat gefällt. Doch aufgrund der hohen Aktivitätsverluste während der Fällung entfiel dieser Reinigungsschritt ebenfalls. Alle drei Katalasen wurden dann über Säulenchromatographie gereinigt: Sephadex-G25, Sephacryl S 300 HR und Phenylsepharose. Über Zentrifugationssäulchen wurde die Katalase gewaschen und aufkonzentriert. In den ersten Präparationen wurde die Reinigung noch durch IMAC ergänzt. Die Phenylsepharosesäule wurde dann ganz durch IMAC ersetzt, um Katalaseverluste zu reduzieren.

**Abbildung 15:**

Schema zur Reinigung der rekombinanten Katalasen von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina*, sowie aus Roggenblättern isolierte Katalase. Offene Pfeile repräsentieren das ursprüngliche Protokoll, geschlossene Pfeile das modifizierte Reinigungsprotokoll.

Zur Analyse wurden die gereinigten Proteinextrakte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und über Western Blot identifiziert (Abb. 16). Um zu gewährleisten, dass die Immunreaktion spezifisch ist und nicht auf eine Antikörperbindung mit endogener Katalase aus Insektenzellen zurückzuführen ist, wurden als Kontrolle zusätzlich Sf9-Zellextrakte, die entweder nicht infiziert aber mit Häm behandelt wurden (nicht gezeigt), oder mit rezirkularisierter Viren-DNA ohne Katalase-Insert (AcpVL1392) infiziert wurden, eingesetzt (Abb. 16b).

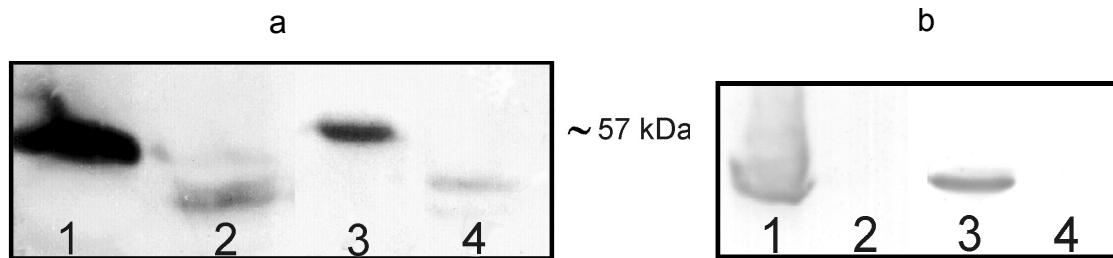


Abbildung 16:

Western Blot von in Insektenzellen exprimierten Katalasepräparationen.

- a) Spur 1: Gereinigte Roggenblattkatalase als Kontrolle
 Spur 2: Rekombinante Katalase von *Soldanella alpina*
 Spur 3: rekombinantes Katalaseprotein von *Secale cereale*
 Spur 4: Rekombinante Katalase von *Homogyne alpina*

Zum Nachweis diente ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen Roggenblattkatalase.

- b) Spur 1: Rekombinante *Homogyne alpina* Katalase
 Spur 2: Mit AcpVL1392 infizierte *Spodoptera frugiperda*-Zellen als Kontrolle
 Spur 3: Rekombinante *Homogyne alpina* Katalase
 Spur 4: Gereinigte Roggenblattkatalase als Kontrolle

Zum Nachweis diente ein spezifischer Antikörper gegen rekombinante Katalase von *Homogyne alpina*.

Das rekombinante Enzym von *Secale cereale* zeigte im SDS-Gel keinen Unterschied im Laufverhalten im Vergleich zu isolierter Roggenblattkatalase. Die rekombinanten Katalasen von *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* konnte durch eine schwache Kreuzreaktion mit dem roggen-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 16a, Spur 2 und 4). Die jeweiligen Untereinheiten erscheinen jedoch kleiner als 57 kDa, obwohl sie laut Berechnung aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz (56,7 kDa bei *Homogyne* und 56,9 kDa bei *Soldanella*) in diesem Bereich liegen müssten (Swiss-Prot. Datenbank). Um auszuschließen, dass es sich bei der Kreuzreaktion von rekombinanter *Homogyne alpina* Katalase mit dem roggen-spezifischen Antikörper um ein Artefakt handelte, wurde rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* auch durch Western Blot Analyse und anschließendem Nachweis mit einem spezifischen Antikörper gegen das Katalase-Isoenzym CAT-1 von *Homogyne alpina* identifiziert. Eine umgekehrte Kreuzreaktion gegen den *Homogyne*-Katalase spezifischen Antikörper mit aus Roggenblättern isolierter Katalase konnte nicht festgestellt werden (Abb.

16b). Es gelang somit, rekombinante Katalasen von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* im Baculovirussystem funktionell zu exprimieren.

3.4. Vergleich der photooxidativen und oxidativen Inaktivierung pflanzlicher Katalasen

Nach erfolgreicher heterologer Expression pflanzlicher Katalasen wurden vergleichende Lichtinaktivierungsexperimente durchgeführt (Abb. 17). Da die Starklichtinaktivierung von Katalasen nur unter aroben Bedingungen stattfindet (Cheng et al., 1981) und tierische Katalasen durch Superoxid ohne zusätzliche Lichtinkubation spezifisch hemmbar sind (Kono und Fridovich, 1982), wurde beide Mechanismen miteinander verglichen. Damit sollte ermittelt werden, ob eine erhöhte Lichtstabilität der *Homogyne*-Katalase mit einer erhöhten Stabilität gegen Superoxid korreliert. Superoxid ist an der Entstehung der inaktiven Katalaseintermediate Compound II and Compound III beteiligt (Kirkman et al., 1987, 1999). Durch zusätzliche Gabe von peroxidatischen Substraten, z. B. Ethanol oder NADPH, werden diese inaktiven Intermediate vermieden, bzw. wieder in aktive Katalase zurücküberführt. Daher wurde die Wirkung dieser beiden peroxidatischen Substrate auf die Starklichtinaktivierung und die Superoxid-vermittelte Inaktivierung von pflanzlichen Katalasen ebenfalls untersucht (Abb. 18 und 19). Der bei Rinderleberkatalase beobachtete Schutz vor Superoxid durch NADPH beruht auf einer spezifischen Bindung des Substrates (Kirkman et al., 1987). Ob pflanzliche Katalasen ebenfalls NADPH spezifisch binden, wurde ebenso geprüft (Abb. 20, 21 und 22).

3.4.1. Starklichtinaktivierung von Katalasen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die aus *Homogyne alpina*-Blättern isolierte Katalase-cDNA für ein lichtstabiles Isoenzym (Abb. 3) codiert, wurde eine Lösung mit rekombinanter *Homogyne*-Katalase im Starklicht inkubiert. Als Vergleich dienten die rekombinanten Katalasen der Alpenpflanze *Soldanella alpina* und der Flachlandpflanze *Secale cereale* (Abb. 17).

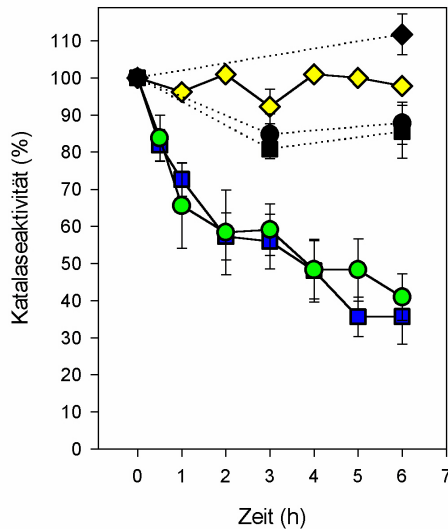


Abbildung 17:

Lichtinaktivierung heterolog exprimierter Blattkatalasen von *Secale cereale* (o grün), *Soldanella alpina* (□ blau) und *Homogyne alpina* (◇ gelb) bei $800 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR und 25°C . Die Reinigung erfolgte über Chloroform/Ethanol- und Ammoniumsulfatfällung (nur *Secale*), Sephadex-G25, Sephacryl S 300 HR und Phenylsepharose. Es wurden jeweils $0,8\text{-}1 \mu\text{kat/ml}$ Inkubationsansatz eingesetzt. Die schwarzen Symbole repräsentieren die jeweiligen Dunkelkontrollen.

Innerhalb von sechs Stunden Starklichtinkubation sanken die Aktivitäten der rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Soldanella alpina* in ähnlicher Weise, wie es für die Katalasen aus Blättern beschrieben wurde (Abb. 3), auf 40% der Ausgangsaktivität ab. Das rekombinante Protein von *Homogyne alpina* zeigte dagegen keinen Aktivitätsverlust, sondern war lichtstabil. Die isolierte cDNA codiert somit eine lichtstabile Katalase von *Homogyne alpina*. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Streb et al. (1997), dass die Alpenpflanze *Homogyne alpina* eine lichtstabile Katalase-Isoform besitzt.

Cheng et al. wiesen 1981 nach, dass Ethanol Rinderleberkatalase vor Photooxidation bewahrt. Für NADPH ist bekannt, dass es tierische Katalasen vor Superoxid-vermittelter Inaktivierung schützt (Kirkman et al., 1987). Beide Substanzen können als peroxidatische Substrate für Katalase fungieren. Da, wie in der Einleitung näher erläutert, peroxidatische Substrate mit Compound I wieder zu aktiver Katalase reagieren können, wurde die Wirkung beider Substrate auf die Starklichtinaktivierung pflanzlicher Katalasen untersucht. Daher wurden jeweils $1 \mu\text{kat/ml}$ rekombinante Katalase von *Secale cereale*, gereinigte Katalase aus Roggenblättern, sowie Rinderleberkatalase als Referenz in Gegenwart von NADPH bzw. Ethanol im Starklicht inkubiert (Abb. 18).

Ethanol stabilisierte bei allen im Versuch eingesetzten Katalasen das Enzym und schützte es zu 100% vor Starklicht. Der von Cheng et al. (1981) beobachtete Schutz von Ethanol auf Rinderleberkatalase gegen Photooxidation trifft demzufolge auch auf lichtensible pflanzliche Katalasen zu. Die Wirkung von NADPH war weniger effizient: Nach 3 Stunden Starklichtinkubation hatte die Katalase von Rinderleber in Gegenwart von NADPH ca. 30%

mehr Aktivität als der Vergleichsansatz ohne NADPH. Rinderleberkatalase wird demnach durch NADPH teilweise vor Starklichtinaktivierung geschützt. Im Gegensatz dazu werden die Katalasen von *Secale cereale* auch in Anwesenheit von NADPH durch Licht inaktiviert.

3.4.2. Superoxid-vermittelte Inaktivierung von Katalasen

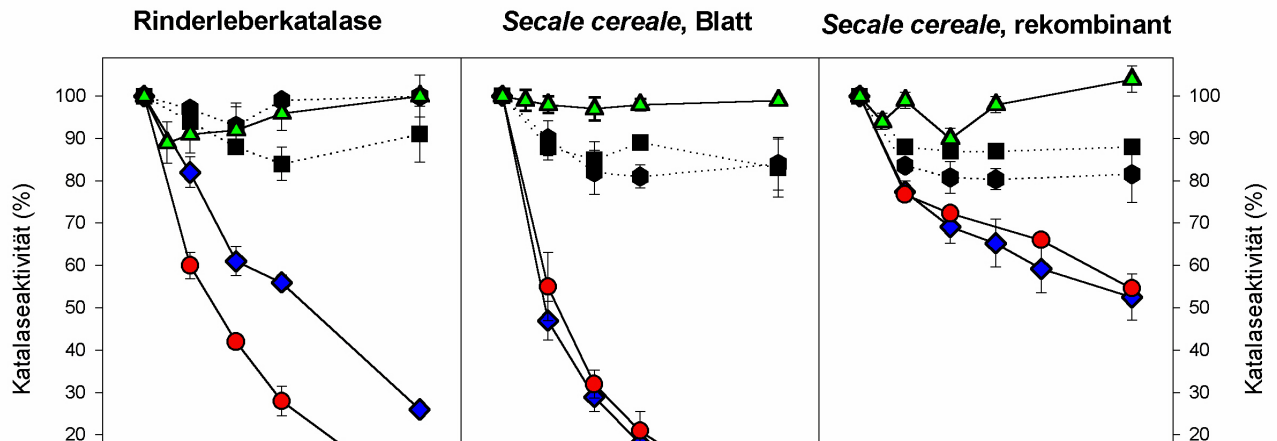


Abbildung 18:

Einfluss von 1mM NADPH oder 1% (v/v, $\approx 173,6$ mM) Ethanol auf die Starklichtinaktivierung gereinigter rekombinanter Katalase von *Secale cereale*, isolierter Blattkatalase aus Roggen und Rinderleberkatalase bei 25°C. Es wurden jeweils 0,5-1 $\mu\text{kat/ml}$ Ansatz eingesetzt. O (rot): Starklicht bei $800 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR; ◇ (blau): Starklicht + 1mM NADPH; Δ (grün): Starklicht + 1% (v/v, $\approx 173,6$ mM) Ethanol; ◼ (schwarz): Dunkelkontrolle + 1mM NADPH; ◻ (schwarz): Dunkelkontrolle.

Um zu untersuchen, ob die Aktivität der rekombinante pflanzlichen Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale*, sowie von aus Roggenblättern isolierter Katalase durch Superoxid signifikant herabgesetzt wird, wurden diese für 3 h im Dunkeln in einem Superoxid-erzeugenden System inkubiert. Einigen Ansätzen wurde 1% Ethanol (v/v, $\approx 173,6$ mM) bzw. NADPH (0,75–1 mM) zugesetzt. Als Kontrolle wurde das Experiment ebenfalls mit Rinderleberkatalase durchgeführt (Abb. 19).

Die Aktivität der Rinderleberkatalase wurde nach 3stündiger Inkubation durch Superoxid um 30% reduziert. Zugabe von Ethanol oder 0,75 mM NADPH schützten das Protein vor Inaktivierung und stabilisierten es vollständig. Auf die Aktivität von aus Roggenblättern gereinigte Katalase hatte Superoxid keinen Einfluss. Demzufolge blieb der Zusatz von Ethanol bzw. NADPH ohne Wirkung. Die rekombinante Katalase von *Secale cereale* zeigte jedoch eine starke Empfindlichkeit gegen Superoxid; die Aktivität sank während der 3 h Inkubation auf weniger als 10%. Ein Schutz vor Superoxid-verursachter Inaktivierung durch NADPH oder Ethanol war bei rekombinanter Roggenkatalase nicht zu beobachten. Die Aktivität von rekombinanter Katalase von *Homogyne alpina* sank ebenfalls signifikant

während der Inkubation mit Superoxid. Ethanol verlangsamte die Inaktivierung geringfügig, NADPH hatte keinerlei Einfluss.

Wie in der Einleitung bereits geschildert, verläuft die Inaktivierung durch Superoxid bei Rinderleberkatalase in zwei Stufen, die schnelle und die langsame Hemmung (Kono und

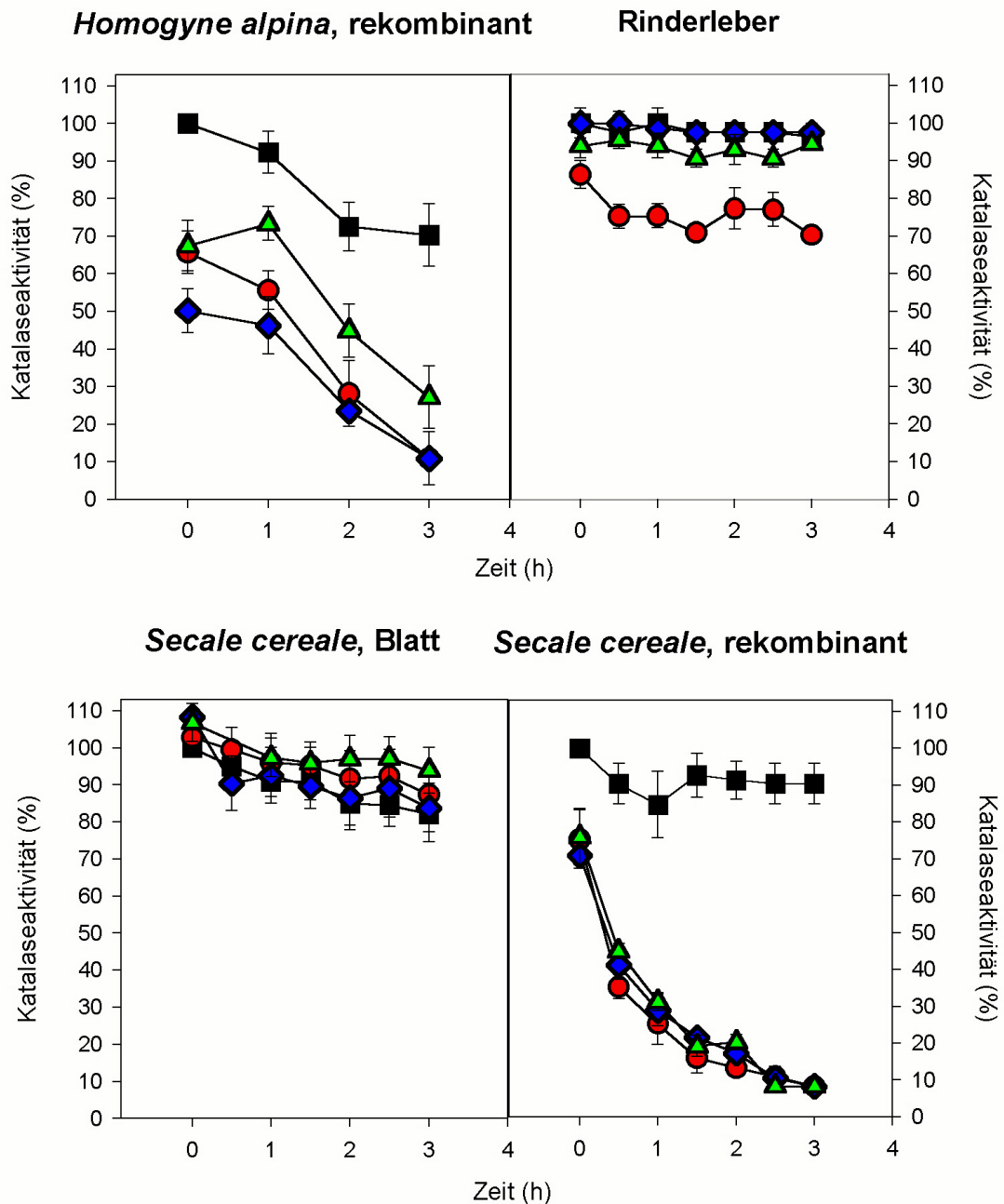


Abbildung 19:

Einfluss von Superoxid auf die Aktivität von Rinderleberkatalase, rekombinante Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale*, sowie aus Blättern isolierte Roggenkatalase. Die Katalasen wurden in einem Superoxid-erzeugenden System bei 25°C im Dunkeln auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Das Superoxid wurde durch Xanthinoxidase mit Acetaldehyd als Substrat erzeugt. ○ (rot) = Ansätze mit 1 U Xanthinoxidase; ◇ (blau) = Ansätze mit 1 U Xanthin-oxidase und 0,75 mM NADPH (bei Rinderleberkatalase und *Homogyne alpina*) bzw. 1 mM NADPH (bei *Secale cereale* Blatt und rekombinant); Δ (grün) = Ansätze mit 1 U Xanthinoxidase und 1% Ethanol (v/v, ≈ 173,6 mM); ■ = Kontrollansätze ohne Xanthin-Oxidase. Alle Ansätze enthielten 30 mM Acetaldehyd in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH: 7,5

Fridovich, 1982). Die schnelle Hemmung ist bei Rinderleberkatalase und bei den rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* bereits direkt nach Zugabe von Xanthin-Oxidase (Zeitpunkt t_0) zu beobachten (Abb. 19). Die rekombinanten pflanzlichen Katalasen sind empfindlicher gegen die schnelle Inaktivierung als Rinderleberkatalase. Weiterhin ist zu sehen, dass die Kontrollansätze aller untersuchten pflanzlicher Katalasen auch ohne Xanthin-Oxidase nach 3 h einen Verlust von 10-30% der Ausgangsaktivität zeigen. Diese Inaktivierung wird durch das Substrat Acetaldehyd ausgelöst und wurde von Kono und Fridovich (1982) an Rinderleberkatalase ebenfalls beobachtet. In dieser Arbeit wurde Rinderleberkatalase dagegen nicht durch Acetaldehyd gehemmt.

Generell ist eine erhöhte Instabilität der rekombinanten Enzyme im Vergleich zu der aus Roggenblättern isolierten Katalase zu beobachten. Daher können auch keine Aussagen über die Empfindlichkeit der Katalase aus Blättern von *Homogyne-alpina* gegen Superoxid abgeleitet werden.

3.4.3. NADPH-Bindung von Katalasen

Der bei Rinderleberkatalase vor beobachtete Schutz vor Superoxid durch NADPH (Abb. 19) ist auf spezifische NADPH-Bindung der Katalase zurückzuführen (Kirkman et al., 1999). Die

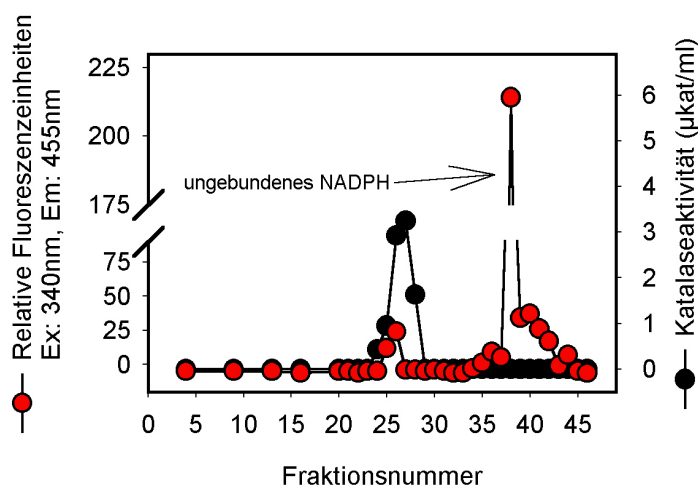


Abbildung 20:

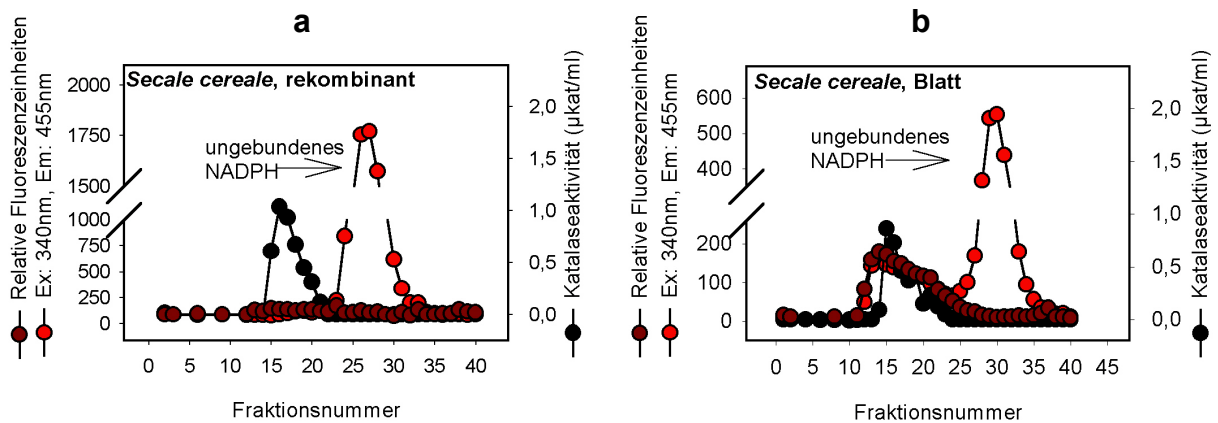
Säulenchromatographische Trennung über Sephacryl S 300 HR von einem Proteingemisch aus 1 mg Rinderleberkatalase, 5 mg BSA, 3 mg Ovalbumin und 5 mg CytochromC nach 24stündiger Inkubation mit 1 mM NADPH bei 4°C. Die Fluoreszenz der Fraktionen (○, rot) wurde bei 455 nm nach Anregung bei 340 nm bestimmt. Katalaseaktivität (○, schwarz) wurde in den Fraktionen 24-28 detektiert, von denen Fluoreszenz nur in den Fraktionen 25-26 ermittelt wurde. Inkubationen des Proteingemischs ohne NADPH zeigten nach Fraktionierung keine Fluoreszenz (nicht gezeigt).

NADPH-Bindung führt bei Rinderleberkatalase durch Vermeidung von Akkumulation des inaktiven Katalaseintermediats Compound II zu einer erhöhten Stabilität des Enzyms (Kirkman et al., 1987). Pflanzlichen Katalasen werden diese Bindungseigenschaften abgesprochen (Beaumont et al., 1990). Diese Aussage korreliert mit der Beobachtung, dass pflanzliche Katalasen, im Gegensatz zu Rinderleberkatalase, im Starklicht nicht durch NADPH stabilisiert werden (Abb. 17). Durner und Klessig postulierten jedoch 1996, dass

Blattkatalase von Tabak NADPH spezifisch bindet. Um zu prüfen, ob die rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*, sowie aus Roggenblättern isolierte Katalase spezifisch NADPH binden, wurden diese partiell gereinigt und in Anwesenheit von NADPH für 24h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze über eine Sephacryl S 300 HR-Säule fraktioniert. Es wurde die Katalaseaktivität der Fraktionen, sowie zum NADPH-Nachweis deren Fluoreszenz bei 455 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden Inkubationen ohne NADPH-Zusatz eingesetzt (Abb. 21 und 22). Um sicherzustellen, dass die NADPH-Bindung spezifisch für Katalasen ist und nicht eine generelle NADPH-Bindung an Proteinen vorkommt, wurde Rinderleberkatalase in einem Proteingemisch in Anwesenheit von NADPH inkubiert (Abb. 20).

Die Fraktionierung eines Proteingemischs mit Rinderleberkatalase zeigte Katalaseaktivität in den Fraktionen 24-28. Ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz war in den katalasehaltigen Fraktionen 25 und 26 messbar. Diese Fluoreszenz war bei den Ansätzen ohne vorherige NADPH-Inkubation nicht nachzuweisen (nicht gezeigt). Da nicht alle Katalasefraktionen nach Inkubation mit NADPH eine Fluoreszenz zeigten, haben es nicht alle Katalasemoleküle spezifisch gebunden. Das Maximum der Katalaseaktivität ist im Vergleich zum Fluoreszenzmaximum leicht verschoben. Das bedeutet, dass die Katalasemoleküle mit gebundenem NADPH schwerer sind, als Katalasemoleküle ohne gebundenes NADPH. Die Hauptmenge des NADPHs war ab den Fraktionen 36 als ungebundenes NADPH nachzuweisen. Daher ist die erhöhte Fluoreszenz in den Fraktionen 25 und 26 auf eine spezifische NADPH-Bindung durch Rinderleberkatalase zurückzuführen.

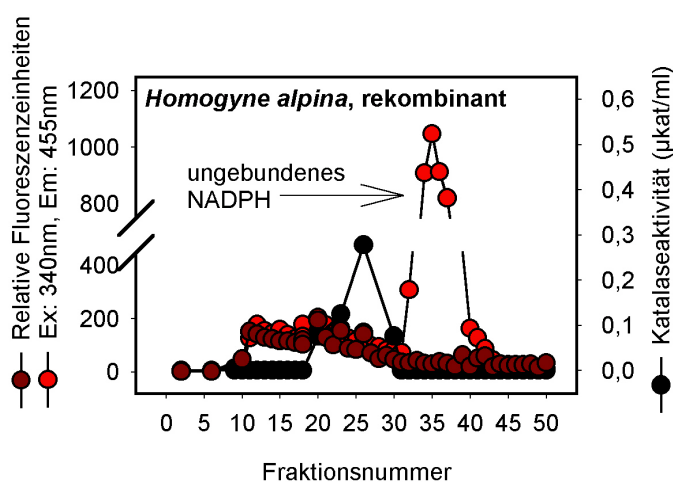
Inkubationen rekombinanter Roggenkatalasepräparationen mit NADPH ergaben nach Fraktionierung keinen Anstieg der Fluoreszenz in den katalasehaltigen Fraktionen 15-20 (Abb. 21a). Das NADPH war ungebunden in den Fraktionen 23-33 nachzuweisen. Im Kontrollansatz ohne NADPH-Inkubation war keine Fluoreszenz zu beobachten.

**Abbildung 21:**

Säulenchromatographische Trennung über Sephacryl S 300 HR von partiell gereinigten Roggenkatalasepräparationen nach 24stündiger Inkubation mit (○ rot) bzw. ohne (○ dunkelrot) 1 mM NADPH bei 4°C mit anschließender Katalaseaktivitäts-Bestimmung (○ schwarz) und Fluoreszenzmessung der Fraktionen. Die Fluoreszenz wurde bei 455 nm nach Anregung bei 340 nm bestimmt. Vor Versuchsbeginn wurden die Katalasen über Chloroform/Ethanol-Fällung und Sephadex-G25 partiell gereinigt und in einer Zentrifugationssäule aufkonzentriert. Pro Ansatz wurden ca. 0,25 bis 0,5mg Katalase eingesetzt.

a) rekombinante Katalase von *Secale cereale*, b) aus Blättern isolierte Katalase von *Secale cereale*.

Die Ansätze mit aus Blättern isolierter Roggenkatalase zeigten nach Fraktionierung dagegen eine erhöhte Fluoreszenz in den katalasehaltigen Fraktionen (Fraktion 14-23, Abb. 21b). Da beim Kontrollansatz ohne vorherige NADPH-Inkubation ebenfalls die Fluoreszenz in den Fraktionen mit Katalaseaktivität ansteigt, ist diese nicht auf eine spezifische NADPH-Bindung zurückzuführen. Auch bei rekombinanter Katalase von *Homogyne alpina* konnte keine spezifische NADPH-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 22).

**Abbildung 22:**

Säulenchromatographische Trennung über Sephacryl S 300 HR von partiell gereinigter rekombinanter Katalase von *Homogyne alpina* nach Inkubation mit (○ rot) und ohne (○ dunkelrot) 1 mM NADPH für 24 h bei 4 °C. Dargestellt ist die Fluoreszenz bei 455 nm nach Anregung bei 340 nm und die Katalaseaktivität (○ schwarz) der einzelnen Fraktionen. Vor Versuchsbeginn wurde das Protein über Sephadex-G-25, Sephacryl S 300 HR und Zentrifugationssäule gereinigt und aufkonzentriert. Es wurden pro Ansatz ca. 0,25-0,5 mg Katalase eingesetzt.

Katalaseaktivität wurde in den Fraktionen 20-30 festgestellt. Eine erhöhte Fluoreszenz in den Fraktionen 11-26 konnte sowohl bei den Kontrollansätzen ohne NADPH-Inkubation, als auch nach NADPH-Inkubation detektiert werden. Diese korreliert nicht mit dem Maximum der Katalaseaktivität und ist demzufolge unspezifisch, zumal sie auch in den Kontrollansätzen gemessen wurde. Da es sich nur um teilgereinigtes Katalase handelte, ist die erhöhte Fluoreszenz wahrscheinlich auf andere, im Proteingemisch noch vorhandene Substanzen zurückzuführen. Die auf NADPH zurückzuführende Fluoreszenz (ab Fraktion 32) repräsentiert ungebundenes NADPH, da dort keine aktive Katalase mehr nachgewiesen werden konnte. Die hier untersuchten pflanzlichen Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* sind, übereinstimmend mit der Aussage von Beaumont et al. (1990), nicht fähig, spezifisch NADPH zu binden.

Anhand der in Kapitel 3. 4. dargestellten Ergebnisse können zusammenfassend folgende Aussagen gemacht werden:

- a) Die aus *Homogyne alpina*-Blättern isolierte Katalase-cDNA codiert für eine lichtstabile Katalase-Isoform. Die rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und der Alpenpflanze *Soldanella alpina* sind dagegen lichtempfindlich.
- b) Rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* ist, ebenso wie rekombinante Roggenkatalase, in einem Superoxid-generierenden System instabil. Weder NADPH noch Ethanol schützten die Enzyme vor Inaktivierung. Isolierte Katalase aus Roggenblättern ist dagegen stabil. Daher korreliert die erhöhte Lichtstabilität der rekombinanten *Homogyne*-Katalase nicht mit einer erhöhten Stabilität gegen Superoxid. Da die rekombinante Roggenkatalase und die aus Blättern isolierte Katalase von *Secale cereale* unterschiedliche Empfindlichkeiten gegen Superoxid zeigen, können keine Aussagen über die Empfindlichkeit der Katalase aus *Homogyne alpina* Blättern gegen Superoxid abgeleitet werden.
- c) Die lichtsensible Katalase von *Secale cereale* wird durch Ethanol als peroxidatisches Substrat vor photooxidativer Inaktivierung geschützt. NADPH schützt dagegen nicht vor Starklichtinaktivierung. Der bei Rinderleberkatalase festgestellte Schutz durch NADPH vor Lichtinaktivierung beruht auf einer spezifische Bindung des NADPHs durch die Katalase. Weder die lichtsensible pflanzliche Katalase von *Secale cereale* (rekombinant und aus Blättern isoliert), noch die lichtstabile Katalase von *Homogyne alpina* binden spezifisch NADPH.

3.5. Vergleich der katalytischen Eigenschaften

Um zu prüfen, ob die lichtstabile Katalase von *Homogyne alpina* andere katalytische Eigenschaften zeigt als lichtsensible pflanzliche Katalasen, wurden verschiedene vergleichende Untersuchungen durchgeführt. Diese sollten Aufschluss darüber geben, ob der erhöhten Lichtstabilität eine Veränderung im Reaktionszentrum des Enzyms zu Grunde liegt. Dazu wurden die spezifischen Aktivitäten (Kap. 3.5.1.), die Michaelis-Menten-Konstanten (Kap. 3.5.2.), die Wirkung von Inhibitoren und Ascorbat auf die Enzymaktivität (Kap. 3.5.3.) und die peroxidatischen Aktivitäten von der lichtstabilen Katalase und den lichtsensiblen Katalasen von *Soldanella alpina* und *Secale cereale* bestimmt und miteinander verglichen.

3.5.1. Ermittlung der spezifische Aktivität pflanzlicher Katalasen

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in $\mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein wurden rekombinante Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* parallel extrahiert und gereinigt. Damit sollte sichergestellt werden, dass der durch die Reinigung ausgelöste Aktivitätsverlust der beiden Präparationen vergleichbar war. Nach Aktivitätsmessung und SDS-Gelelektrophorese mit anschliessender Coomassie-Färbung wurde mittels eines aufgetragenen Markerproteins (BSA) die Katalasemenge abgeschätzt. Abbildung 23 zeigt eine *Homogyne alpina*-Präparation im Vergleich mit der BSA-Konzentrationsreihe.

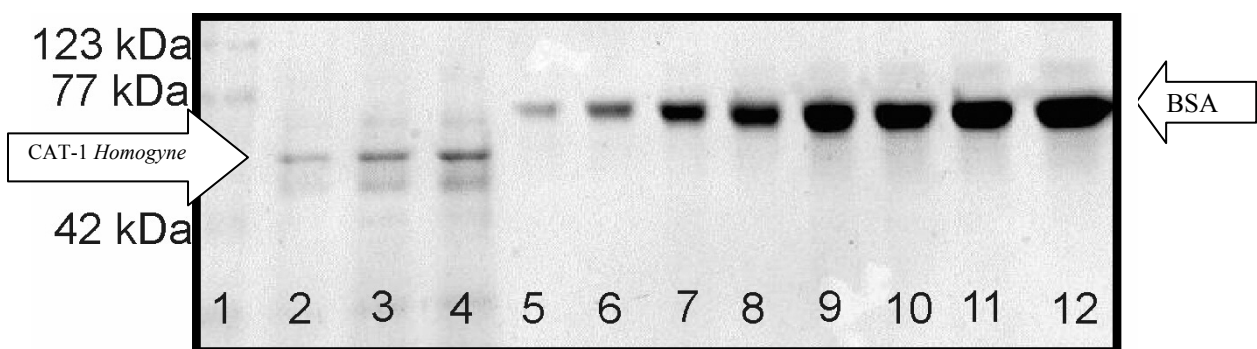


Abbildung 23:

Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Bestimmung der Proteinmenge rekombinanter gereinigter Katalase von *Homogyne alpina*. Die Katalase wurde über SephadexG-25, Sephacryl S 300 HR und Phenylsepharose gereinigt und über eine Zentrifugationssäule aufkonzentriert.

Spur 1: Marker

Spur 2: 25 μl *Homogyne*-Katalaselösung

Spur 3: 50 μl *Homogyne*-Katalaselösung

Spur 4: 75 μl *Homogyne*-Katalaselösung

Spur 5: 1 μg BSA

Spur 6: 2,5 μg BSA

Spur 7: 5 μg BSA

Spur 8: 7,5 μg BSA

Spur 9: 10 μg BSA

Spur 10: 12,5 μg BSA

Spur 11: 15 μg BSA

Spur 12: 17,5 μg BSA

Die *Homogyne alpina* Katalaseuntereinheit und die BSA-Banden sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Anhand dieses Gels ergab sich eine Menge von ca. 2 µg/75 µl rekombinanter *Homogyne*-Katalase (= 26,7 µg/ml). Die Katalaseaktivität der Lösung betrug 0,375 µkat/ml. Daraus ergab sich eine spezifische Aktivität von 14 µkat/mg Protein für die Katalase von *Homogyne alpina*. Mit dem parallel extrahierten Ansatz von *Secale cereale* wurde ebenso verfahren (nicht gezeigt). Tabelle 5 zeigt die auf dieser Methode basierenden spezifischen Aktivitäten aus unterschiedlichen Präparationen der jeweils parallel gereinigten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*.

<i>Secale cereale</i> (µkat/mg)	<i>Homogyne alpina</i> (µkat/mg)	Verhältnis [<i>S. cereale</i> / <i>H. alpina</i>]
124,8	20	6,2
104	17,33	6,0
89,9	14	6,4
Mittelwert: 106,23 (±10,13)	Mittelwert: 17,11 (±1,73)	Mittelwert: 6,2 (±0,1)

Tabelle 5:

Vergleich der spezifische Aktivitäten verschiedener Katalasepräparationen von jeweils parallel gereinigten, rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* in µkat/mg Protein.

Die in den unabhängigen Experimenten ermittelten absoluten Werte der spezifischen Aktivitäten variierten geringfügig, das Verhältnis der spezifischen Aktivität von rekombinanter Roggenkatalase zu *Homogyne*-Katalase blieb jedoch konstant. So ergab sich, dass die Katalase von *Secale cereale* um den Faktor 6,2 (± 0,1) aktiver ist als die Katalase von *Homogyne alpina*. Die aus dem Mittelwert der spezifischen Aktivitäten resultierenden Wechselzahlen repräsentiert den Substratumsatz pro Katalasemolekül und Sekunde und sind am Beispiel der spezifischen Aktivität der rekombinanten Katalase von *Secale cereale* auf folgende Weise berechnet worden:

1 Dalton entspricht der Masse des Wasserstoffatoms = $1,66 \times 10^{-24}$ g, das Molekulargewicht der Katalase beträgt 240 kDa.

$$1,66 \times 10^{-24} \text{g} \times 240.000 = 398,4 \times 10^{-21} \text{g}$$

Somit hat ein Molekül Katalase die Masse von $398,4 \times 10^{-21}$ g. 1 mg Katalase besitzt demzufolge $2,51 \times 10^{15}$ Moleküle Katalase.

1 mg rekombinante *Secale cereale*-Katalase hat einen Substratumsatz von 106,23 $\mu\text{mol} \times \text{s}$ (Tab. 5). 1 μmol entspricht $6,023 \times 10^{17}$ Moleküle.

$$106,23 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{s} \times 6,023 \times 10^{17} \text{ Moleküle} = 6,39 \times 10^{19} \text{ Moleküle H}_2\text{O}_2/\text{s}$$

Pro Sekunde setzen 1 mg Roggenkatalase $6,39 \times 10^{19}$ Moleküle H_2O_2 um. Die Umrechnung auf den Substratumsatz pro Katalasemolekül erfolgt nach:

$$\frac{[\text{Substratmoleküle}]}{[\text{Katalasemoleküle}] \times \text{s}} = \dots \frac{6,029 \times 10^{19} \text{ Moleküle H}_2\text{O}_2 \times \text{s}^{-1}}{2,51 \times 10^{15}} = \underline{25.458} \text{ Moleküle H}_2\text{O}_2/\text{Katalasemolekül} \times \text{s}$$

1 Molekül rekombinante Roggenkatalase besitzt demnach einen Substratumsatz von 25.458 H_2O_2 Molekülen pro Sekunde. In Tabelle 6 sind die Wechselzahlen der rekombinanten Roggenkatalase im Vergleich mit der rekombinanten Katalase von *Homogyne alpina* pro Sekunde bei einer Substratkonzentration von 15,76 mM H_2O_2 im Ansatz dargestellt.

<i>Secale cereale</i>	<i>Homogyne alpina</i>	Verhältnis [<i>S. cereale</i> / <i>H. alpina</i>]
25.458	4.103	6,2

Tabelle 6:

Darstellung der Wechselzahlen der rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* in Molekül H_2O_2 pro Katalasemolekül $\times \text{s}^{-1}$.

Sowohl die spezifische Aktivität, als auch die daraus resultierende Wechselzahl der lichtstabilen *Homogyne*-Katalase sind um den Faktor 6,2 im Vergleich zur lichtsensiblen Katalase von *Secale cereale* reduziert.

3.5.2. Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten

Die Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante sollte Aufschluss darüber geben, ob die herabgesetzte spezifische Aktivität der lichtstabilen Katalase von *Homogyne alpina* mit einer verminderten Substrataffinität im Vergleich zur lichtempfindlichen Roggenkatalase korreliert. In den Vergleich miteinbezogen wurden die ebenfalls lichtsensiblen Katalasen der Alpenpflanze *Soldanella alpina* (rekombinant) und Rinderleber.

Zu Ermittlung der K_m wurden die Katalaseaktivitäten bei H_2O_2 -Konzentrationen von ~ 4 bis ~ 33 mM gemessen. Daraufhin wurden die Michaelis-Menten-Konstanten (Tab. 7) mit Hilfe des Lineweaver-Burk Diagramms bestimmt (Abb. 24). Katalasen werden durch höhere H_2O_2 -

Konzentrationen gehemmt (Lardinois et al., 1996). Bevor das Enzym in die Sättigung kommt, tritt eine Hemmung durch das Substrat H_2O_2 ein (Switala und Loewen, 2002). Daher kann bei Katalasen die Michaelis-Menten-Konstante nur annähernd ermittelt werden.

<i>Secale cereale</i>	<i>Soldanella alpina</i>	<i>Homogyne alpina</i>	Rinderleber
21,17 mM	42,09 mM	33,18 mM	53,73 mM

Tabelle 7:

Vergleich der Michaelis-Menten Konstanten der heterolog exprimierten Katalasen von *Secale cereale*, *Homogyne alpina* und *Soldanella alpina* und Rinderleberkatalase.

In Abbildung 24 sind die reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die reziproken Substratkonzentrationen als Lineweaver-Burk-Diagramm für die verschiedenen Katalasen dargestellt.

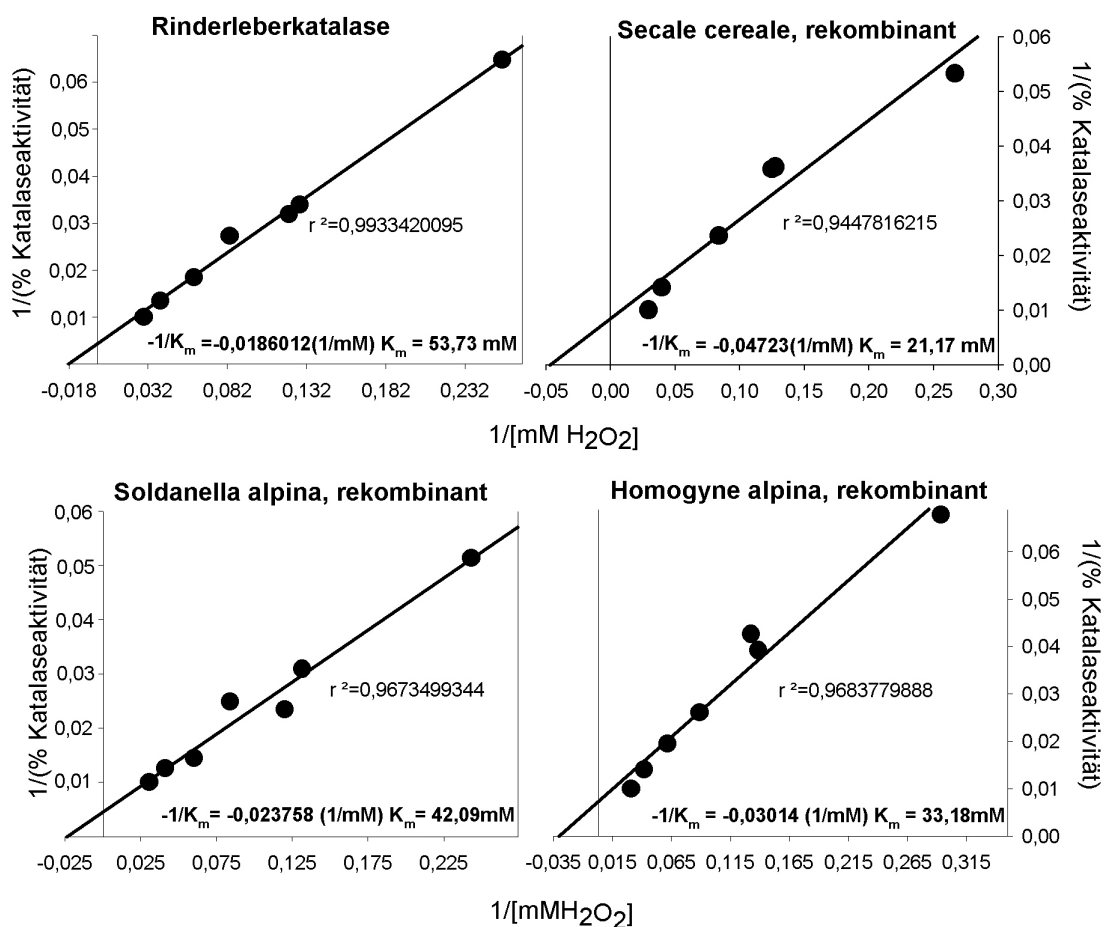


Abbildung 24:

Lineare Regression der Lineweaver-Burk Ableitung zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der rekombinanten Katalasen von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina* und Rinderleberkatalase.

Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit galt bei jeder Katalase der prozentuale Anteil der Katalaseaktivität (100%: Aktivität bei der höchsten Substratkonzentration) bei den verschiedenen Substratkonzentrationen. Da Wasserstoffperoxid als Substrat in Lösung nicht stabil ist, wurden die Substratkonzentrationen vor jeder Aktivitätsmessung bei 240nm (ϵ_{240} für H_2O_2 : $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) photometrisch bestimmt.

Die K_m -Werte für alle vier Katalasen lagen im millimolaren Bereich, waren also relativ hoch (Tab. 7). Alle hier untersuchten Katalasen haben eine schwache Substrataffinität. Die Michaelis-Menten-Konstante von rekombinanter *Homogyne alpina*-Katalase unterscheidet sich im Vergleich zu den lichtempfindlichen Katalasen nicht in ihrer Substrataffinität. Eine Korrelation der verminderten spezifischen Aktivität (Kap. 3.5.1.) mit einer niedrigen Substrataffinität bei der lichtstabilen Katalase ist demnach nicht festzustellen.

3.5.3. Wirkung von Inhibitoren und Ascorbat auf die Katalaseaktivität

Streb et al. (1997) stellten eine erhöhte Stabilität von aus *Homogyne*-Blättern extrahierter Katalase gegen die Inhibitoren KCN und 3-Amino-1,2,4-triazol fest. Um zu überprüfen, ob zwischen der Lichtstabilität und einer erhöhten Inhibitor-Toleranz ein Zusammenhang besteht, wurde rekombinante *Homogyne*-Katalase und zum Vergleich rekombinante Katalase von Roggen und Rinderleberkatalase mit den Inhibitoren 3-Amino-1,2,4-triazol, KCN und NaN_3 inkubiert. Alle drei verwendeten Inhibitoren interagieren mit dem Reaktionszentrum der Katalasen und vermitteln so deren Inaktivierung (Switala und Loewen, 2002). Tabelle 8 zeigt die Restaktivität der verschiedenen Katalasen nach Inkubation mit den Inhibitoren unter folgenden Bedingungen:

- a) 3-Amino-1,2,4-triazol und KCN: Nach Zugabe des Inhibitors in den angegebenen Endkonzentrationen 5 min Inkubation bei 25°C im Dunkeln
- b) NaN_3 : Nach Zugabe des Inhibitors in den angegebenen Endkonzentrationen 30 min Inkubation bei 25°C im Dunkeln.

Inkubationen mit dem Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol verursachen bei den rekombinanten Katalasen einen Verlust der Katalaseaktivität um ca. 60-80%. Rinderleberkatalase ist dagegen weniger empfindlich und besitzt auch nach Behandlung mit 8,5 mM 3-Amino-1,2,4-triazol noch eine Restaktivität von über 70%. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit den von Streb et al. (1997) gemachten Beobachtungen an aus Blättern isolierten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*. KCN und NaN_3 hemmten ebenfalls alle drei untersuchten Katalasen

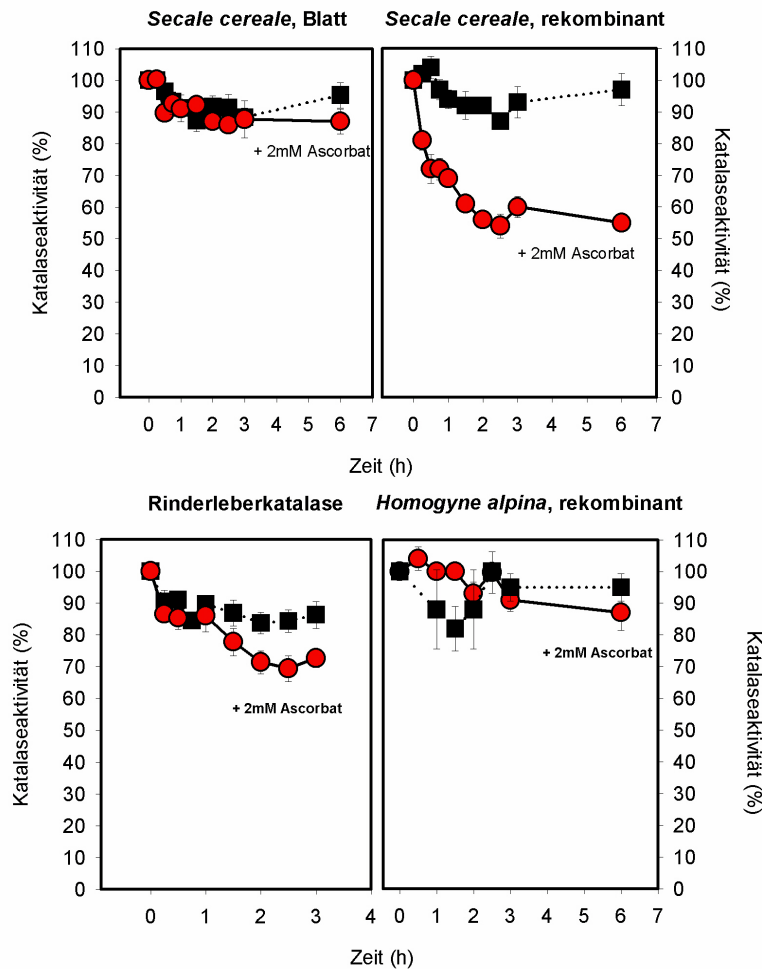
effizient. Ein Unterschied in der Empfindlichkeit gegen KCN zwischen der rekombinanten Katalase von *Homogyne alpina* und von *Secale cereale* konnte nicht beobachtet werden; wiederum nicht in Einklang mit den von Streb et al. (1997) ermittelten Daten für isolierte Blattkatalase von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*. Obwohl die untersuchten Katalasen unterschiedliche Lichtempfindlichkeiten besitzen, sind sie alle durch die Inhibitoren 3-Amino-1,2,4-triazol, KCN und NaN_3 hemmbar.

Inhibitor (mM)	<i>Secale cereale</i> (%)	<i>Homogyne alpina</i> (%)	Rinderleber (%)
3-Amino-1,2,4-triazol (1.7)	66,68 (\pm 4,96)	47,63 (\pm 2,72)	86,31 (\pm 0,29)
3-Amino-1,2,4-triazol (8.5)	42 (\pm 8,54)	19,3 (\pm 0,97)	72,23 (\pm 3,46)
KCN (0.1)	36,19 (\pm 2,25)	30,21 (\pm 2,29)	9,12 (\pm 0,59)
KCN (1.7)	4,24 (\pm 0,47)	6,1 (\pm 1,48)	5,4 (\pm 0,42)
KCN (6.8)	0	0	0
NaN_3 (0.1)	0	13 (\pm 0,01)	0
NaN_3 (1.0, 1.7)	0	0	0

Tabelle 8:

Einfluss der Inhibitoren 3-Amino-1,2,4-triazol, KCN und NaN_3 auf die Aktivität rekombinanter Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*, sowie Rinderleberkatalase. Die pflanzlichen Katalasen wurden vor Beginn der Inkubation über Chloroform-Ethanol-Fällung (nur *Secale*), Sepadex-G25, Sephacryl S 300 HR und Phenylsepharose und *Homogyne* zusätzlich über IMAC gereinigt. Angegeben ist die Restaktivität in Prozent.

In Blättern von Alpenpflanzen herrschen unterschiedliche Konzentrationen des Antioxidans Ascorbat (Streb et al., 1997). Ascorbat ist jedoch als Inhibitor für tierische Katalase bekannt (Davison et al., 1986; Nemoto et al., 1997). Daher sollte untersucht werden, ob pflanzliche Katalasen ebenfalls durch Ascorbat hemmbar sind. In diesem Zusammenhang sollte verglichen werden, ob die lichtstabile *Homogyne*-Katalase eine andere Ascorbatempfindlichkeit besitzt, als die lichtsensible Katalase von Roggen. Daher wurden die rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale*, aus Blättern isolierte Roggenkatalase und Rinderleberkatalase unter Zugabe der von Davison et al. (1986) eingesetzten Ascorbatkonzentration von 2 mM im Dunkeln inkubiert und in regelmäßigen Abständen die Aktivität bestimmt (Abb. 25).

**Abbildung 25:**

Einfluss von Ascorbat auf die Aktivität rekombinanter Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*, isolierter Roggenblattkatalase und Rinderleberkatalase. Die Ansätze wurden mit (●) und die Kontrollen ohne (■) 2 mM Ascorbat und im Dunkeln bei 25°C auf dem Schüttler inkubiert. Pro Inkubation wurden 0,8-1 µkat/ml Katalase eingesetzt. Angegeben ist die Katalaseaktivität in Prozent von der Ausgangsaktivität.

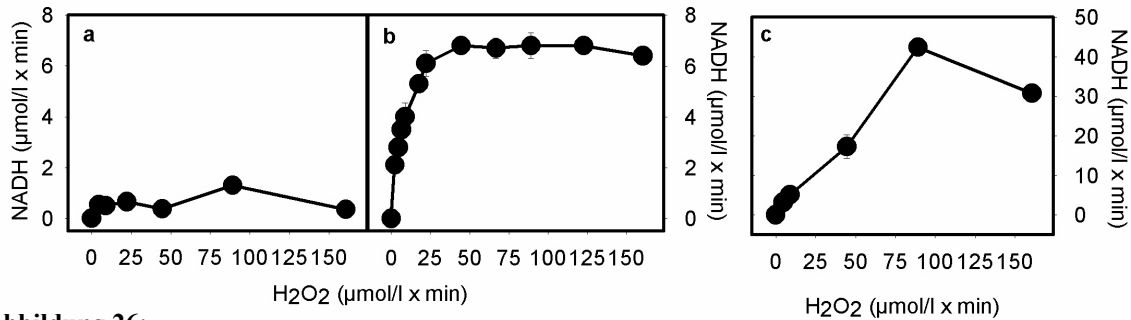
Rinderleberkatalase zeigte nach 3 h einen Aktivitätsverlust von 30%. Untersuchungen von Davison et al. (1986) zeigten, dass Ascorbat in der Lage ist, Rinderleberkatalase reversibel zu hemmen: Diese reversible Hemmung ist auf die Bildung des Katalaseintermediats Compound II unter aeroben Bedingungen zurückzuführen. Vermutlich stimuliert das unter aeroben Bedingungen autoxydierte Ascorbat (Semidehydroascorbat) die Entstehung von Compound II. Zugabe von Ethanol verhindert die Ascorbat-abhängige Inaktivierung, da Ethanol als Substrat für Compound I und II gilt. Ob die hier beobachtete Hemmung der Rinderleberkatalase auf eine vermehrte Compound II-Bildung zurückzuführen ist, konnte in diesem Versuch nicht ermittelt werden. Aus Blättern isolierte Roggenkatalase und rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* wurden nicht durch Ascorbat gehemmt. Im Gegensatz dazu wurde die rekombinante Katalase von *Secale cereale* schon nach 2,5 h um 50% seiner Ausgangsaktivität gehemmt (Abb. 25). Vergleicht man die beiden rekombinanten Katalasen miteinander, ist zu sehen, dass die rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* stabiler gegen eine Hemmung

durch Ascorbat ist, als das rekombinante Enzym von *Secale cereale*. Auf die Katalase in *Homogyne*-Blättern ist diese erhöhte Ascorbat-Toleranz jedoch nicht übertragbar, da die rekombinante Katalase von *Secale cereale* und die aus Roggenblättern isolierte Katalase unterschiedliche Empfindlichkeiten gegen Ascorbat zeigen.

3.5.4. Vergleich der peroxidatischen Aktivitäten

Wie in der Einleitung bereits näher beschrieben, können Katalase neben ihrer klassischen katalatischen Aktivität ebenfalls peroxidatisch wirksam sein: Im Reaktionszyklus werden Katalasen durch ihr Substrat Wasserstoffperoxid zu Compound I oxidiert, welches dann wiederum durch Wasserstoffperoxid zu Katalase zurück reduziert wird (Abb. 2). Bei niedrigen Substratkonzentrationen kann die Reduktion von Compound I durch ein peroxidatisches Substrat, z. B. Ethanol erfolgen (Gleichung 12; Deisseroth und Dounce, 1970; Sichak und Dounce, 1986; Scandalios, 1994). Bei Rinderleberkatalase ist eine messbare peroxidatische Aktivität bei einer kontinuierlichen H_2O_2 -Produktion von 10-70 $\mu\text{mol/l} \times \text{min}$ messbar (Sichak und Dounce, 1986). Die peroxidatische Aktivität ist bei pflanzlichen Katalasen gering. Jedoch ist bekannt, dass Tabak, Gerste und Mais Katalase-Isoenzyme mit erhöhter peroxidatischer Aktivität besitzen (Havir und McHale, 1989). Um festzustellen, ob die lichtstabile *Homogyne*-Katalase ebenfalls eine erhöhte peroxidatische Aktivität besitzt, wurde diese bestimmt und mit den ermittelten peroxidatischen Aktivitäten von aus Blättern isolierter Roggenkatalase, rekombinanter Katalase von *Secale cereale* und Rinderleberkatalase verglichen (Tab. 9). Da nur Compound I Ethanol als peroxidatisches Substrat nutzen kann, musste die Bestimmung der peroxidatischen Aktivität von Katalasen in einem schwach H_2O_2 -generierenden System (zur Bildung von Compound I) stattfinden. Die Oxidation von Ethanol zu Ethanal wurde indirekt durch Reduktion von NAD^+ bestimmt (Kap. 2.8.2.). Da die peroxidatische Aktivität von der H_2O_2 -Konzentration abhängig ist, wurde die H_2O_2 -Syntheserate ermittelt, bei der die maximale peroxidatische Aktivität messbar ist. Daher wurden bei den Katalasen von *Secale cereale* (Blatt und rekombinant) und Rinderleber die Rate der NADH-Bildung (als Maß für Ethanoloxidation) in Abhängigkeit von unterschiedlichen H_2O_2 -Syntheseraten bestimmt (Abb. 26).

Es ist bei allen Katalasen eine peroxidatische Aktivität erkennbar. Bei Rinderleberkatalase ist sie bis zu einer H_2O_2 -Bildungsrate von 160 $\mu\text{M}/\text{min}$ relativ konstant (Abb. 26 b). Aus Blättern isolierte Roggenkatalase hat eine maximale peroxidatische Aktivität von 1,3 μM NADH/min bei einer H_2O_2 -Syntheserate von 89,9 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Abb. 26 a). Im Gegensatz dazu ist die

**Abbildung 26:**

Abhängigkeit der NAD⁺-Reduktion als Maß der Ethanoloxidation von der jeweiligen H₂O₂-Bildungsrate. Durch Gabe unterschiedlicher Mengen von Glucose-Oxidase wurden H₂O₂-Konzentrationen zwischen 2,17 µM/min und 160 µM/min erzeugt und die peroxidatischen Aktivitäten von a) Blattkatalase *Secale cereale*, b) Rinderleberkatalase und c) rekombinante Katalase von *Secale cereale* bestimmt. Es wurden jeweils 1 µkat/ml Katalase in die Versuchsansätze eingesetzt.

peroxidatische Aktivität von rekombinanter Roggenkatalase (mit einem Maximum von 42,4 µM NADH/min bei einer H₂O₂-Syntheserate von 89,9 µM/min, Abb. 26 c) signifikant erhöht. Um auszuschließen, dass aus Sf9-Zellen stammenden Restproteine die peroxidatische Aktivität der rekombinanten Katalasen stimuliert, wurde in Kontrollansätzen die Hintergrundaktivität ermittelt und bei der Auswertung berücksichtigt. Als Kontrollansätze dienten Extrakte von nicht infizierten Sf9-Zellen, welche parallel zu den jeweiligen Ansätzen gereinigt wurden. Die Sf9-Extrakte wurden in den gleichen Volumina, wie die katalasehaltigen Extrakte, in den Test eingesetzt. Da sowohl rekombinante, als auch aus Blättern isolierte Roggenkatalase eine maximale peroxidatische Aktivität bei einer H₂O₂-Syntheserate von 89 µM/min hatten, wurden diese Bedingungen für den Versuch verwendet. Es wurden die peroxidatischen Aktivitäten der rekombinanten Katalasen von *Secale cereale*, *Homogyne alpina*, gereinigter Roggenblattkatalase und Rinderleberkatalase ermittelt. In Tabelle 9 sind die peroxidatischen Aktivitäten der verschiedenen Katalasen in µkat/l (Reduktion NAD⁺ in µmol /l x s) und in Prozent der Gesamtaktivität dargestellt. Die Katalase-Gesamtaktivität der Ansätze betrug entweder 0,1 µkat/ml oder 1 µkat/ml.

Die peroxidatische Aktivität von Rinderleber betrug 0,012% der Gesamtaktivität. Im Vergleich dazu war die peroxidatische Aktivität von aus Blättern isolierter Roggenkatalase um den Faktor 6 geringer, daher gehört sie nicht zu den von Havir und McHale (1989) beobachteten Katalase-Isoformen mit einer erhöhten peroxidatischen Aktivität. Bei den rekombinanten Katalasen blieb jedoch auch nach Abzug der Hintergrundaktivität die peroxidatische Aktivität von 0,072% bei *Secale cereale* und 0,038% bei *Homogyne alpina*, im Vergleich mit der peroxidatischen Aktivität von Rinderleberkatalase, auffällig hoch. Die rekombinante Katalase von *Secale cereale* zeigte eine 36,5fach höhere peroxidatische Aktivität als die aus Roggenblättern isolierte Katalase. Dies erhöhte peroxidatische Aktivität

der rekombinanten Katalasen könnte auf unterschiedliche Modifikationen während der heterologen Expression zurückzuführen sein. Dies müsste jedoch noch genauer geprüft werden.

Probe	peroxidatische Aktivität ($\mu\text{kat/l}$)		peroxidatische Aktivität (%)		Mittelwert peroxidatische Aktivität (%)
	0,1 $\mu\text{kat/ml}$ Katalase	1 $\mu\text{kat/ml}$ Katalase	100%: 100 $\mu\text{kat/l}$ Katalase	100%:1000 $\mu\text{kat/l}$ Katalase	
Rinderleber	0,013	0,11	0,013	0,011	0,012 \pm 0,0005
<i>S. cereale</i> , Blatt	0	0,022	0	0,002	0,002 \pm 0,0003
<i>S. cereale</i> , rekombinant	0,083	0,7	0,083	0,07	0,077
Kontrolle: Vol. <i>S. cereale</i> (Sf9)	0,006	0,02	0,006	0,002	0,004
Korrigiert: <i>S.</i> <i>cereale</i> , rekomb.	0,077	0,68	0,077	0,068	0,072 \pm 0,0045
<i>H. alpina</i> rekombinant	0,054	nicht bestimmt	0,054	nicht bestimmt	0,054
Kontrolle: Vol. <i>H. alpina</i> (Sf9)	0,0154	nicht bestimmt	0,0154	nicht bestimmt	0,0154
Korrigiert: <i>H.</i> <i>alpina</i> , rekomb.	0,038	nicht bestimmt	0,038	nicht bestimmt	0,038 \pm 0,0029

Tabelle 9:

Peroxidatische Aktivität von Rinderleberkatalase, Roggenblattkatalase und den rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*. Dargestellt ist die NADH-Enstehung in $\mu\text{kat/l}$ als Maß für die Oxidation von Ethanol. Der prozentualer Anteil der peroxidatischen Aktivität wurde anhand der eingesetzten Katalaseaktivität berechnet, als Kontrolle der rekombinanten Katalasen dienten entsprechende Volumina von nicht infizierten *Spodoptera frugiperda* Extrakten.

Die rekombinante lichtstabile Katalase von *Homogyne alpina* zeigt jedoch im Vergleich zur rekombinanten lichtsensiblen Roggenkatalase keine erhöhte peroxidatische Aktivität. Daher korreliert die Lichtstabilität nicht mit einer Erhöhung der peroxidatischen Aktivität. Aufgrund der Diskrepanz zwischen rekombinanter und aus Blättern isolierter Roggenkatalase können keine Aussagen über die peroxidatische Aktivität der *Homogyne*-Katalase im intakten Blatt getroffen werden.

Zusammenfassend ergeben sich aus den in Kap. 3.5. dargestellten Ergebnissen folgende Aussagen:

- a) Die spezifische Aktivität und die daraus resultierende Wechselzahl von rekombinanter *Homogyne alpina*-Katalase ist im Vergleich zu rekombinanter Roggenkatalase um den Faktor 6,2 reduziert.
- b) Bezüglich ihres K_m -Wertes unterscheidet sich die rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* nicht von den K_m -Werten der pflanzlichen rekombinanten Katalasen von *Secale cereale*, *Soldanella alpina* und Rinderleberkatalase.
- c) Die rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* ist gegenüber der eingesetzten Katalaseinhibitoren (3-Amino-1,2,4-triazol, KCN und NaN_3) ähnlich empfindlich wie rekombinante Roggenkatalase. Rekombinante *Homogyne*-Katalase ist, im Gegensatz zu rekombinanter Roggenkatalase nicht durch Ascorbat hemmbar. Da aus Blättern isolierte Roggenkatalase ebenfalls unempfindlich gegen Ascorbat ist, können keine Erkenntnisse auf die Hemmbarkeit der *Homogyne*-Katalase durch Ascorbat in Blättern übertragen werden.
- d) Die rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* besitzen beide im Vergleich zu aus Blättern isolierter Roggenkatalase und Rinderleberkatalase eine erhöhte peroxidatische Aktivität. Daher korreliert die Lichtstabilität der rekombinanten *Homogyne*-Katalase nicht mit einer Erhöhung der peroxidatischen Aktivität.

3. 6. Vergleich der rekombinanten Katalase von *Homogyne alpina* mit Katalasen von *Helianthus annuus*

Homogyne alpina ist nicht die einzige Pflanze, welche eine lichtstabile Katalase im Blatt besitzt. In Blättern der Sonnenblume kommen ebenfalls Katalase-Isoformen mit erhöhter Lichtstabilität vor. Grotjohann et al. isolierten 1997 sieben Katalase-Isoformen aus Sonnenblumenkotyledonen. Sie zeigten, dass CATA6 bis CATA8 eine höhere Lichtinaktivierungskonstante als CATA2 bis CATA5 haben und demnach lichtempfindlicher sind. Die lichtsensiblen Katalase-Isoformen bestehen aus vier 55 kDa Untereinheiten, während CATA2 bis CATA5 aus Untereinheiten mit einer Größe von 55 kDa und 59k Da bestehen. Die lichtstabilen Eigenschaften werden den 59 kDa Untereinheiten zugeschrieben.

Um zu überprüfen, wie homolog Katalase-Primärstrukturen von Sonnenblume im Vergleich zur lichtstabilen Katalase von *Homogyne alpina* ist, wurde ein erneuter Vergleich unter Berücksichtigung der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Katalase-cDNAs *cata1* und *cata3* von *Helianthus annuus* durchgeführt (Abb. 27). *Helianthus annuus* besitzt vier verschiedene Katalasegene, *cata1* bis *cata4* (EMBL-EBI Datenbank, Acc. Nr: *cata1*: L28740, *cata2*: AF243517, *cata3*: AF243518, *cata4*: AF243519). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *cata2* und *cata4* sind sehr homolog zu CATA1 und CATA3 (Homologie jeweils zwischen CATA1 und CATA2 bzw. CATA3 und CATA4, Tabelle 10), daher wurden CATA2 und CATA4 im Sequenzvergleich nicht berücksichtigt.

Folgende andere Katalase-Sequenzen wurden in den Vergleich miteinbezogen:

Dikotyle Pflanzen:	CAT-1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT-1 <i>Cucurbita pepo</i>
	CAT-1 <i>Ipomoea batata</i>	CAT-1 <i>Phaseolus aureus</i>
	CAT-1 <i>Ricinus communis</i>	CAT-1 <i>Soldanella alpina</i>
Monkotyle Pflanzen:	CAT-1 <i>Secale cereale</i>	CAT-3 <i>Zea mays</i>
Tierisch:	CAT <i>Bos tauris</i>	

Alle eingesetzten Katalase-Aminosäuresequenzen stammen von der EMBL-EBI-Datenbank und der Swiss.Prot.-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk> und <http://us.expasy.org>), und sind unter den folgenden Acc. Nr. registriert: CAT-1 *Homogyne alpina*: Q70875, CATA1 *Helianthus annuus*: P45739, CATA3 *Helianthus annuus*: Q9M503, CAT-1 *Arabidopsis thaliana*: Q96528, CAT-1 *Cucurbita pepo*: P48350, CAT-1 *Ipomoea batata*: P07145, CAT-1 *Phaseolus aureus*: P32290, CAT-1 *Ricinus communis*: Q01297, CAT-1 *Soldanella alpina*: O24339, CAT-1 *Secale cereale*: P55310, CAT-3 *Zea mays*: P18123 und CAT *Bos tauris*: P00432. Der Vergleich selbst wurde mit Hilfe des Computerprogramms Omega 1.1 durchgeführt. Die nicht im Vergleich berücksichtigten Aminosäuresequenzen CATA2 und CATA4 von *Helianthus annuus* sind bei den EMBL-EBI- und Swiss.Prot.-Datenbanken unter Q9M504 (CATA2) und Q9M502 (CATA4) registriert.

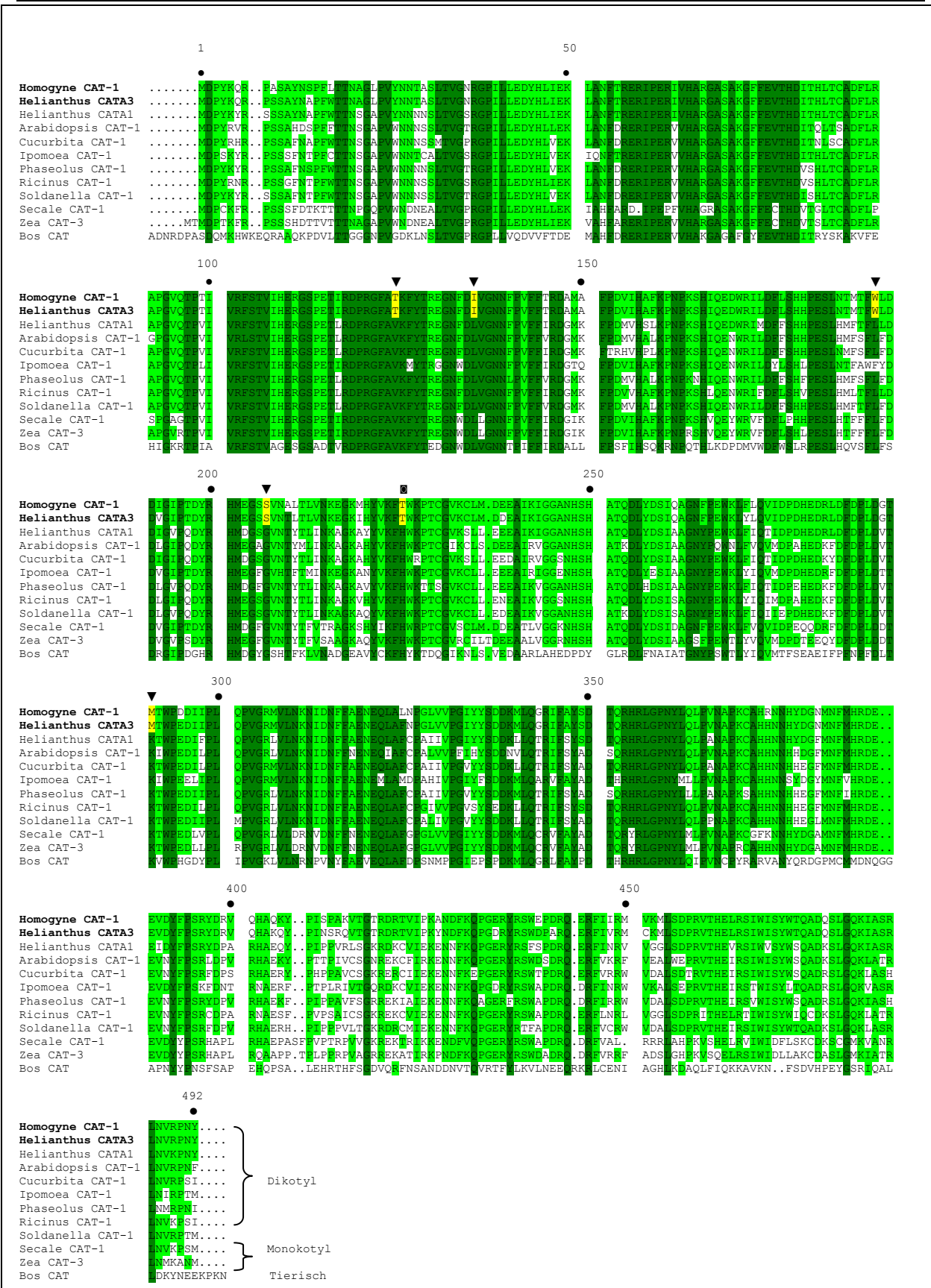


Abbildung 27: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *cat1* von *Homogyne alpina*, sowie CATA1 und CATA3 von *Helianthus annuus* mit Katalasesequenzen anderer Organismen. Bereiche in hellgrün markieren Homologien innerhalb der miteinbezogenen pflanzlichen Katalasen, dunkelgrüne Bereiche repräsentieren Homologien innerhalb der dargestellten pflanzlichen und tierischen Katalasen. Gelb markiert sind Substitutionen, bei denen zwischen ähnlich (▼) und auffällig (■) differenziert wird.

Die 6 auffälligen Aminosäuresubstitutionen bei *Homogyne alpina* CAT-1 an den Positionen Val124Thr, Leu135Ile, Leu189Trp, Gly206Ser, His225Thr und Lys291Met in hochkonservierten Regionen sind bei CATA3 von *Helianthus annuus* ebenso zu finden. CATA1 von Sonnenblumen besitzt diese Veränderungen nicht. Weiterhin ist die Sequenz von CATA3 zu 95% identisch mit CAT-1 von *Homogyne alpina*, während die Identität zwischen CATA-1 und CATA3 von *Helianthus annuus* lediglich 81% beträgt (Tabelle 10).

Verglichene Katalasen	<i>H. annuus</i> CATA1/ <i>H. annuus</i> CATA2	<i>H. annuus</i> CATA3/ <i>H. annuus</i> CATA4	<i>H. annuus</i> CATA1/ <i>H. annuus</i> CATA3	<i>H. alpina</i> CAT-1/ <i>H. annuus</i> CATA3	<i>H. alpina</i> CAT-1/ <i>S. alpina</i> CAT-1
Identität (%)	91	97	81	95	79

Tabelle 10:

Darstellung des Vergleichs der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von jeweils zwei pflanzlichen Katalasen. Verglichen wurden die Katalasen von *Helianthus annuus* untereinander, sowie CAT-1 von *Homogyne alpina* mit CATA3 von *Helianthus annuus* bzw. CAT-1 von *Soldanella alpina*. Angegeben ist die Identität in %.

Um zu verifizieren, dass die 6 auffälligen Aminosäuresubstitutionen mit einer gesteigerten Lichtstabilität in direktem Zusammenhang stehen, sollte die *cata3*-cDNA von *Helianthus annuus* ebenfalls im Baculovirussystem heterolog exprimiert und das rekombinante Enzym auf Lichtstabilität untersucht werden. Daher wurde die *cata3*-cDNA von Dr. M. Schmidt (Universität Frankfurt) aus einer cDNA-Bank isoliert. Zur Herstellung rekombinanter *Autographa californica* Viren-DNA wurde die cDNA in die *EcoRI*-Schnittstelle des Baculovirus-Vektors pVL1392 kloniert. Nach Transfektion in SF9-Zellen wurde Gesamt-

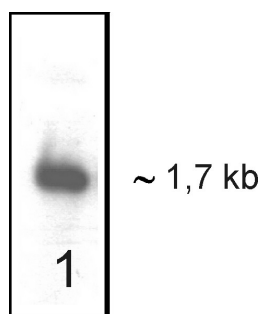


Abbildung 28:

Ausschnitt eines Southern Blot von mit *EcoRI* verdauter Gesamt-DNA aus Sf9-Zellen nach Infektion mit *Accata3pVL1392* von *Helianthus annuus*. Hybridisiert wurde mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde gegen *cata3* von *Helianthus annuus*.

DNA isoliert und ein Southern Blot durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Virus die Katalase-cDNA über homologe Rekombination integriert hatte (Abb. 28). Das Signal nach Hybridisierung des Southern Blots mit einer spezifischen, DIG-markierten Sonde gegen *cata3* von Sonnenblume lag nach *EcoRI*-Verdau der Gesamt-DNA bei der erwarteten Größe von 1,7 kb. Zur Herstellung von rekombinanten Sonnenblumen-Katalase wurden *Spodoptera frugiperda*-Zellen mit dem rekombinanten Virus infiziert und nach externer Hämgabe konnte das Protein aus den Zellen extrahiert werden. Nach partieller Reinigung der Katalase über Sephadex G-25, Sephacryl S 300 HR und IMAC wurden

Katalaseaktivitätstests, sowie Western Blots durchgeführt. Da gegen rekombinante Katalase von *Helianthus annuus* kein spezifischer Antikörper vorlag, wurden die vorhandenen Antikörper gegen Blattkatalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* auf Kreuzreaktion überprüft. Als Referenz dienten rekombinante Katalasen von Roggen und *Homogyne alpina*, sowie aus Blättern isolierte Katalase von *Helianthus annuus* (Abb. 29).

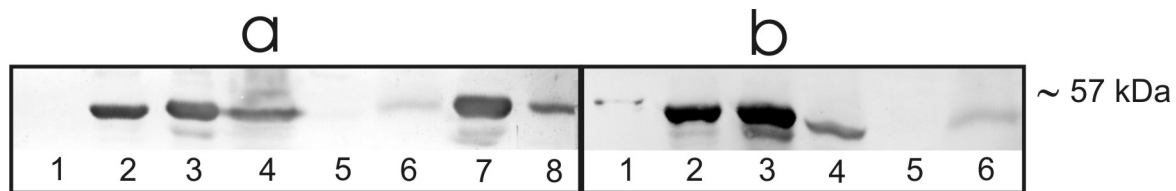


Abbildung 29:

Western Blot von Katalaseextrakten, Detektion mit a) einem spezifischem Antikörper gegen rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* und b) einem spezifischem Antikörper gegen Blattkatalase von *Secale cereale*.

Spur 1: Kontrolle: Rekombinante Katalase von *Secale cereale*

Spur 2: Partiiell gereinigte rekombinante CATA-3 von *Helianthus annuus*

Spur 3: Aus Sonnenblumenblättern isolierte Core-Katalase

Spur 4: Kontrolle: Rekombinante Katalase von *Homogyne alpina*

Spur 5: Kontrolle: Rohextrakt von *Spodoptera frugiperda*-Zellen

Spur 6: Aus Sonnenblumenblättern isolierte Matrixkatalase

Spur 7: Mischansatz aus rekombinanter und isolierter Core-Katalase von *Helianthus annuus*

Spur 8: Mischansatz aus rekombinanter und isolierter Matrixkatalase von *Helianthus annuus*.

Als Marker (57kDa) diente die bekannte Größe der Untereinheit von Roggenkatalase (b, Spur 1).

Das rekombinante CATA3 Protein von *Helianthus annuus* reagierte, genau wie die aus Sonnenblumenblättern isolierte Katalase, mit beiden getesteten Antikörpern (Abb. 29). In Sonnenblumenperoxisomen liegen die Katalase-Isoenzyme sowohl als lösliches Matrixprotein, als auch als semikristalline Struktur, sogenannten Cores, vor (Tenberge und Eising, 1995). Die Corekatalase besteht aus Untereinheiten verschiedener Größe, 55kDa und 59kDa, während die Matrixkatalase lediglich 55kDa Untereinheiten besitzt (Kleff et al., 1997). Um diesen Größenunterschied nachzuweisen, wurden Mischansätze von rekombinanter CATA3 und Core-Katalase bzw. Matrixkatalase ebenfalls für den Western Blot eingesetzt (Abb. 29 a). Die Größe der nachgewiesenen Sonnenblumenkatalase-Untereinheiten liegt jedoch unter 57kDa, der bekannten Größe der Untereinheit von Roggenkatalase (vergl. Abb. 29 b, Spur 1). Selbst bei den Mischansätzen (Abb. 29 a, Spur 7 und 8) konnte nur die 55 kDa Katalaseuntereinheit nachgewiesen werden. Detektion der 59kDa-Untereinheit in den Mischansätzen mit spezifischem Antikörper gegen Roggenkatalase ergab ebenfalls kein Signal (nicht gezeigt).

Nach erfolgreicher heterologer Expression von *cata3* von *Helianthus annuus* wurde überprüft, ob die rekombinante Sonnenblumenkatalase, ebenso wie rekombinante *Homogyne*-Katalase,

im Starklicht stabil ist. Zum Vergleich wurde aus Sonnenblumenkotyledonen isolierte Core- und Matrixkatalase eingesetzt (Abb. 30).

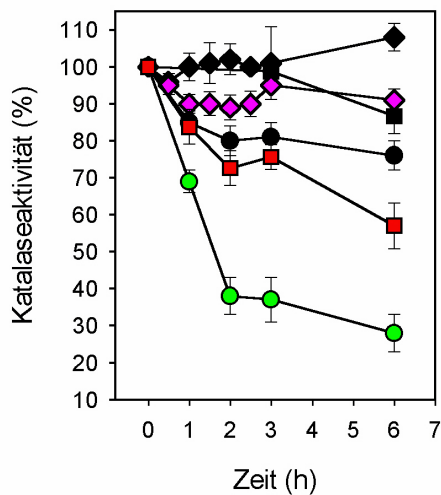


Abbildung 30:

Starklichtinkubation von in Insektenzellen heterolog exprimierte CATA3 von Sonnenblume (◇ rosa), sowie aus Sonnenblumenkotyledonen isolierte Corekatalase (□ rot) und Matrixkatalase (○ grün) nach Reinigung über Sephadex G-25 und Sephacryl S 300 HR und Konzentration über Zentrifugationssäulen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 6 h bei $800 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ PAR und 25°C . Die schwarzen Symbole repräsentieren die dazugehörigen Dunkelkontrollen. Es wurden jeweils $1 \mu\text{kat}/\text{ml}$ eingesetzt.

Die lösliche Matrixkatalase von *Helianthus annuus* war nach 6 h Starklichtbehandlung bis zu 70% inaktiviert. Im Vergleich dazu verlief die Inaktivierung der Core-Katalase verzögert, nach 6 h Starklicht war noch über 50% des eingesetzten Proteins aktiv. Die Cores weisen somit im Vergleich zur löslichen Matrixkatalase eine erhöhte Lichtstabilität gegen Photooxidation auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den von Grotjohann et al. (1997) veröffentlichten Ergebnissen, dass *Helianthus annuus* Katalasen mit erhöhter Lichtstabilität besitzt. Rekombinante CATA3 von *Helianthus annuus* war nach 6 h Starklichtbehandlung noch zu fast 100 % aktiv. Das rekombinante Enzym war also wesentlich lichtstabiler als die Corekatalase. Da Corekatalase als Heterotetramer aus lichtstabilen und lichtsensiblen Katalaseuntereinheiten vorliegt (Kleff et al., 1997), die rekombinante Katalase jedoch ein Homotetramer ist, zeigen diese Ergebnisse, dass *cata3* von Sonnenblume tatsächlich für eine lichtstabile Katalaseuntereinheit codiert. Die mit der Lichtstabilität in Zusammenhang gebrachte Größe von 59kDa (Grotjohann et al., 1997) konnte jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 29). Rekombinante CATA3 von *Helianthus annuus* ist in ihrer Lichtstabilität mit rekombinanter CAT-1 von *Homogyne alpina* (Abb. 17) vergleichbar.

Die erhöhte Stabilität im Starklicht der Katalase-Isoenzyme CATA2-CATA5 von *Helianthus annuus* werden den 59 kDa Untereinheiten zugeschrieben (Grotjohann et al., 1997). Kleff et al. (1997) postulieren, dass die 59 kDa Katalaseuntereinheiten ausschließlich in den Cores zu finden sind, während die 55 kDa Untereinheiten sowohl in den Cores, als auch in der Matrix lokalisiert sind. Daher ist die Core-Katalase von *Helianthus annuus* lichtstabiler als die Matrix-Katalase (Abb. 30, Eising et al., 1998). Da aus *Homogyne*-Blättern extrahierte

Katalase ebenfalls lichtstabil ist (Streb et al., 1997), sollte verglichen werden, ob die Katalase in *Homogyne alpina* Blattperoxisomen ebenfalls als Cores organisiert ist. Um zu überprüfen, ob die Rasterelektronenmikroskopie für diesen Nachweis geeignet ist, wurden zuerst rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierter Corekatalase von *Helianthus annuus* angefertigt (nicht gezeigt). Da diese Aufnahmen wenig aussagekräftig waren, musste auf die Transmissionselektronenmikroskopie zurückgegriffen werden.

Deshalb wurde in den oesterreichischen Alpen gesammeltes Blattmaterial fixiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert. Abbildung 31 zeigt eine TEM-Aufnahme eines *Homogyne alpina*-Blattquerschnittes mit einem Chloroplasten und den benachbarten Peroxisomen.

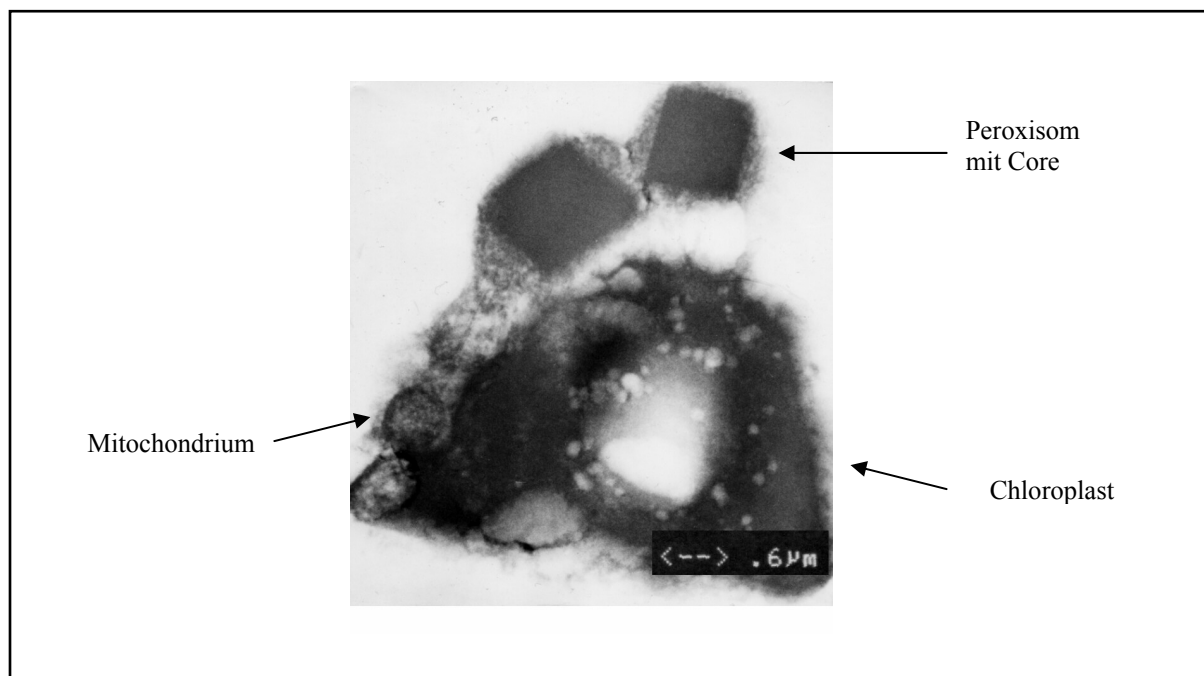


Abbildung 31:

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnittes einer Blattmesophyllzelle von *Homogyne alpina*. <--> entspricht einer Strecke von ca 0,6 µm.

In den Peroxisomen sind quadratische Blöcke mit einer Kantenlänge von ca. 0,6 – 1,2 µm zu erkennen. Sonnenblumencores werden als quadratische, würfelähnliche Blöcke mit einer Kantenlänge von 200-600 nm beschrieben, welche aus 20 nm großen Unterstrukturen bestehen (Heinze et al., 2000). Daher handelt es sich bei den in den *Homogyne*-Peroxisomen lokalisierten viereckigen Strukturen wahrscheinlich ebenfalls um Cores. Der Chloroplast ist in seiner Struktur diffus aufgelöst. Dies ist auf die Präparationsmethode zurückzuführen: Da in den österreichischen Alpen eine herkömmliche Fixierung mit OsO₄ aufgrund der örtlichen Gegebenheiten nicht möglich war (fehlendes Labor), mussten die Blattproben nach der

Vorfixierung entwässert transportiert werden, um nach Bewässerung der Proben im Labor fixiert und kontrastiert zu werden. Dadurch wurden feinere Zellstrukturen zerstört. Die Cores blieben jedoch erhalten. In *Homogyne alpina* Blattperoxisomen sind also, wie in Peroxisomen von *Helianthus annuus*, Cores vorhanden.

3. 7. In vitro Mutagenese und Starklichtbehandlung mutagenisierter Katalase von *Soldanella alpina*

Für die Lichtstabilität der *Homogyne*-Katalase können nur Sequenzveränderungen in Frage kommen, welche in stark konservierten Regionen bei den lichtempfindlichen Katalasen mono- und dikotyler Pflanzen und Rinderleberkatalase vorkommen. Die Primärstrukturen der lichtstabilen Katalasen von *Homogyne alpina* und *Helianthus annuus* besitzen in diesen Bereichen identische Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu anderen Katalasen (Abb. 27). Da für die Lichtinaktivierung von Katalasen die Oxidation eines Histidins postuliert wird (Nakatani, 1961), ist daher der Austausch von Histidin zu Threonin an Position 225 (Abb. 27) besonders interessant. Um zu überprüfen, ob diese Substitution mit der gesteigerten Lichtresistenz in direktem Zusammenhang steht, wurde über *in vitro* Mutagenese die cDNA der lichtsensitiven *cat1* von *Soldanella alpina* so verändert, dass nach Expression in der Aminosäuresequenz das Histidin₂₂₅ durch ein Threonin ersetzt wurde. Die *in vitro* Mutagenese wurde über PCR mit den in Abbildung 32 dargestellten spezifischen Primern durchgeführt. Die cDNA von *Soldanella alpina* wurde vor Beginn der *in vitro* Mutagenese von pVL1393 in die *EcoRI*-Schnittstelle eines kleineren Plasmids (pUC18) umkloniert, da dieses komplett mitamplifiziert werden sollte. Durch die Verwendung der spezifischen Primer wurde nicht nur die Katalasesequenz so verändert, dass die DNA-Sequenz statt für ein Histidin für ein Threonin codierte, es wurde gleichzeitig die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Eco72I* (CACGTG) miteingefügt. Nach Elution, Religation und Transformation des PCR-Produktes wurden die DNA-Klone isoliert und mit *Eco72I* verdaut um zu überprüfen, ob die *in vitro* Mutagenese funktioniert hat. Entstand dabei ein 692bp-Fragment war die *in vitro* Mutagenese erfolgreich, bei Linearisierung des Konstruktes nicht.

- Ursprünglicher Sequenzausschnitt von *Soldanella alpina cat1*:

5´SaCat1-GGA-AAA-GCT-CAA-TAT-GTT-AAG-TTC-CAT-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3´SaCat1
 G K A Q Y V K F **H** W K P T C G V
 Pos. 225

- PCR-Strategie:

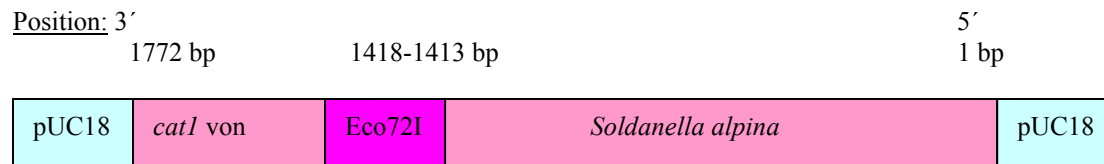
5´SaCat1-GGA-AAA-GCT-CAA-TAT-GTT-AAG-TTC-CAT-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3´SaCat1
 G K A Q Y V K F **H₂₂₅** W K P T C G V
 5´Primer
 3´Primer ↙

5´-Primer: 5´-CG-TGG-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3´
 3´-Primer: 5´-T -GAA-CTT-AAC-ATA-TTG-AGC-TTT-TC-3´

- Sequenz nach erfolgreicher Reamplifikation:

Eco72I
 5´SaCat1-GGA-AAA-GCT-CAA-TAT-GTT-AAG-TT**C-ACG-TGG**-AAA-CCT-ACA-TGT-GGA-GTG-3´SaCat1
 G K A Q Y V K F **T** W K P T C G V
 Pos. 225

- Erkennungssequenzen für *Eco72I* vor *in vitro* Mutagenese:



- Erkennungssequenzen für *Eco72I* nach *in vitro* Mutagenese:

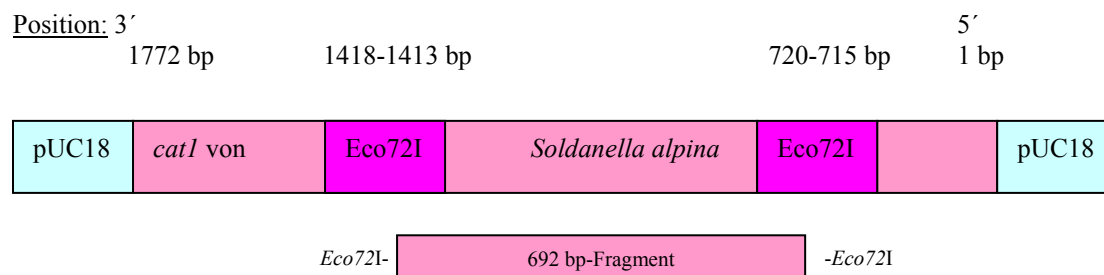


Abbildung 32:

PCR-Strategie und Sequenzausschnitte für die Herstellung einer mutagenisierten cDNA von *Soldanella alpina* zur Expression von CAT-1_{H225T} mit zusätzlicher *Eco72I* Erkennungssequenz.

Abbildung 33 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von *in vitro*-Mutagenese PCR-Ansätzen der Katalase-cDNA von *Soldanella alpina* nach *Eco72I*-Verdau. In Bahn 2 ist das durch den *Eco72I*-Verdau entstandene 692bp-Fragment zu erkennen, was zeigt, dass dort die *in vitro* Mutagenese erfolgreich verlief, da dieser Klon eine zusätzliche *Eco72I*-Schnittstelle besitzt. In Bahn 1 ist das Konstrukt lediglich linearisiert, dort ist die Katalase-cDNA nicht mutagenisiert und hat nur einen *Eco72I*-Schnitt.

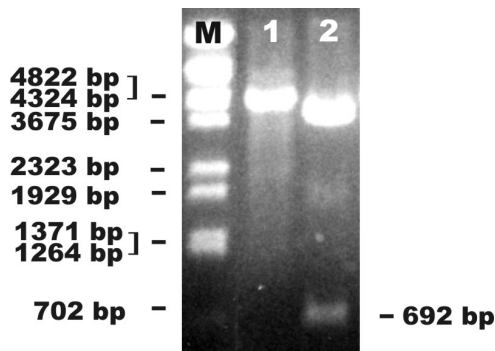


Abbildung 33:

Gelelektrophoretische Auftrennung von *in vitro* Mutagenese PCR-Ansätzen der Katalase cDNA von *Soldanella alpina* in pUC 18 nach Religation, Transformation in *E. coli*-Bakterien, Isolierung und *Eco72I*-Verdau.

M: Marker, λ -DNA mit *BstEII* verdaut

Bahn 1: linearisiertes Konstrukt ohne zusätzliche *Eco72I*-Schnittstelle (Negativ-Klon)

Bahn 2: 692 bp-Fragment der Katalase cDNA als Indikator für eine erfolgreiche *in vitro*-Mutagenese. (Positiv-Klon).

Nach dieser vorläufiger Identifizierung des positiven cDNA-Klons wurde dieser in die *EcoRI*-Schnittstelle des Baculovirus-Vektors pVL1392 kloniert und zur endgültigen Identifizierung sequenziert.

Nach Transfektion der *Spodoptera frugiperda*-Insektzellen zur Herstellung rekombinanter *Autographa californica catI_{H225T}*-Viren-DNA wurde Gesamt-DNA isoliert, mit *EcoRI* verdaut, ein Southern Blot durchgeführt und mit einer spezifischen Sonde gegen *catI* von *Soldanella alpina* hybridisiert (Abb. 34). Das zu erwartende 1,7 kb große DNA-Fragment (Spur 2) von *catI_{H225T}* von *Soldanella alpina* war erkennbar. Als Positivkontrolle diente Gesamt-DNA aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen, welche vorher mit rekombinanter *Soldanella alpina catI*-Viren-DNA infiziert wurden (Spur 1). Nach Identifikation des rekombinanten

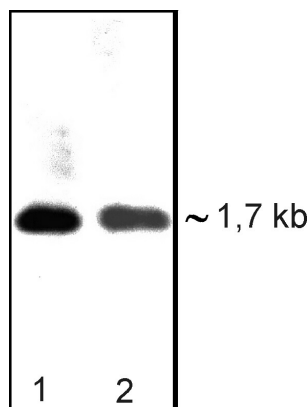


Abbildung 34:

Southern Blot von rekombinanter mit *EcoRI* verdauter Gesamt-DNA aus Sf9-Zellen nach Infektion mit *AccatI_{H225T}*-pVL1392 von *Soldanella alpina*. Hybridisiert wurde mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde gegen *catI* von *Soldanella alpina* (Bahn 2). Als Kontrolle diente mit *EcoRI* verdauter Gesamt-DNA von *Spodoptera frugiperda*-Zellen nach Infektion mit rekombinanter *Soldanella alpina catI*-Viren-DNA (Bahn 1).

Virus wurden Sf9-Zellen damit infiziert und die mutagenisierte Katalase nach zusätzlicher Hämgabe extrahiert und gereinigt. Mit dem gereinigten Protein wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 35). Als Kontrollen dienten gereinigte rekombinante Katalasen von

Secale cereale (Spur 3) und *Soldanella alpina* (Spur 1). Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Roggenblattkatalase. Die mutagenisierte *Soldanella*-Katalase (Bahn 2) weist im SDS-Gel wie die nicht-mutagenisierte Katalase (Bahn 1) eine apparent kleinere Größe als die Roggenkatalase (Bahn 3) auf. Weiterhin ist trotz gleicher Zellzahl der beiden *Soldanella alpina*-Infektionsansätze und gleicher Volumina bei der Extraktion weniger mutagenisierte als nicht mutagenisierte Katalase nachweisbar. Daher scheint die mutagenisierte *Soldanella*-Katalase schlechter exprimiert zu werden, als die nicht mutagenisierter Katalase.

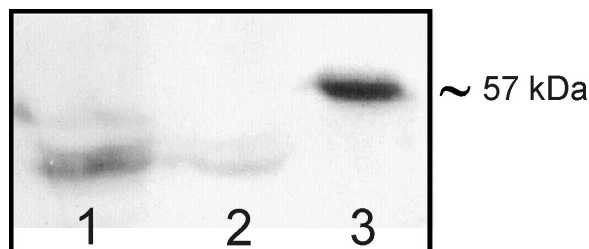


Abbildung 35:

Western Blot von gereinigter rekombinanter Katalase von *Soldanella alpina* (Spur 1), mutagenisierter Katalase von *Soldanella alpina*_{H225T} (Spur 2) und rekombinanter Roggenkatalase als Positivkontrolle und Marker (Spur 3).

Um zu überprüfen, ob die Substitution des His an Position 225 durch ein Thr eine Auswirkung auf die Lichtempfindlichkeit der *Soldanella alpina*-Katalase hat, wurde diese im Starklicht inkubiert. Abbildung 36 zeigt die Auswirkungen von Starklicht auf die Katalaseaktivität von rekombinanter *Soldanella alpina* und *Soldanella alpina*_{H225T}-Katalase.

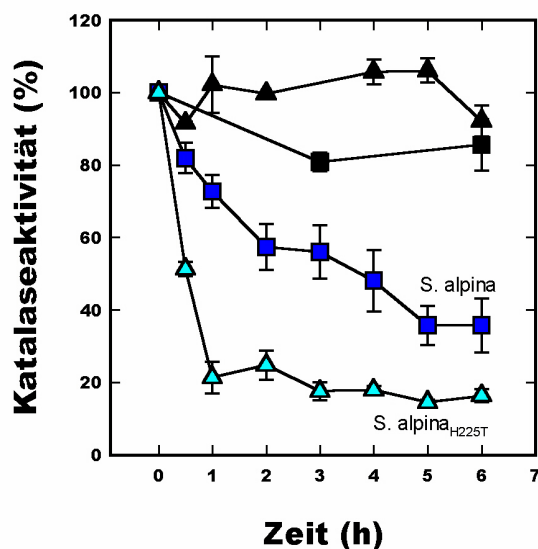


Abbildung 36:

Starklichtinkubation rekombinanter mutagenisierter (H_{225T} , Δ türkis) und nicht mutagenisierter (\square blau) Katalasen von *Soldanella alpina* bei $800 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ und 25°C . Die geschlossenen Symbole repräsentieren die Dunkelkontrollen. Aufgetragen ist die Katalaseaktivität in Prozent von der Ausgangsaktivität. Es wurden jeweils $1 \mu\text{kat}/\text{ml}$ eingesetzt.

Vergleicht man die Aktivitätsabnahme der rekombinanten Katalasen von *Soldanella alpina* und mutagenisierter *Soldanella alpina*_{H225T} unter Starklicht, so ist zu erkennen, dass die mutagenisierte Katalase eine andere Kinetik als die nicht mutagenisierte Katalase besitzt.

Schon innerhalb der ersten Stunde war die mutagenisierte Katalase von *Soldanella alpina*_{H225T} bis zu einem Prozentsatz von 20% inaktiviert wird. Nicht-mutagenisierte *Soldanella*-Katalase wurde dagegen langsamer und weniger durch Licht inaktiviert, nach einer Stunde besaß sie noch eine Restaktivität von über 70%. Nach sechs Stunden Starklichtinkubation war die Restaktivität der *Soldanella alpina*_{H225T}-Katalase nicht noch weiter herabgesetzt, die Katalase wurde also innerhalb der ersten Stunde schon maximal inaktiviert. Die nicht mutagenisierte Katalase verlor innerhalb der sechs Stunden kontinuierlich ihre Aktivität bis zu einer Restaktivität von 40%, war also nach sechs Stunden Starklichtinkubation immer noch um 20% stabiler, als die mutagenisierte Katalase nach 1 Stunde.

Die Substitution des Histidins an Position 225 durch ein Threonin erhöht demnach die Lichtstabilität der lichtsensiblen Katalase von *Soldanella alpina* nicht, sondern das Gegenteil ist der Fall. Durch die Aminosäuresubstitution wird die Lichtempfindlichkeit der Katalase in ihrem Zeitverlauf beschleunigt und in ihrer Intensität verstärkt. Dadurch wird deutlich, welche wichtige Rolle das Threonin an Position 225 während der Lichtinaktivierung einnimmt. Die durch die Threoninsubstitution an dieser Stelle erhoffte gesteigerte Lichttoleranz wurde zwar nicht erreicht, dennoch scheint dies ein kritischer Angriffspunkt der durch Licht verursachten Inaktivierung zu sein. Da nicht bekannt ist, wie das Threonin mit den anderen, in Abbildung 27 dargestellten Aminosäuresubstitutionen in Interaktion stehen, wäre es von Interesse, diese Zusammenhänge durch weitere *in vitro*-Mutagenese Studien zu überprüfen. Daraus könnten sich Rückschlüsse auf die Eigenschaft der Lichtstabilität der Katalase von *Homogyne alpina* und CATA3 von *Helianthus annuus* ergeben. Diese weiterführenden Studien würden jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

4. Diskussion

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist aus zahlreichen Untersuchungen an unterschiedlichen Organismen bekannt, dass Katalasen lichtempfindlich sind (Björn, 1969; Cheng und Packer, 1979; Tytler et al., 1984; Feierabend und Engel, 1986). Streb et al. (1997) stellten fest, dass die Katalase der Alpenpflanze *Homogyne alpina* während Starklichtinkubationen stabiler ist als die Katalasen anderer Alpenpflanzen oder die Katalase der Flachlandpflanze *Secale cereale* (Abb. 3). Nach Isolierung einer cDNA für eine Blattkatalase von *Homogyne alpina* durch Dr. M. Schmidt (Universität Frankfurt) war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, zu überprüfen, ob diese cDNA eine lichtstabile Katalase-Isoform codiert. Dazu wurde sie aktiv heterolog exprimiert und ihre Lichtstabilität untersucht. Weiterhin wurde das rekombinante Enzym von *Homogyne alpina* mit den ebenfalls heterolog exprimierten Katalasen der Alpenpflanze *Soldanella alpina* und der Flachlandpflanze *Secale cereale* strukturell und funktionell verglichen. Bei einem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Homogyne alpina* CAT-1 mit diversen anderen pflanzlichen Katalasen und Rinderleberkatalase (Abb. 27) sind 6 auffällige Aminosäuresubstitutionen in hochkonservierten Regionen an folgenden Positionen zu sehen: Val124Thr, Leu135Ile, Leu189Trp, Gly206Ser, His225Thr und Lys291Met. An diesen Positionen stimmen alle zum Vergleich herangezogenen überein, außer CATA3 von *Helianthus annuus*. Die Sequenz der Katalase 3 von Sonnenblume besitzt dagegen die gleichen sechs unterschiedlichen Aminosäuresubstitutionen in den konservierten Regionen wie CAT-1 von *Homogyne alpina*. Weiterhin ergab der Vergleich, dass die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Katalase von *Homogyne alpina* mit CATA3 von *Helianthus annuus* zu 95 % identisch ist, während die Übereinstimmung der Katalasesequenz von *Homogyne alpina* mit CAT-1 der Alpenpflanze *Soldanella alpina* nur 79% beträgt. Auffällig ist weiterhin, dass die im Vergleich eingesetzten Katalasen der Sonnenblumen nur zu 81% miteinander übereinstimmen (Tab. 10). Die Katalasesequenzen von *Homogyne alpina* CAT-1 und CATA3 von *Helianthus annuus* sind demnach sehr homolog zueinander. Da *Helianthus annuus* lichtstabile Katalase-Isoformen besitzt (Grotjohann et al., 1997) wurde die isolierte cDNA von CATA3 (zu Verfügung gestellt von Dr. M. Schmidt, Universität Frankfurt) ebenfalls aktiv exprimiert und auf Lichtinaktivierbarkeit untersucht.

Expressionsversuche aktiver pflanzlicher Katalasen in diversen Hefenstämmen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* waren erfolglos. Auch verschiedene Modifikationen an den cDNAs (3'-lokalierte PTS, 5'- oder 3'-lokalisierter His-Tag) und der Einsatz unterschiedlicher Vektoren und Promotoren führten zu keinem positiven Ergebnis (siehe Kap. 3.2.). Demzufolge erwiesen sich Hefen als nicht geeignet, pflanzliche Katalase funktionell zu exprimieren. Daraufhin wurde als Alternative das Baculovirussystem eingesetzt. Das Baculovirussystem ist als heterologes Expressionssystem ein etabliertes Verfahren (Goosen, 1993; Kost und Condreay, 1999). Es wird zur Expression einer großen Anzahl von Proteinen viralen, bakteriellen, pilzlichen, pflanzlichen, tierischen und menschlichen Ursprungs verwendet. (Übersicht in: Luckow und Summers, 1988; Luckow, 1991). Das Baculovirussystem ist in der Lage, exprimierte Proteine posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Glycosylierung, Acylierung, Phosphorylierung, Signal-Peptid-Abspaltung, Sekretion und Untereinheiten-Assemblierung zu unterziehen (Luckow, 1991). Dennoch hat auch das Baculovirussystem, wie alle anderen Expressionssysteme, seine Grenzen. Da die cDNA unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors erst im späten Infektionsstadium, wenn die Insektenzellen schon die ersten Abbauprozesse durchlaufen, exprimiert wird, kann eine Prozessierung des heterolog exprimierten Proteins unvollständig sein. Dadurch können biologisch inaktive Formen entstehen (Bishop, 1990), oder die Stabilität des rekombinanten kann Proteins herabgesetzt sein. Für Katalasen ist bekannt, dass eine korrekte Tetramerisierung des Enzyms für seine katalytische Tätigkeit und seine Stabilität eine wichtige Rolle spielt (Putnam et al., 2000). Instabile Katalasen, deren Apoprotein in inaktive Dimere mit reduziertem Häm-Gehalt dissoziieren, sind bei Patienten mit einem acatalasemischen Krankheitsbild („Swiss-type acatalasemia“) isoliert worden (Aebi et al., 1974). Eine Abweichung im Untereinheiten-Assemblierungsmuster könnte sich daher negativ auf die Katalasestabilität auswirken. Weiterhin sind bei in Baculovirus exprimierten Maus-Antikörpern unterschiedliche Glycosylierungsmuster der schweren Ketten im Vergleich zum nativen Antikörper beobachtet worden (Pulitz et al., 1990). Untersuchungen zur Glykosylierung pflanzlicher und rekombinanter Roggenkatalase ergaben, dass beide Formen nicht glykosyliert zu sein scheinen (E. Rüdiger, Universität Frankfurt, persönliche Mitteilung). Ebenfalls ungeklärt ist, ob eine Phosphorylierung dieser Katalasen vorliegt. Für menschliche Katalase wurde von Cao et al. (2003) eine Tyrosin-Phosphorylierung durch die Bindung der Tyrosin-Kinasen c-Abl und Arg an die Aminosäuren Pro₂₉₃PheAsnPro nachgewiesen. Unter vermehrtem oxidativem Stress wird die Phosphorylierung stimuliert, phosphoryliert werden hauptsächlich Tyr₂₃₁ und Tyr₃₈₆. Bei Rinderleberkatalase sind

sowohl die Bindungsdomäne (Pro₂₉₂PheAsnPro), als auch die beiden potentiell phosphorylierten Tyrosinreste (Tyr230 und Tyr385) vorhanden. Bei pflanzlichen Katalasen ist das Tyr231 (Abb. 27, Pos. 221) ebenfalls als hochkonservierte Aminosäure zu finden. Die Bindungsdomäne ist bei pflanzlichen Katalasen jedoch zu Asp₂₈₃PheAspPro abgewandelt, sowie das Tyr386 durch ein His, bzw. bei *Ipomoea* durch ein Ser (Pos. 376) ersetzt. Untersuchungen an isolierter Roggenkatalase ergaben nach Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosinreste keinerlei Hinweis auf eine Phosphorylierung (unveröffentlichte Ergebnisse). Da über Modifikationen der Blattkatalasen nichts bekannt ist, konnten im Vorfeld keine fundierten Aussagen über mögliche Unterschiede von im Baculovirussystem exprimierten Katalasen im Vergleich zu aus Blättern isolierten Katalasen gemacht werden. Daher wurde aus Roggenblättern isolierte Katalase ebenfalls in die funktionellen Vergleiche miteinbezogen.

Um rekombinante pflanzliche Katalasen zu erhalten, wurden die jeweiligen cDNAs von *Homogyne alpina cat1*, *Soldanella alpina cat1*, *Secale cereale cat1* und *Helianthus annuus cata3* in das Virengenom des Baculovirus *Autographa californica* integriert (Abb. 13 und 28). *Spodoptera frugiperda*-Zellen wurden mit rekombinantem Virus infiziert und die heterologe Expression der Katalaseuntereinheiten über Western-Blot-Analysen nachgewiesen (Abb. 16 und 29). Nach Reinigung der rekombinanten Katalasen wurden Aktivitätstests und Starklichtinkubationen durchgeführt (Abb. 17 und 30). Es zeigte sich, dass es gelungen war, die pflanzlichen Blattkatalasen-cDNAs von *Homogyne alpina*, *Soldanella alpina*, *Secale cereale* und *Helianthus annuus* funktionell in Insektenzellen zu exprimieren. Heterologe Expression funktioneller Katalasen gelang bisher bei Katalasen von *Saccharomyces cerevisiae* in der Hefe *Pichia* (Hansen und Roggenkamp 1989; Gellissen et al., 1996; Payne et al., 1997) und bei prokaryotischen Katalasen am Beispiel einer *Xanthomonas campestris*-Katalase in *E. coli* (Chauvatcharin et al., 2003). Eine transiente Expression funktioneller menschlicher Katalase nach jeweiliger Transfektion von humanen 293 Zellen gelang Cao et al. (2003). Über ein Expressionssystem, das in der Lage ist, pflanzliche Katalasen funktionell zu produzieren, war bisher nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass das Baculovirussystem als zuverlässiges und stabiles System zur reproduzierbaren heterologen Expression aktiver pflanzlicher Katalasen geeignet ist.

Um zu prüfen, ob die Katalase-cDNA von *Homogyne alpina* für eine lichtstabile Enzym codiert, wurden die gereinigten rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina*, *Soldanella alpina* und *Secale cereale* im Starklicht inkubiert (Abb. 17). Es zeigte sich, dass die

rekombinante Katalase von *Homogyne alpina*, im Gegensatz zu den rekombinanten Enzymen von *Soldanella alpina* und *Secale cereale*, gegen Starklichtinaktivierung *in vitro* nahezu resistent ist. Die rekombinanten Katalasen unterscheiden sich in ihrer Lichtempfindlichkeit nicht von den aus Blättern isolierten Katalasen (vgl. Abb. 3 und Abb. 17). Dies zeigt, dass *cat1* von *Homogyne alpina* eine lichtstabile Katalase codiert. Dadurch wurde in dieser Arbeit ergänzend zu früheren Untersuchungen von Streb et al. (1997) nachgewiesen, dass für die Lichtstabilität der *Homogyne*-Katalase deren Primärstruktur verantwortlich sein muss.

Lichtinkubationen von rekombinanter Katalase-3 von *Helianthus annuus* ergaben, dass die heterolog exprimierte CATA3 ebenso lichtstabil ist (Abb. 30), wie CAT1 von *Homogyne alpina* (vergl. Abb. 17). Auch im Vergleich zur aus Sonnenblumenkotyledonen isolierten Core- und Matrixkatalase ist CATA3 deutlich lichtunempfindlicher (Abb. 30). Die Corekatalase ist zwar lichtempfindlicher als rekombinante CATA3, jedoch deutlich stabiler als die Matrixkatalase. Diese erhöhte Stabilität der Corekatalase im Vergleich zur Matrixkatalase bestätigt die Ergebnisse von Eising et al (1998), die sie nach Inkubationen von Matrix- und Corekatalasen im Blaulicht erhielten: Die in Sonnenblumenkotyledonen vorkommenden Katalase-Cores besitzen eine höhere Stabilität gegen Photoinaktivierung als die Matrixkatalase. Zurückzuführen ist die erhöhte Lichtstabilität der Corekatalase auf ihre Zusammensetzung: Während die Matrixkatalase als Homotetramer aus lightsensiblen 55 kDa Untereinheiten vorliegt, besteht die Corekatalase als Heterotetramer aus 55 kDa und lichtstabileren 59 kDa Untereinheiten (Kleff et al., 1997). Da die rekombinante CATA3 von Sonnenblume nur als Homotetramer vorliegen kann, sollte sie wiederum im Vergleich zur Corekatalase erhöhte Beständigkeit im Starklicht zeigen, was in dieser Arbeit nachgewiesen wurde (Abb. 30). Die von Eising et al. (1990) beschriebene 59 kDa große Katalase-Untereinheit der Sonnenblume konnte jedoch nicht über Western Blot Analyse detektiert werden (Abb. 29). Weder bei rekombinanter CATA3, noch bei isolierter Corekatalase fand eine Antikörperreaktion bei einer apparenten Größe von 59 kDa statt. Auch nach Auftrennung der isolierten Core- und Matrixkatalase in einem SDS-Gel war eine große Katalase-Untereinheit nach Coomassie-Färbung nicht nachzuweisen (unveröffentlichte Daten). Fehlerhafte Prozessierungsvorgänge während der Expression der rekombinanten Katalase, die zu einer geringeren Größe der Untereinheit führen würden, können ebenfalls ausgeschlossen werden. In Sonnenblumenkotyledonen wird die 59 kDa Untereinheit nicht als Vorstufe der 55 kDa Untereinheit, sondern direkt in ihrer Endgröße zur Core-Bildung synthetisiert (Eising et al., 1990; Kleff et al., 1997). Eine zu geringe Proteinmenge für den Nachweis der 59 kDa großen Untereinheit ist ebenso auszuschließen. Zwar beträgt der Anteil der 59kDa-

Untereinheit am peroxisomalen Gesamtproteingehalt nur 5% (Kleff et al., 1997), es handelte sich bei dem eingesetzten Probenmaterial jedoch um hochkonzentrierte, isolierte Corekatalase und in Cores dominiert die große Untereinheit (Kleff et al., 1997, Eising et al., 1998). Demzufolge kann die fehlende Detektion der 59kDa großen Untereinheit wahrscheinlich nur auf die Verwendung unterschiedlicher SDS-PAGE-Systeme zurückzuführen sein.

Da sowohl *Homogyne alpina*, als auch *Helianthus annuus* lichtstabile Blattkatalasen besitzen, war es von Interesse zu überprüfen, ob in Blattperoxisomen von *Homogyne alpina* die Katalase ebenfalls als Cores organisiert ist. Ultrastrukturelle Untersuchungen von Sonnenblumen-Cores von Tenberge et al. (1997), sowie deren nähere Charakterisierung durch Heinze et al. (2000) ergaben, dass diese würfelförmige Blöcke mit einer Kantenlänge von 200-600 nm sind und aus 20 nm großen Einheiten bestehen. Transmissionselektronische Aufnahmen von *Homogyne alpina* Blattschnitten bestätigten das Vorkommen von quadratisch bis rechteckigen Strukturen dieser Größe in den Peroxisomen (Abb. 31). Aufgrund der besonders großen Homologie der Primärstrukturen der beiden lichtstabilen Katalasen (Tab. 10) ist es wahrscheinlich, dass CAT-1 von *Homogyne alpina* ebenfalls in den Cores der Blattperoxisomen lokalisiert ist. Diese These müsste jedoch über Immunogoldmarkierung an EM-Schnitten noch bestätigt werden. Das Vorkommen peroxisomaler Cores ist bei Pflanzen keine Seltenheit. So sind unter anderem auch bei Tabak (Frederick und Newcomb, 1969), rotem und grünem Pfeffer (Mateos et al, 2003), *Solanum tuberosum* (Tenberge et al., 1997), *Glycine max*, *Conyza bonariensis* (Vaughn, 1989) und *Parthenium argentatum* (Thomas und Trelease, 1981) Cores beobachtet worden. Betrachtet man die verwandtschaftlichen Verhältnisse (*Helianthus annuus*, *Homogyne alpina*, *Parthenium argentatum* und *Conyza bonariensis*: Asteraceae; *Nicotiana tabacum*, *Capsicum anuum* und *Solanum tuberosum*: Solanaceae) so scheint es, dass in einigen Pflanzenfamilien peroxisomale Cores gehäuft auftreten. Daher wäre auch zu prüfen, ob bei den Fabaceae neben *Glycine max* noch weitere Pflanzen mit peroxisomalen Cores zu finden sind. Eine generelle Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Cores und einer lichtstabilen Katalase ist jedoch offenbar nicht vorhanden. So besitzt z. B. *Nicotiana tabacum* zwar Cores, jedoch keine lichtstabile Katalase (F. Badenhop, Universität Frankfurt, persönliche Mitteilung). Weiterhin zeigten Eising et al. (1998), dass der Unterschied in der Stabilität von solubilisierter und intakter Corekatalase nach Starklichtinkubation marginal ist. Die erhöhte Starklichttoleranz der Sonnenblumen-Corekatalase beruht demnach auf ihren direkten molekularen Eigenschaften und ist nicht Folge ihrer supramolekularen Organisation als Cores.

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Frage, ob sich die lichtstabile Katalase in ihren funktionellen Eigenschaften von den lichtsensiblen Katalasen unterscheiden. Bekannt ist, dass die Lichtinaktivierung von Katalasen sowohl im Rot- als auch im Blaulicht ein sauerstoffabhängiger Prozess ist (Cheng et al., 1981). Dabei spielen, wie in der Einleitung bereits geschildert, ROS eine große Rolle. Da die Katalase während Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht selbst Superoxid produziert (Aubailly et al., 2000), sollte der Einfluss von Superoxid auf die rekombinanten pflanzlichen Katalasen näher untersucht werden. Dadurch sollte geprüft werden, ob die Starklichtinaktivierung über den gleichen Mechanismus erfolgt wie die Superoxid-vermittelte Inaktivierung. Weiterhin sollte der Einfluss von Superoxid auf die Katalaseaktivitäten von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* (rekombinant und aus Blättern isoliert) und Rinderleber miteinander verglichen werden, um zu untersuchen, ob eine gesteigerte Lichtstabilität mit einer erhöhten Stabilität gegen Superoxid korreliert. Rinderleberkatalase wird, wie in der Literatur beschrieben, durch Superoxid inaktiviert (Abb. 19). Der Inaktivierung liegt die Entstehung der inaktiven Katalaseintermediate Compound III und Compound II zu Grunde (Kono und Fridovich, 1982; Kirkman et al., 1999). Durch Zugabe der Substrate NADPH oder Ethanol wird diese Inaktivierung bei Rinderleberkatalase vermieden (Abb. 19). Beide peroxidatischen Substrate verhindern die Compound II-Bildung bzw. machen sie rückgängig (Cheng et al., 1981; Kono und Fridovich, 1982; Kirkman et al., 1987). Dadurch kann ebenfalls die Entstehung von Compound III vermieden werden, da der Bildung von Compound III das Katalaseintermediat Compound II vorausgehen kann (Fita und Rossmann, 1985). Die rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* sind sehr empfindlich gegen Superoxid, beide werden nach 3stündiger Inkubation fast vollständig inaktiviert (Abb. 19). Bei beiden rekombinanten Enzymen ist direkt beim Start des Versuchs ein rapider Aktivitätsverlust im Vergleich zur Kontrolle aufgetreten. Diese Beobachtung wurde von Kono und Fridovich (1982) an Rinderleberkatalase als „schnelle Katalaseinaktivierung“ beschrieben und dort auf die Entstehung von Compound III zurückgeführt. Eine fundierte Aussage über eine vermehrte Compound III-Bildung während der schnellen Hemmung von pflanzlichen Katalasen kann jedoch aufgrund des Versuchsaufbaus nicht gemacht werden. NADPH und Ethanol schützten das rekombinante Enzym von *Secale cereale* nicht vor Hemmung durch Superoxid (Abb. 19). Da, wie oben beschrieben, Compound II und Compound III durch NADPH und Ethanol vermieden werden, kann angenommen werden, dass die inaktiven Katalaseformen nicht den Aktivitätsverlust der rekombinanten Roggenkatalase verursachen. Bei rekombinanter Katalase von *Homogyne alpina* schützte NADPH ebenfalls nicht vor Superoxid. Ethanol schützt die *Homogyne-*

Katalase lediglich partiell vor Inaktivierung durch Superoxid; nach 3stündiger Inkubation war in den Ansätzen mit Ethanol 20% mehr Restaktivität, als in den Ansätzen ohne Ethanol. Der bei Rinderleberkatalase beobachtete vollständige Schutz durch Ethanol vor der typischen Superoxid-vermittelten Inaktivierung ist demzufolge bei den rekombinanten pflanzlichen Katalasen nicht gegeben. Daher scheint der Mechanismus, durch den die rekombinanten pflanzlichen Katalasen in diesem System inaktiviert werden, ein anderer zu sein, als es bei Rinderleberkatalase der Fall ist. Die Inaktivierung der rekombinanten Katalasen von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* beruht daher nicht auf einer spezifischen Hemmung durch O_2^- . Im Gegensatz zu den rekombinanten pflanzlichen Katalasen ist die aus Roggenblättern isolierte Katalase unempfindlich gegenüber dem Superoxid-Radikal. Die erhöhte Instabilität der rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* im Vergleich zur Roggenblattkatalase könnten auf eingangs geschilderte Modifikationen während der heterologen Expression im Baculovirussystem zurückzuführen sein. Daher können auch keine Aussagen über Stabilität oder Empfindlichkeit von Katalase aus *Homogyne alpina* Blättern gegenüber Superoxid gemacht werden. Da die rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* lichtstabil ist (Abb. 17), im Superoxid-generierenden System jedoch hochempfindlich ist (Abb. 19), kann postuliert werden, dass Superoxid während der Lichtinaktivierung keine zentrale Rolle einnehmen kann. Die Beobachtung, dass aus Roggenblättern isolierte Katalase zwar unempfindlich gegen O_2^- , im Licht jedoch sensibel ist (vergl. Abb. 3 und Abb. 19), untermauert diese These. Daher ist der Mechanismus, dem die Superoxid-Inaktivierung zu Grunde liegt, nicht mit dem Mechanismus, auf dem die Lichtinaktivierung beruht, vergleichbar. Eine Korrelation von erhöhter Lichtstabilität mit einer erhöhten Stabilität gegen Superoxid ist demzufolge ebenfalls nicht gegeben.

Ethanol oder NADPH schützen als peroxidatische Substrate tierische Katalasen (am Beispiel der Rinderleberkatalase) vor Superoxid-vermittelter Inaktivierung (Kono und Fridovich 1982, Kirkman et al., 1999). Obwohl die Lichtinaktivierung von Katalasen mit der typischen Superoxid-Inaktivierung von Katalasen nicht vergleichbar ist, wurde der Einfluss der Substrate Ethanol und NADPH auf die Lichtinaktivierung untersucht. Von Ethanol ist schon seit den frühen 80er Jahren bekannt, dass es vor Starklichtinaktivierung schützt (Cheng et al., 1981). Die Fähigkeit des Ethanols, Compound I wieder zu aktiver Katalase zu konvertieren (Abb. 2), und somit die Akkumulation des inaktiven Compound II zu verhindern, führt zu einer Stabilisierung des Enzyms im Starklicht (Cheng et al., 1981). Während der Belichtung von Rinderleberkatalase durch langwelliges UV-Licht verhindert Ethanol ebenfalls die Inaktivierung der Katalase (Aubailly et al., 2000). Diskutiert wird, ob Ethanol dabei das unter

Lichteinfluss entstandene Tyrosinradikal (siehe Kap. 1, Gleichung 15) zu einem intakten Tyrosinrest wiederherstellt, was zu einer Reoxidation des zentralen Eisens des Häm (von Fe^{II}) führen soll (Aubailly et al. 2000). Sowohl Rinderleberkatalase, als auch rekombinante Roggenkatalase und isolierte Blattkatalase von *Secale* werden durch Zugabe von 1% (v/v, $\approx 173,6$ mM) Ethanol vor Starklichtinaktivierung komplett geschützt (Abb. 18). Ob dieser Schutz durch eine schnelle Regeneration von Compound I zu aktiver Katalase, oder auf der erfolgreichen Wiederherstellung des Tyrosinrests beruht, kann aufgrund der Versuchsanordnung allerdings nicht festgestellt werden. Ob NADPH vor Photoinaktivierung der Katalasen schützt, wurde bisher im Zusammenhang mit Starklicht noch nicht untersucht. Bekannt ist, dass Rinderleberkatalase und menschliche Katalase NADPH spezifisch binden. Jedes Katalasetetramer bindet vier NADPH-Moleküle und diese Bindung hat keinerlei funktionelle Auswirkung auf die Enzymaktivität (Kirkman und Gaetani 1984; Putnam et al., 2000). Die Funktion des gebundene NADPH ist bisher nur im Zusammenhang mit Superoxid-vermittelter Inaktivierung aufgeklärt worden: NADPH schützt das Enzym, indem gebundenes NADPH zu NADP^+ oxidiert wird und durch ein neues, reduziertes NADPH ersetzt wird (Kirkman et al., 1987; 1999). Kontrovers diskutiert wird dabei, ob NADPH als 2-Elektronendonator mit einem Katalaseintermediat, welches bei der Compound II-Bildung entsteht, fungiert (Hillar, et al., 1994) oder als 1-Elektronendonator mit Compound II direkt interagiert (Almarsson et al., 1993). Abb. 18 zeigt, dass Rinderleberkatalase vor Inaktivierung im Starklicht durch NADPH partiell geschützt wird. Dieser Schutz könnte auf die spezifische NADPH-Bindung zurückzuführen sein. Roggenblattkatalase oder rekombinante Katalase von *Secale cereale* werden durch NADPH nicht vor Starklichtinaktivierung geschützt (Abb. 18). In der Literatur wurde kontrovers diskutiert, ob pflanzliche Katalasen ebenfalls in der Lage sind, NADPH spezifisch zu binden. Die Katalase der Kartoffel gilt als nicht NADPH-bindend (Beaumont et al., 1990). Von Durner und Klessig (1996) wurde dagegen postuliert, dass Tabak-Katalase in der Lage sei, NADPH zu binden. Die Bindung sei zwar schwächer als bei Rinderleberkatalase, dennoch sei sie über spezifische NADPH-Fluoreszenz messbar. Fluoreszenzmessungen von Rinderleberkatalase nach Inkubationen mit bzw. ohne NADPH ergaben, dass Rinderleberkatalase, wie in der Literatur beschrieben, in der Lage ist, spezifisch NADPH zu binden (Abb. 20). Parallelansätze von rekombinanter und nicht rekombinanter Roggenkatalase binden NADPH nicht (Abb. 21). Inkubationen rekombinanter *Homogyne alpina*-Katalase ergaben ebenfalls keine spezifische messbare NADPH-Bindung (Abb. 22). Die Kontrollansätze von *Homogyne alpina*-Katalase und aus Blättern isolierter Roggenkatalase ohne NADPH-Zusatz zeigten jedoch eine erhöhte Fluoreszenz (Abb. 21 und

22). Diese erhöhte Fluoreszenz ist bei *Homogyne alpina* nicht deckungsgleich mit dem Aktivitätsspektrum der Katalase. Demzufolge kann man die Fluoreszenz nicht auf eine spezifische NADPH-Bindung durch die Katalase zurückführen. Denkbar ist, dass bei der Reinigung des Enzyms mitgeschleppte Substanzen für diesen Effekt verantwortlich sind. Zusammenfassend ergab sich aus den Experimenten, dass die hier untersuchten pflanzlichen Katalasen nicht in der Lage sind, NADPH spezifisch zu binden und NADPH daher bei den untersuchten lichtsensiblen pflanzlichen Katalasen, im Gegensatz zur tierischen Katalase, auch nicht vor Photoinaktivierung schützt.

Während erhöhtem oxidativen Stress im Blatt werden die antioxidativen Schutzsysteme, wie die Katalase oder auch Ascorbat als Bestandteil des Ascorbat-Glutathion-Zyklus`vermehrt benötigt. Ascorbat in höheren Konzentrationen wirkt sich jedoch negativ auf die Katalaseaktivität aus. Untersuchungen an tierischen 3T6 Zellen stellten einen Zusammenhang zwischen der Ascorbatkonzentration und einem Aktivitätsverlust der Katalase fest. *In vivo* Studien an Meerschweinchen zeigten, dass sechs Stunden nach Fütterung der Meerschweinchen mit Ascorbat die Katalaseaktivität absinkt. Fütterungsversuche über einen längeren Zeitraum mit ascorbatreicher Diät hatte jedoch keinen Effekt auf die Katalase im Vergleich zu Kontrolltieren (Nemoto et al., 1997). Davison et al. untersuchten 1986 die Wirkung von Ascorbat, Sauerstoff und Kupfer auf die Aktivität von Rinderleberkatalase: Eine Inaktivierung des Enzyms durch Ascorbat fand ausschließlich in Anwesenheit von Sauerstoff statt. Da Ethanol die Inaktivierung verhindern bzw. rückgängig machen kann, wird diskutiert, ob die Entstehung von Compound II an der Katalaseinaktivierung durch Ascorbat beteiligt ist. Davison et al. (1986) postulieren, dass während der Inkubation durch Oxidation des Ascorbat durch Luftsauerstoff oder zugegebenes H_2O_2 Semidehydroascorbat entsteht. Das Semidehydroascorbat soll die katalaseinaktivierende Spezies sein und somit für die Entstehung von Compound II verantwortlich sein. Inkubationen von rekombinanter Katalase von *Homogyne alpina* oder aus Roggenblättern isolierter Katalase mit 2 mM Ascorbat führten nicht zu einem Aktivitätsverlust (Abb. 25). Rinderleberkatalase dagegen wurde durch Ascorbat inhibiert, ebenso das rekombinante Enzym von *Secale cereale*. Ob die durch Semidehydroascorbat geförderte Entstehung von Compound II dabei eine Rolle spielen, kann in diesem Versuch nicht ermittelt werden. Die rekombinante *Homogyne*-Katalase ist im Vergleich zur rekombinanten Roggenkatalase nicht durch Ascorbat hemmbar, ist also Ascorbat-toleranter. In photosynthetisch aktiven Blättern von Alpenpflanzen herrschen unterschiedliche Ascorbat-Konzentrationen, welche sich sowohl im Tagesgang ändern, als auch artspezifisch sind. So ändert sich der Ascorbatgehalt im Tagesgang bei der Alpenpflanze

Ranunculus glacialis an seinen natürlichen Standort von ~2 mM (morgens) auf < 0,4 mM (mittags). Artspezifische Unterschiede der Ascorbatkonzentrationen im Blatt bei gleichen Standortbedingungen sind z. B. bei *Ranunculus glacialis* (max Ascorbat-Konzentration: 2 mM) und *Soldanella alpina* (durchschnittliche Ascorbatkonzentration: 20 mM) zu beobachten (Streb et al., 1997). Daher wäre es denkbar, dass pflanzliche Katalasen unterschiedliche Ascorbat-Toleranzen besitzen. In *Homogyne*-Blättern ist der Ascorbatgehalt jedoch sehr niedrig, die durchschnittliche Ascorbatkonzentration beträgt im Tagesgang ca. 0,1 mM (Streb et al., 1997). Ob daher die Blätter von *Homogyne alpina* eine Ascorbat-tolerante Katalase besitzen, ist fraglich. Da rekombinante und aus Blättern isolierte Roggenkatalase unterschiedliche Ascorbat-Empfindlichkeiten besitzen (Abb. 25), kann man die erhöhte Ascorbat-Toleranz der rekombinanten *Homogyne*-Katalase nicht auf die Katalase in *Homogyne*-Blättern übertragen. Generell ist anhand der erhaltenen Ergebnisse zu sehen, dass sich die hier untersuchten pflanzlichen Katalasen, außer der rekombinanten *Secale*-Katalase, nicht durch Ascorbat einer Endkonzentration von 2 mM hemmen lassen. Die unterschiedlichen Ergebnisse, welche an aus Blättern isolierter Katalase und rekombinantes Enzym von Roggen erhalten wurden, können auf die im Eingangsgeschehen geschilderten Folgen der heterologen Expression im Baculovirussystem zurückgeführt werden.

Um die katalytischen Eigenschaften der lichtstabilen rekombinanten Katalase von *Homogyne alpina* mit denen der lichtsensiblen Katalasen zu vergleichen, wurden Inhibitorstudien durchgeführt, sowie die Michaelis-Menten-Konstanten und die peroxidatischen Aktivitäten bestimmt. In diesem Rahmen sollte untersucht werden, ob der Lichtstabilität der *Homogyne*-Katalase eine strukturelle Ursache, z.B. ein veränderter Substratzugang durch Modifikationen der Tertiärstruktur, zu Grunde liegt.

Für die Inhibitorstudien wurden die klassischen Katalasehemmstoffe 3-Amino-1,2,4-triazol, KCN und NaN_3 eingesetzt. Von Cyanid ist seit 1949 bekannt, dass es mit dem Reaktionszentrum interagiert und so die Katalaseaktivität inhibiert (Chance, 1949; Chance, 1949a). Die Katalasehemmung durch 3-Amino-1,2,4-triazol sowie der kompetitive Einfluss von Wasserstoffdonatoren auf diese Reaktion wurde von Margoliash und Mitarbeitern näher untersucht (Margoliash und Novegrotsky, 1958; Margoliash und Schejter, 1962). Die Wirkung von NaN_3 auf die Aktivität von Katalase wurde von Nicholls (1964) charakterisiert. Es existiert eine ganze Anzahl von Katalasen, welche als Aminotriazol-tolerant gelten. Die Katalasen von *Bacterioides fragilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis* und *Serratia marescens* sind erst bei einer Aminotriazolkonzentration von über 1 M zu 50% hemmbar (Switala und Loewen, 2002). Die aus Roggen isolierte Blattkatalase von *Secale*

cereale dagegen ist bei einer Konzentration von 8,5 mM schon zu 100% inhibiert (Streb et al., 1997). Drastisch sind auch Unterschiede zwischen CAT1 bis CAT-3 von *Zea mays*: CAT-1 und 2 werden bei einer Aminotriazol-Konzentration von 10 mM zu über 90% gehemmt, CAT-3 dagegen nur zu 30%; ist also auch Aminotriazol-tolerant (Scandalios, 1990). Streb et al. ermittelten 1997 an Katalasepräparationen aus Blättern von *Homogyne alpina* und *Secale cereale* eine erhöhte Aminotriazol-Toleranz der *Homogyne*-Katalase bei Inhibitorkonzentrationen von 1,7 mM und 8,5 mM. KCN (1,7 mM und 6,8 mM) inaktivierte die *Homogyne*-Katalase langsamer, durch NaN_3 (1,7 mM) war sie jedoch vollständig hemmbar. Untersuchungen an rekombinanter *Homogyne alpina* Katalase (mit den bei Streb et al. 1998 eingesetzten Inhibitorkonzentrationen) bestätigten diese Ergebnisse nicht. Rekombinante Katalase von *Homogyne alpina* ist ebenso empfindlich wie die rekombinante Katalase von *Secale cereale*. Rinderleberkatalase ist Aminotriazol-toleranter, durch KCN und NaN_3 jedoch auch fast vollständig hemmbar (Tab. 8). Studien an menschlicher Katalase zeigten, dass ein nucleophiler Angriff von Aminotriazol an den Aminosäurerest His74, welche direkt mit dem Häm interagiert, für eine covalente Bindung des Hemmstoffes verantwortlich ist (Putnam et al., 2000). Die Katalasen von *Secale cereale*, *Soldanella alpina*, *Homogyne alpina* und Rinderleber besitzen an dieser Position ebenfalls ein His (Abb. 27, Position 65). Unwahrscheinlich ist, dass dieser Aminosäurerest alleine für eine Aminotriazolempfindlichkeit verantwortlich ist, denn sowohl bei der Rinderleberkatalase, als auch bei der Aminotriazol-toleranten CAT-3 von *Zea mays* ist dieses His ebenfalls vorhanden. Die lichtstabile *Homogyne alpina* Katalase unterscheidet sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Katalaseinhibitoren nicht im Vergleich mit der lichtsensiblen Katalase von *Secale cereale*. Auch die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstanten (Abb. 24) ergab, dass die Substrataffinität der rekombinanten *Homogyne alpina* Katalase mit 33,18 mM im Bereich der anderen in dieser Arbeit ermittelten apparenten K_m -Werte liegt: Rinderleberkatalase besitzt einen K_m -Wert von 53,73 mM, rekombinante Katalase von *Soldanella alpina* von 42,09 mM und *Secale cereale* von 21,17 mM (Tab. 7). Vergleicht man diese Werte mit Literaturdaten, so ist zu sehen, dass Katalasen generell eine schwache Substrataffinität besitzen:

K_m (mM)	Spezies	Quelle
38,9	CAT-1 Weizen	Heinze und Gerhard, 2002
143	CAT-1 Mais	Scandalios, 1990, 1994
40	CAT-2 Mais	
62	CAT-3 Mais	
80	CAT menschliche Erythrozyten	Switala und Loewen, 2002
537	CAT <i>Proteus mirabilis</i>	

Das rekombinante Enzym von *Homogyne alpina* mit einem K_m von 33,18 mM zeigt demnach keine veränderte Substrataffinität im Vergleich mit anderen Katalasen.

Neben der Michaelis-Menten Konstanten wurde der Anteil an peroxidatischer Aktivität (Gleichung 12) von rekombinanten Katalasen, Roggenblattkatalase und Rinderleberkatalase ermittelt (Tab. 9). Die peroxidatische Aktivität ist bei geringen Wasserstoffperoxidkonzentrationen nachweisbar und Ethanol kann dabei als peroxidatisches Substrat dienen (Cheng et al., 1981; Sichak und Dounce, 1986; Kirkman et al., 1987; Scandalios, 1994). Die in der Literatur angegebene Wasserstoffperoxidkonzentration, bei der die peroxidatische Aktivität der Katalase messbar ist, bewegt sich von $< 10^{-6}$ M (Scandalios, 1994), bis zu einer H₂O₂-Syntheserate von 10-70 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Sichak und Dounce, 1986). In dieser Arbeit wurde für die verschiedenen Katalasen die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration für die Bestimmung der peroxidatischen Aktivität experimentell ermittelt, sie betrug 89 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Abbildung 26). Die peroxidatische Aktivität ist im Vergleich zur katalatischen Aktivität bei vielen pflanzlicher Katalasen gering. Doch gibt es Katalase-Isoformen von Mais, Tabak und Gerste, die eine erhöhte peroxidatische Aktivität besitzen. CAT-3 von *Nicotiana sylvestris* besitzt eine 32fach höheres Verhältnis von peroxidatischer/katalatischer Aktivität als CAT-2; bei *Zea mays* ist die peroxidatische Aktivität von CAT-3 im Vergleich zu CAT-2 sogar um den Faktor 70 erhöht (Havir und McHale, 1987; Havir und McHale 1989). Alle hier untersuchten Katalasen besitzen, im Vergleich zu den bei Havir und McHale (1987; 1989) untersuchten Katalasen keine erhöhte peroxidatische Aktivität. Für Katalasen mit erhöhter peroxidatischen Aktivitäten wurden von Havir und McHale (1989) Werte (= Verhältnisse von peroxidatischer/katalatischen Aktivität) zwischen 9,2 (CAT-3 *Nicotiana tabacum*) und 17,6 (CAT-3 *Zea mays*) ermittelt; Katalasen mit niedriger peroxidatischer Aktivität bewegten sich zwischen 0,25 (CAT-2 *Zea mays*) und 0,42 (Gerste). Verglichen mit diesen Literaturdaten lassen sich die hier ermittelten peroxidatischen Aktivitäten (Tab. 9) mit Werten von 0,002

(CAT-1 *Secale cereale*, Blatt) bis 0,072 (CAT-1 *Secale cereale*, rekombinant) alle bei den Katalasen mit einer niedrigen peroxidatischen Aktivität einordnen.

Vergleicht man den jedoch die in dieser Arbeit ermittelten peroxidatischen Aktivitäten untereinander, so fällt auf, dass Rinderleberkatalase eine höhere Fähigkeit zur Oxidation von Ethanol besitzt, als die aus Blättern isolierte Katalase von Roggen (Tab. 9). Der prozentuale Anteil der peroxidatischen Aktivität an der Gesamtaktivität ist bei Rinderleberkatalase 6fach höher, als bei Roggenblattkatalase. Die rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* zeigen jedoch, im Vergleich zur Katalase aus Roggenblättern, eine höhere peroxidatische Aktivität: Bei rekombinanter Katalase von *Secale cereale* ist die peroxidatische Aktivität im Vergleich zur aus Roggenblättern isolierten Katalase über 36 mal höher. Die peroxidatische Aktivität scheint nicht alleine von der Primärstruktur abhängig zu sein, da diese bei beiden Roggenkatalasen identisch ist. Daher müssen andere Faktoren für die erhöhte peroxidatische Aktivität der rekombinanten Katalasen (im Vergleich zur aus Roggenblättern isolierten Katalase) verantwortlich sein. So sind bei Rinderleberkatalase nach Denaturierung des Proteins mit verschiedenen Harnstoff- bzw. Guanidinhydrochlorid-Konzentrationen unterschiedliche Konformationszustände mit unterschiedlichen Aktivitäten festgestellt worden: Neben inaktiven Mono- und Dimeren sind ebenfalls aktivierte Dimere, sowie sogenannte „expanded“ Tetramere nachgewiesen worden (Jiao et al., 2003). Zudem sind bei Rinderleberkatalase nach einer Behandlung mit stark alkalischer Lösung Untereinheiten mit stark erhöhter peroxidatischer Aktivität beobachtet worden (Inada et al., 1961, Caravaca und May 1964). Diese ist laut Sichak und Dounce (1986) allerdings keine echte enzymatische Eigenschaft, sondern auf die Häm-Gruppe des partiell denaturierten Monomers zurückzuführen. Häm kann sowohl katalase- als auch peroxidase-ähnliche Reaktionen katalysieren (Grindberg et al. 1999). Eine erhöhte peroxidatische Aktivität aufgrund unvollständiger Assemblierung der rekombinanten Katalasen ist allerdings nicht wahrscheinlich, da während der Katalasereinigung bei der säulenchromatographischen Trennung keine Mono- bzw. Dimere mit katalaseähnlicher Aktivität festgestellt wurden. Auszuschließen ist jedoch nicht, dass das gereinigte rekombinante Tetramer instabiler als das aus Blättern isolierte Enzym ist und daher *in vitro* in seine Untereinheiten zerfällt, welche dann die erhöhte peroxidatische Aktivität verursachen. Von Zamocky et al. (1995) wurden bei mutagenisierter CAT-A von *Saccharomyces cerevisiae* Transformanten mit stark erhöhter peroxidatischer Aktivität beobachtet. Sie erklären die gesteigerte peroxidatische Aktivität der Mutanten zum Teil durch Veränderungen in der molekularen Struktur, ausgelöst durch die Aminosäuresubstitutionen. Denkbar wäre daher auch, dass unterschiedliche posttranslationale

Modifikationen während der heterologen Expression bei den rekombinanten Katalasen Veränderungen in der Molekülstruktur verursachen, welche z. B. für eine Lockerung intramolekularer Bindungen verantwortlich sein könnten. Diese könnten zu einer Erweiterung des substratzuführenden Kanals führen, aus der ebenfalls eine erhöhte peroxidatische Aktivität resultieren kann.

Die erhöhte peroxidatische Aktivität wurde bei beiden der hier untersuchten rekombinanten pflanzlichen Katalasen nachgewiesen. Da beide Katalasen unterschiedliche Lichtempfindlichkeiten besitzen, kann aus diesen Ergebnissen keine direkte Korrelation von Lichtstabilität und einer erhöhten peroxidatischen Aktivität der Katalase abgeleitet werden. Aufgrund der konträren Ergebnisse, welche für rekombinante und Roggenblattkatalase erhalten wurden, lassen sich keine Rückschlüsse auf eine veränderte peroxidatische Aktivität der Katalase in den Blättern von *Homogyne alpina* ziehen.

Obwohl die peroxidatischen Aktivitäten der rekombinanten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Katalasen erhöht sind, weisen die Michaelis-Menten-Konstanten, sowie die Inhibitorstudien darauf hin, dass der Lichtstabilität der *Homogyne alpina* Katalase keine Veränderung der Molekülstruktur nahe des aktiven Zentrums zu Grunde liegt: Da der K_m der *Homogyne*-Katalase im gleichen Bereich wie bei rekombinanter *Soldanella alpina* und *Secale cereale* Katalase liegt, ist demzufolge der Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum zur effizienten Substratumsetzung bei der lichtstabilen Katalase nicht verändert. Auch die Empfindlichkeit gegen die klassischen Katalaseinhibitoren der *Homogyne*-Katalase unterscheidet sich nicht signifikant von denen der anderen untersuchten Katalasen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass das aktive Zentrum nicht direkt modifiziert ist.

Von pflanzlichen Katalasen existiert keine Kristallstruktur, im Gegensatz zu den Katalasen von Rinderleber (Murthy et al., 1981), menschlichen Erythrocyten (Mate et al., 1999a; Putnam et al., 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Berthet et al., 1997, Mate et al., 1999b), *Penicillium vitale* (Vaintshtein et al., 1986) und den prokaryotischen Katalasen von *Escherichia coli* (Bravo et al., 1999), *Micrococcus lysodeikticus* (Murshudov et al., 1992), *Proteus mirabilis* (Gouet et al., 1995) und *Pseudomonas syringae* (Carpena et al., 2003). Ein von Carpena et al. (2003) durchgeführter Vergleich der 3dimensionalen Struktur der kristallisierten CatF-Untereinheit mit Modellstrukturen von anderen Katalasen ergab, dass sich aus Kristallen resultierende Modelle untereinander sehr ähnlich sind. Die Regionen, welche in der Primärstruktur die Faltung der jeweiligen Untereinheit determinieren, sind

demnach hochkonserviert. Es wurde computergestützt ein dreidimensionales Modell einer Katalaseuntereinheit von *Homogyne alpina* erstellt (Abb. 37a). Dies geschah unter der Voraussetzung, dass bei pflanzlichen Katalasen diese zentralen, die räumliche Anordnung bestimmenden Regionen in der Primärstruktur ebenfalls hochkonserviert sind. Das Modell wurde mit Hilfe des Computerprogramms Swiss-Pdb-Viewer aus der Swiss-Prot.-Datenbank anhand der Primärstruktur der *Homogyne alpina*-Katalase von Pro15 bis Leu454 berechnet. Die Berechnung basiert auf bekannten Kristallstrukturen von prokaryotischen und eukaryotischen Katalasen und das daraus entstehende dreidimensionale Modell ist daran adaptiert (Guex und Peitsch, 1997). Als Vergleich wurde ein dreidimensionales Modell der lichtsensiblen Katalaseuntereinheit von *Soldanella alpina*, basierend auf den Aminosäuren Asn13 bis Ala453 der Primärstruktur, erstellt (Abb. 37b). Die gelb markierten Aminosäuren (Pro119, Asn138, Asn139, Phe140, Pro141, Phe188, Trp189, Ile193, Gly194, Pro196, His201, Gly203, Ser205, Lys227, Val232 und Cys234) entsprechen bei Rinderleberkatalase den Aminosäuren Pro128, Asn147, Asn148, Thr149, Pro150, Phe197, Leu198, Arg202, Gly203, Pro205, His210, Asp212, Tyr214, Lys236, Ile241 und Asn243. Sie repräsentieren dort den Eingang zu einem seitlichen Kanal und den Kanal selbst, der neben dem Hauptsubstratkanal als weiterer Zugang zum Reaktionszentrum bekannt ist. (Fita und Rossmann, 1985a). Die grün markierten Aminosäuren entsprechen den im Abb. 7 bzw. Abb. 27 ermittelten auffälligen Aminosäuresubstitutionen Val124Thr, Leu135Ile, Leu189Trp, Gly206Ser, His225Thr und Lys291Met. Rot gekennzeichnet ist das Häm-Eisen bindende Tyr348 (bei BLC: Tyr 357) aus dem Reaktionszentrum (Murthy et al., 1981).

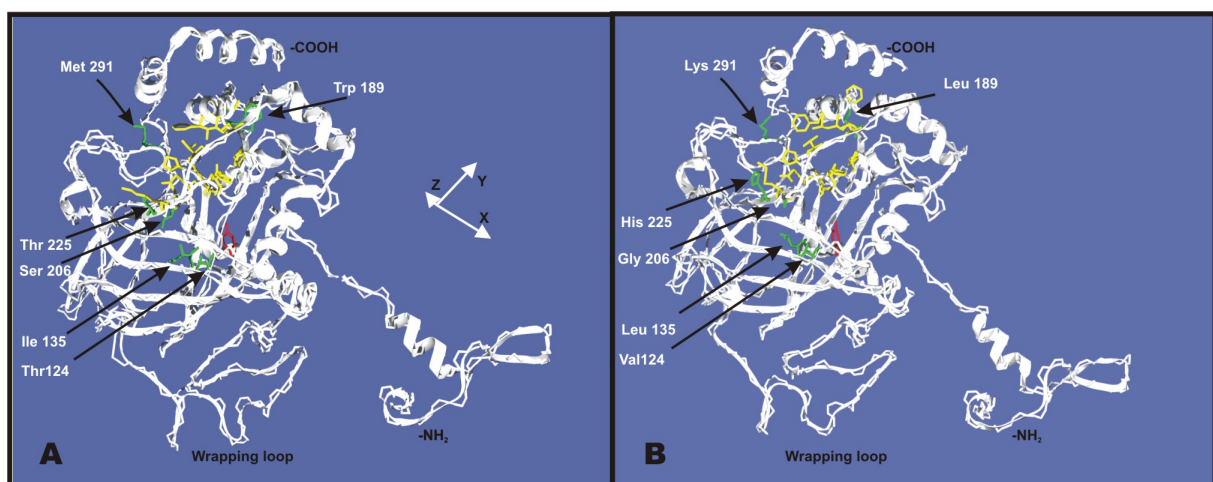


Abbildung 37:

Modell einer 3dimensionalen Struktur einer Katalaseuntereinheit von A) *Homogyne alpina* und B) *Soldanella alpina*. **Gelb:** Aminosäuren, welche einen seitlichen Kanal repräsentieren (aus: Fita und Rossmann, 1985a). **Grün:** Auffällige Aminosäuresubstitutionen, welche sich aus dem Sequenzvergleich der *Homogyne alpina* Katalase mit anderen Katalasen ergaben (Abb. 27). **Rot:** Tyr₃₄₈.

Eine offensichtliche Veränderung in der Tertiärstruktur ist bei der lichtstabilen Katalase von *Homogyne alpina* im Vergleich zur lichtsensiblen Untereinheit von *Soldanella alpina* nicht zu erkennen (Abb. 37). Die Aminosäuresubstitutionen rufen demzufolge scheinbar keine groben strukturellen Veränderungen der Untereinheit hervor. Alle bei *Homogyne alpina* substituierten Aminosäuren (grün markiert) sind in der Region des seitlichen Kanals bzw. nahe des Reaktionszentrums zu sehen. Drei von ihnen (Thr225, Met291 und Trp189) sind an der Moleküloberfläche direkt am Eingang des seitlichen Kanals lokalisiert. Die eigentliche Funktion des seitlichen Kanals ist noch nicht aufgeklärt. Bei Rinderleberkatalase ist der Eingang des seitlichen Kanals direkt an der NADPH-Bindetasche lokalisiert. Als eine seiner möglichen Funktionen wird eine Verbindung zwischen dem Häm und dem gebundenen NADPH innerhalb des Katalasetetramers postuliert (Fita und Rossmann, 1985; 1985a). Bei *Proteus mirabilis* soll der seitliche Kanal das Katalase-gebundene NADPH mit dem Hauptsubstratkanal verbinden (Gouet et al., 1995). Die Funktion des seitlichen Kanals soll demnach mit einer spezifischen NADPH-Bindung in direktem Zusammenhang stehen. Wie schon erwähnt binden einige Katalasen, so auch die Rinderleberkatalase, spezifisch NADPH (Kirkman und Gaetani 1984). Die Lokalisation des gebundenen NADPH und die Identifizierung des zur Bindung essentiellen His304 bei Rinderleberkatalase erfolgte 1985 durch Fita und Rossmann. Das His304 scheint bei Rinderleberkatalase unter anderem für die Stärke der NADPH-Bindung verantwortlich zu sein. Bei nicht NADPH-bindenden Katalasen ist es durch Glutaminsäure, bei schwach bindenden Katalasen durch Glutamin ersetzt (Zamocky und Koller, 1999). An dieser Position befindet sich bei pflanzlichen Katalasen entweder ein Glutaminsäurerest oder ein Asparaginsäurerest bei *Homogyne alpina* (Abb. 27, Position 295). Bei der nicht NADPH-bindenden Katalase von *Pseudomonas syringae* ist ebenfalls ein Asparaginsäurerest an dieser Position (Carpena et al., 2003). Andere, für die NADPH-Bindung wichtige Aminosäuren, wie His193, Phe197, Ser200, Arg202, His234, Lys236, Phe445, Val449 und Glu453 (Zamocky und Koller, 1999) sind bei pflanzlichen Katalasen zum Teil ebenfalls vorhanden (His184, Phe188, His225, Lys227); oder aber durch Asp191, Val/Leu/Ile193, Arg434, Trp/Phe438 und Arg442 ersetzt (Abb. 27). Untersuchungen an CAT-A von *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass der Austausch von Arg200 (bei BLC Arg202) zu Asp oder Asn zu einem vollständigen Verlust der NADPH-Bindungsfähigkeit führt (Zamocky und Koller, 1999). An der Position des Arg200 befindet sich bei pflanzlichen Katalasen Val/Leu/Ile (Position 193). Die für die NADPH-Bindung wichtigen hochkonservierten Positionen Ser200, Arg202, sowie das His304 sind bei pflanzlichen Katalasen durch andere Aminosäuren ersetzt, daher sind die hier untersuchten Katalasen auch

nicht fähig sind, NADPH spezifisch zu binden (Abb. 21 und 22). Deshalb scheint die Funktion des seitlichen Kanals, bei pflanzlichen Katalasen nicht mit einer NADPH-Bindung in Zusammenhang zu stehen. Als weitere mögliche Funktion des Kanals postulieren Sevinc et al. (1999), dass der laterale Kanal bei HPII Katalase von *Escherichia coli* als ableitender Kanal für Reaktionsprodukte fungieren kann, da der Hauptkanal zu schmal ist, um beide Aufgaben (Substratzufuhr und Produktausfuhr) zu übernehmen. Untersuchungen an peroxisomaler Katalase von *Saccharomyces cerevisiae* unterstützen die These, dass der seitliche mit der NADPH-Bindungsstelle assoziierte Kanal in die Produktfreisetzung involviert ist (Kalko et al., 2001). Nicholls et al. (2001) argumentieren dagegen, dass bei NADPH-bindenden Katalasen dieser seitliche Kanal durch gebundenes NADPH blockiert wird. Dadurch würde seine Beteiligung am Substratfluss oder der Produktfreisetzung erschwert. Ein weiteres Argument dafür, dass der seitliche Kanal zumindest bei nicht-NADPH-bindenden Katalasen eine Rolle in Substratzufuhr bzw. Produktausfuhr spielt, bringen Sevinc et al. (1999) durch Studien an mutagenisierter HPII Katalase: Ein Austausch von Arg260 zu Ala260 resultierte in einer erhöhten spezifische Aktivität. Arg260 repräsentiert bei Rinderleberkatalase das für die NADPH-Bindung wichtige Arg202 und ist gleichzeitig als eine der „Eingangs-Aminosäuren“ des lateralen Kanals bekannt (Fita und Rossmann, 1985a; Zamocky und Koller, 1999). Da die Arg260Ala Mutation eine Erweiterung des seitlichen Kanals verursachen soll, wäre das aktive Zentrum für das Substrat besser zu erreichen, was sich in der höheren spezifische Aktivität der HPII Mutante bemerkbar macht (Sevinc et al., 1999). Da alle bei *Homogyne alpina* substituierten Aminosäuren in der Region des seitlichen Kanals lokalisiert sind, wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob sich die spezifische Aktivitäten der lichtstabilen *Homogyne alpina*-Katalase und der rekombinanten Roggenkatalase unterscheiden. Die spezifische Aktivität der rekombinanten Katalase von *Homogyne alpina* ist im Vergleich zur rekombinanten Katalase von *Secale cereale* um den Faktor 6,2 niedriger. (Tab. 5). Demzufolge ist auch die aus der spezifischen Aktivität abgeleitete Wechselzahl der *Homogyne alpina*-Katalase geringer, als die der Roggenkatalase (Kap. 3.5.1., Tab. 6). Vergleicht man die Wechselzahlen von *Homogyne alpina*-Katalase ($0,41 \times 10^4$) und Roggenkatalase ($2,54 \times 10^4$) mit Literaturwerten (s. u.) so ist zu sehen, dass sich die Wechselzahlen von Katalasen bis zum Faktor 10^3 voneinander unterscheiden:

Katalase	Wechselzahl	Quelle
Katalase, Organismus o.A.	$5,6 \times 10^6$	Lehninger, 1983
Pferd, Erythrocyten-Katalase	$3,5 \times 10^6$	Chance, 1949a
BLC	$2,25 \times 10^7$	Ogura und Yamazaki, 1983
<i>Solanum tuberosum</i>	$1,12 \times 10^4$	Beaumont et al., 1990

Generell sind spezifische Aktivitäten von Katalasen und die daraus resultierenden Wechselzahlen stark variabel. So bewegen sich die spezifischen Aktivitäten zwischen $2,44 \mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein bei Katalase aus Blättern von *Zantedeschia ethiopica* bis zu $15.883 \mu\text{kat}/\text{mg}$ Protein bei Katalase aus Erbsenblättern (Heinze und Gerhardt 2002). Dieser Variabilität liegen unterschiedliche Versuchsbedingungen zu Grunde: Die eingesetzten Substratkonzentrationen variierten, so wurde z. B. bei Chance (1949a) $100 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ eingesetzt, in dieser Arbeit $15,76 \text{ mM H}_2\text{O}_2$. Ebenso variierte die Versuchstemperatur (bei Lehninger: $20\text{-}38^\circ\text{C}$, bei Ogura und Yamazaki: 26°C , hier: 25°C). Da sich diese Faktoren auf die Katalaseaktivität auswirken, auf Grund derer die spezifische Aktivität und die Berechnung der Wechselzahl basiert, sind alle Literaturdaten relativ zu betrachten. Auffällig ist jedoch, dass die parallel heterolog exprimierten und gereinigten Katalasen von *Homogyne* und *Secale* zwar unterschiedliche absolute Werte ergaben, das relative Verhältnis untereinander jedoch immer gleich ist. Die geringere spezifische Aktivität der *Homogyne alpina*-Katalase könnte möglicherweise der Nachteil sein, den die Katalase von *Homogyne alpina* für ihre erhöhte Lichtstabilität in Kauf nehmen muss. Unterstützt wird diese Vermutung von der Tatsache, dass die lichtstabile Core-Katalase von *Helianthus annuus* ebenfalls eine niedrige spezifische Aktivität im Vergleich zur Matrixkatalase besitzt (Eising et al., 1998). Ob die geringe spezifische Aktivität der lichtstabilen *Homogyne*-Katalase auf eine Modifikation des lateralen Kanals zurückgeführt werden kann, ist zwar ungeklärt, jedoch möglich. So hat die Substitution einer basischen Aminosäure durch einen hydrophoben Aminosäurerest (Arg260Ala) bei der HPII-Katalase von *Escherichia coli* eine aktivitätssteigernde Wirkung (Sevinc et al., 1999). Bei den beiden untersuchten pflanzlichen Katalasen sind an dieser Position hydrophobe Aminosäurereste (Isoleucin bei *Homogyne*, Valin bei *Secale*). Allerdings sind, wie schon erwähnt, einige bei der Katalase von *Homogyne alpina* vorkommenden Aminosäuresubstitutionen (Trp189, Met291 und Thr225) am Eingang des seitlichen Kanals lokalisiert. Eine Veränderung der Aminosäurereste in diesem Bereich (wie sie bei *Homogyne alpina* natürlicherweise vorkommen) könnte eine strukturelle Veränderung des seitlichen

Kanals hervorrufen, aus der eine Minderung der spezifischen Aktivität resultieren könnte. Dieser mögliche Zusammenhang müsste jedoch durch Folgeexperimente verifiziert werden.

Während der Photoinaktivierung von Katalase wird von Nakatani (1961) die Oxidation eines Histidins postuliert. Histidine sind sowohl an der Häm-Bindung (Fita und Rossmann, 1985a), an der Substratbindung (Nichols et al, 2001), als auch an der NADPH-Bindung bei NADPH-bindenden Katalasen (Fita und Rossmann, 1985; Zamocky und Koller, 1999) beteiligt. Im Aminosäure-Sequenzvergleich (Abb. 27) ist zu erkennen, dass bei der lichtstabilen *Homogyne alpina*-Katalase ein Histidinrest durch einen Threoninrest substituiert ist (Pos. 225). Bei Rinderleberkatalase ist dieser Histidinrest (His234, bei Pflanzen an Position 225) indirekt an der NADPH-Bindung beteiligt (Zamocky und Koller, 1999). Almarsson et al. (1993) postulieren, dass bei Rinderleberkatalase das His234 an der Reduktion des gebundenen NADPH zu NADP⁺ direkt involviert ist. Die Funktion dieses Histidinrestes (Pos. 225) ist bei pflanzlichen Katalasen noch ungeklärt. Bei der lichtsensiblen Katalase von *Soldanella alpina* ist in der dreidimensionalen Modellstruktur das His225 direkt neben dem Zugang zum seitlichen Kanal lokalisiert (Abb. 37b). Der seitliche Kanal kann in zwei Zuständen vorliegen (geschlossen und offen), die jeweilige Konformation kann durch wenige Veränderungen in den Seitenketten einiger Aminosäurereste bestimmt werden (Kalko et al, 2001). Die räumliche Nähe des His225 zum seitlichen Kanal impliziert, dass dieses Aminosäure den während der Lichtinaktivierung von Katalasen oxidierte Histidinrest darstellen könnte. Denkbar wäre dann, dass durch die Oxidation des Histidins eine Konformationsänderung des lateralen Kanals zu einem Aktivitätsverlust führt. Eine weitere Folge der Histidin-Oxidation könnte sein, dass sich intramolekulare Bindungen oder Bereiche verändern und sich negativ auf die Katalaseaktivität auswirken. So ist bei inaktiven His128-Mutanten (His128Asn bzw. His128Ala) von *Escherichia coli* HP11-Katalase beobachtet worden, dass sich durch diese Mutation im Substratkanal mehr gebundene Wassermoleküle befinden. Die Hydrophobizität von Kanalabschnitten ist strukturellen Veränderungen gegenüber sehr sensibel und wirkt sich auf den Substratfluss zum aktiven Zentrum aus (Melik-Adamyany et al., 2001). Überträgt man nun diesen Denkansatz auf den lateralen Seitenkanal, könnte sich dort ebenfalls durch die Oxidation von His225 der Wassergehalt der hydrophoben Bereiche verändern und somit einen Aktivitätsverlust auslösen. Um die Bedeutung des His225 während der Lichtinaktivierung von Katalasen zu untersuchen, wurde durch *in vitro* Mutagenese die cDNA von *Soldanella alpina* so verändert, dass an dieser Position statt eines Histidins ein Threonin codiert wurde, wie es bei CAT-1 von *Homogyne alpina* der Fall ist. Eine erhöhte Lichtstabilität der rekombinanten mutagenisierten Katalase von *Soldanella alpina* resultierte jedoch nicht aus der

Aminosäuresubstitution (Abb. 35). Die mutagenisierte Katalase ist noch lichtsensibler als die nicht mutagenisierte Form. Die Entfernung des Histidins erhöht demnach die Instabilität der Katalase im Starklicht. Gerade diese noch erhöhte Lichtempfindlichkeit der mutagenisierten Katalase von *Soldanella* könnte darauf hindeuten, dass His225 eine wichtige Funktion während der Lichtinaktivierung einnimmt. Bei der mutagenisierten Katalase von *Soldanella alpina* wurde nur eine der sechs bei *Homogyne* vorkommenden auffälligen Aminosäuresubstitutionen verändert (Abb. 27). Wahrscheinlich ist, dass eine oder mehrere der anderen Aminosäuren mit dem Thr225 zusammen für die erhöhte Lichtstabilität der *Homogyne alpina*-Katalase verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang ist der Austausch von Lys291 zu Met291 bei der *Homogyne*-Katalase besonders interessant, da für Methionin-Seitenketten eine antioxidative Scavenger-Funktion bekannt ist. Methionin-Seitenketten können durch H_2O_2 , aber auch durch eine Reihe anderer Radikale (z. B. Superoxid oder Ozon) oxidiert werden. Sind Methionin-Seitenketten an der Oberfläche des Proteins lokalisiert, also an einer exponierten Position, können die Proteine resistenter gegen oxidative Schädigung sein, da die ROS durch die Methionin-Seitenketten weggefangen werden können (Levine et al, 1996). Demzufolge könnte das Met291 bei *Homogyne alpina*, welches an der direkten Oberfläche der Katalase-Untereinheit lokalisiert zu sein scheint (Abb. 37a), ebenfalls als Radikalfänger dienen. Es würde oxidiert um so das Thr225 oder eine andere, besser oxidierbare Aminosäure, vor Oxidation zu schützen. Die Oxidation von Methioninresten kann zwar zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen (Vogt, 1995), eine zwangsläufige Folge ist es jedoch nicht. *In vitro* Studien an Glutamin-Synthetase von *Escherichia coli* zeigten, dass durch Oxidation von 8 der 16 Methioninseitenketten die enzymatische Aktivität nur marginal beeinflusst wurde (Levine et al., 1996). Daher könnte bei der Katalase von *Homogyne alpina* das Met291 durch ROS oxidiert werden, dadurch würde das darunter liegende Thr225 (oder ein anderer Aminosäurerest) geschützt und es würde kein nachfolgender Aktivitätsverlust eintreten. Da der Mutante von *Soldanella alpina* nach Eliminierung des oxidablen His225 diese Kompensationsmöglichkeit fehlt (Pos. 291: Lys), wäre auch ihre erhöhte Empfindlichkeit gegen Starklicht im Vergleich zum Wildtyp erklärt. Demnach könnte folgendes Modell aufgestellt werden:

Homogyne alpina:

Licht + O₂ → Met291_{ox} + Thr225 oder andere oxidable Aminosäure (→ intakter seitlicher Kanal?) → aktive Katalase

Soldanella alpina:

Licht + O₂ → Lys291 + His225_{ox} (→ Konformationsänderung im seitlichen Kanal?)
→ inaktive Katalase

*Soldanella alpina*_{H225T}:

Licht + O₂ → Lys291 + Thr225 (→ Oxidation von X ?) → inaktive Katalase

Zur Überprüfung dieses Modells wäre deshalb in diesem Zusammenhang, eine Doppelmutante der lichtsensiblen rekombinanten Katalase von *Soldanella alpina* mit den Aminosäuresubstitutionen His225Thr und Lys291Met von Interesse. Weiterhin müsste untersucht werden, ob es sich bei His225 um die für die Inaktivierung relevante oxidable Histidin-Seitenkette handelt. So ist bei HPII-Katalase von *Escherichia coli* das His128 für die Funktion des Enzyms von essentieller Bedeutung. Untersuchungen an Mutanten haben gezeigt, dass sich Aminosäuresubstitutionen in anderen Regionen (Val169Cys) darin auswirken, dass das wichtige His128 andere Bindungen eingeht, was sich in herabgesetzter Enzymaktivität in der Mutante auswirkt (Mate et al., 1999). Das His128 entspricht bei Rinderleberkatalase dem His74 und bei humaner Katalase dem His75. Dort ist es in die Substratbindung über Herstellung von Wasserstoffbrücken mit definierten Wassermolekülen nahe des Häms, sowie in die Orientierung des Häms involviert (Fita und Rossman, 1985a, Putnam et al., 2000, Carpena et al., 2003). Bei Rinderleberkatalase interagiert es mit Ser113 und diese Bindung scheint essentiell für die enzymatische Aktivität zu sein (Bravo et al., 1997). Dieses Histidin ist bei allen in Abbildung 27 herangezogenen pflanzlichen Katalasen, hochkonserviert (Pos 65), da es, wie oben erwähnt, an der Häm-Bindung beteiligt ist. Wenn dieser Aminosäurerest unter Starklichteinfluss oxidiert würde (und nicht das His225) könnte die erhöhte Lichtstabilität der *Homogyne*- Katalase und der CATA3 von *Helianthus annuus* damit begründet werden, dass das Met291 als Sauerstoffradikalfänger fungiert und nicht His225, sondern His65 dadurch vor Oxidation schützt. Für Katalasen ist nicht bekannt, ob die Oxidation von Methionin-Seitenketten einen Aktivitätsverlust zur Folge hat. Wäre das der Fall, müsste das oxidierte Methionin wieder reduziert werden. Die Regeneration oxidiertes Methionin-Seitenketten erfolgt in allen Organismen (Bakterien, Hefen, tierischen Zellen und

Pflanzen) durch das Enzym PMSR (Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase), um einen antioxidativen Kreislauf aufrecht zu erhalten (Moskovitz et al., 1995; 1996; 1997; Sadanandom et al., 2000). In Pflanzen wurden bisher nur cytoplasmatische und chloroplastidäre PMSR-Isoformen nachgewiesen (Sadanandom et al., 2000), über eine peroxisomal lokalisierte PMSR ist nichts bekannt. Daher ist nicht bekannt, ob dieser PMSR-vermittelte antioxidative Kreislauf auf die Katalase in das pflanzliche Peroxisom übertragen werden kann.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die Katalase-cDNA *cat1* der Alpenpflanze *Homogyne alpina* und *cata3* von *Helianthus annuus* für lichtstabile Katalasen codieren. Die Lichtstabilität ist demzufolge eine Eigenschaft der Katalase, die sich aus ihrer jeweiligen Primärstruktur ergibt. Im Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von lichtstabilen und lichtempfindlichen Katalasen sind sechs auffällige Aminosäuresubstitutionen bei den lichtstabilen Katalasen zu finden: Val124Thr, Leu135Ile, Leu189Trp, Gly206Ser, His225Thr und Lys291Met. Da diese Substitutionen in hochkonservierten Bereichen vorkommen, waren sie gerade unter dem Gesichtspunkt der unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegen Starklicht besonders markant. In der Literatur wurden diesem Zusammenhang auch andere Aminosäuresubstitutionen diskutiert: Von Kleff et al. (1997) durchgeführte vergleichende Untersuchungen der Primärstrukturen von lichtempfindlicher Matrix- und lichtstabilerer Corekatalase von *Helianthus* zeigten, dass an Pos. 210 der Corekatalase ein Leucin zu finden ist, wo die Matrixkatalase ein Tyr besitzt. Diesen Austausch findet man, außer bei CATA3 von *Helianthus*, bei den in Abbildung 27 verglichenen pflanzlichen Katalasen nur noch bei *Homogyne alpina*. Diese Position jedoch ist bei den anderen, in den Vergleich miteinbezogenen Katalasen nur mäßig konserviert. Daher scheint Tyr210 im Vergleich der spezifischen Unterschiede von *Homogyne alpina* CAT-1 und *Helianthus annuus* CATA3 mit anderen Katalase-Primärstrukturen für die Lichtstabilität keine wesentliche Rolle zu spielen. Obwohl die Sequenzunterschiede der lichtstabilen Katalasen im Vergleich zu lichtsensiblen Katalasen gering sind und lediglich die sechs auffälligen Aminosäuresubstitutionen in den konservierten Bereichen umfassen, scheint deren Auswirkung auf die Lichtempfindlichkeit groß zu sein. Die strukturellen Vergleiche ergaben Hinweise darauf, dass der bei lichtsensiblen Katalasen vorkommende Histidinrest an Position 225 als während der Starklichtinaktivierung oxidables Histidin in Frage kommt. Da die Substitution dieses Histidins durch einen Threoninrest an dieser Stelle jedoch keine gesteigerte Lichtstabilität zur Folge hatte, sind wahrscheinlich noch eine oder mehrere der im Sequenzvergleich ermittelten auffälligen Aminosäuresubstitutionen daran beteiligt. Ob es sich dabei zusätzlich nur um die

Lys291Met-Substitution handelt, oder noch die anderen Aminosäuren eine Rolle spielen, müsste durch Herstellung von mehrfach-Mutanten einer lichtsensiblen oder der lichtstabilen pflanzlichen Katalase näher untersucht werden. Heterologe Expression dieser mehrfach-Mutanten und anschließende Starklichtinkubation der rekombinanten Katalasen würden Aufschluss über die strukturellen Veränderungen geben, welche die Lichtstabilität von CATA3 von *Helianthus annuus* und der Blattkatalase von *Homogyne alpina* bedingen.

5. Zusammenfassung

Das peroxsimale Enzym Katalase wird durch Blaulichtabsorption der prosthetischen Häm-Gruppe im sichtbaren Licht und in Anwesenheit von Sauerstoff *in vitro* und *in vivo* inaktiviert. Unter physiologischen Bedingungen wird das inaktivierte Enzym *in vivo* durch Neusynthese ersetzt. Ist der Proteinbiosyntheseapparat jedoch durch zusätzliche Stressoren wie z. B. Kälte gehemmt, kommt es zu einem Verlust von Katalaseaktivität im Blatt. Alpenpflanzen sind an ihrem natürlichen Standort sowohl hohen Lichtintensitäten, als auch niedrigen Temperaturen ausgesetzt. Streb et al. (1997) identifizierten in Blättern der Alpenpflanze *Homogyne alpina* eine lichtstabile Katalase. Nach Isolierung von Katalase-cDNAs der Alpenpflanzen *Soldanella alpina* und *Homogyne alpina*, sowie der Flachlandpflanze *Secale cereale* (durchgeführt und zu Verfügung gestellt von M. Schmidt, Universität Frankfurt) sollten diese heterolog exprimiert und auf Lichtstabilität untersucht werden. In Hefen gelang es jedoch nicht, pflanzliche Katalasen funktionell zu exprimieren. Daher wurde die heterologe Katalase-Expression im Baculovirussystem durchgeführt. Nach Infektion von *Spodoptera frugiperda* Insektenzellen mit rekombinantem Baculovirus, der die jeweilige Katalase-cDNA-Sequenz enthielt, gelang es, aktive pflanzliche Katalasen zu extrahieren. Die rekombinanten Katalasen von *Soldanella alpina* und *Secale cereale* waren, ebenso wie die aus Blättern gereinigten Enzyme, lichtsensibel. Die rekombinante Katalase der Alpenpflanze *Homogyne alpina* war dagegen lichtstabil. Die Ermittlung der Michaelis-Menten-Kinetiken, der peroxidatischen Aktivitäten und der Empfindlichkeit gegen Inhibitoren der lichtsensiblen und lichtstabilen Katalasen ergaben, dass sich die Katalasen in ihren katalytischen Eigenschaften nicht wesentlich voneinander unterschieden. Lediglich die spezifische Aktivität der rekombinanten lichtstabilen Katalase von *Homogyne alpina* war signifikant herabgesetzt. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Katalase von *Homogyne alpina* mit Katalasesequenzen anderer mono- und dikotyler Pflanzen und Rinderleberkatalase zeigte sechs auffällige Aminosäuresubstitutionen in stark konservierten Bereichen: Val124Thr, Leu135Ile, Leu189Trp, Gly206Ser, His225Thr und Lys291Met. An einer computergestützten Darstellung des Modells einer 3dimensionalen Katalaseuntereinheit der lichtstabilen Katalaseuntereinheit von *Homogyne alpina* ist zu sehen, dass die auffälligen Aminosäuresubstitutionen in einer Region am Eingang eines seitlichen Kanals, der zum Reaktionszentrum führt, lokalisiert sind. Diese Region repräsentiert bei tierischen Katalasen eine NADPH-Bindungsstelle. NADPH schützt Rinderleberkatalase, im Gegensatz zu den rekombinanten pflanzlichen Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina*, komplett

vor der Inaktivierung durch Superoxid und partiell vor Starklichtinaktivierung. Der NADPH-vermittelte Schutz der Rinderleberkatalase ist auf eine spezifische NADPH-Bindung zurückzuführen. Die in dieser Arbeit untersuchten Katalasen von *Secale cereale* und *Homogyne alpina* binden NADPH nicht. Die aus Blättern isolierte lichtsensible Katalase von *Secale cereale* wird durch Superoxid nicht inaktiviert, die rekombinante lichtstabile Katalase von *Homogyne alpina* dagegen schon. Daher liegt der oxidativen Photoinaktivierung ein anderer Mechanismus zu Grunde, als der Superoxid-vermittelten Katalaseinaktivierung.

Die Aminosäuresequenz von CATA3 von *Helianthus annuus* zeigte die gleichen auffälligen Aminosäuresubstitutionen wie CAT-1 von *Homogyne alpina*. Heterologe Expression von CATA3 mit anschließender Lichtinkubation ergab, dass CATA3, ebenso wie CAT-1 von *Homogyne alpina*, lichtstabil ist. In Blättern von *Helianthus annuus* sind Katalasen mit erhöhter Lichtstabilität als semikristalline Einschlüsse, sogenannten Cores, organisiert. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass in den Peroxisomen von *Homogyne alpina*-Blättern ebenfalls Cores vorhanden sind.

Während der Lichtinaktivierung von Katalasen soll die Oxidation von Histidinresten ausgelöst werden. Daher ist die bei den lichtstabilen Katalasen vorkommende Aminosäuresubstitution von His zu Thr (Pos. 225) in einer bei eukaryotischen Katalasen konservierten Region besonders auffällig. Deshalb wurde bei der lichtsensiblen Katalase von *Soldanella alpina* durch *in vitro* Mutagenese das His₂₂₅ durch ein Thr ersetzt. Die mutagenisierte Katalase von *Soldanella alpina* war noch lichtempfindlicher, als das nicht-mutagenisierte rekombinante Enzym. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Region um das His₂₂₅ eine wichtige Rolle für die Lichtstabilität bzw. -empfindlichkeit von pflanzlichen Katalasen einzunehmen scheint; die His₂₂₅Thr Substitution ist allerdings nicht alleine für die Lichtstabilität ausreichend.

6. Literatur

- Aebi H.**, Wyss S., Scherz B. und Skvaril F. (1974), Heterogeneity of erythrocyte catalase II, European Journal of Biochemistry 48, pp. 137-143
- Almarsson Ö.**, Sinha A., Gopinath E. und Bruice T. (1993), Mechanism of one-electron oxidation of NAD(P)H and function of NADPH Bound to catalase, Journal Am. Chem. Soc. 115, pp. 7093-7102
- Antunes F.** und Cadenas E. (2000), Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes, FEBS Letters 475, pp. 121-126
- Aro E.-M.**, Virgin I. und Andersson B. (1993), Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover, Biochimica et Biophysica Acta 1143, pp. 113-134
- Aruoma O.** (1997), Free radicals: Dietary advantages and disadvantages, in: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.841-860
- Asada K.** und Takahashi M. (1987), Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, aus: Photoinhibition, Hg: D. J. Kyle, C. B. Osmond und C. J. Arntzen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 227-287
- Asada K.** (1997), The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate-reductase in H₂O₂ scavenging in plants, in: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.715-735
- Asada K.** (1999), The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 50, pp. 601-639
- Aubailly M.**, Haigle J., Giordani A., Molière, P. und Santus R. (2000), UV photolysis of catalase revisited: A spectral study of photolytic intermediates, Journal of Photochemistry and Photobiology 56, pp. 61-67
- Baier M.** und Dietz K.-J. (1999), The Costs and benefits of oxygen for photosynthesizing plants, Progress in Botany 60, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 282-314
- Barber J.** und Andersson B. (1992), Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis, Trends Biochem. Sci. 17, pp. 61-66
- Beaumont F.**, Jouve H.-M., Gagnon J., Gaillard J. und Pelmont J. (1990), Purification and properties of a catalase from potato tubers (*Solanum tuberosum*), Plant Science 72, pp. 19-26
- Berthet S.**, Nykyri L., Bravo J., Mate M., Berthet-Colominas C., Alzari P., Koller F. und Fita I. (1997), Crystallization and preliminary structural analysis of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, Protein Science 6, pp. 481-483
- Bishop D.** (1990), Gene expression using insect cells and viruses: Current opinion, Biotechnologie 1, pp. 62-67

- Björn L.** (1969), Photoinactivation of catalases from mammal liver, plant leaves and bacteria. Comparison of inactivation cross sections and quantum yields at 406 nm, *Photochemistry and Photobiology* 10, pp. 125-129
- Bradford M.** (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, pp. 248-254
- Bravo J., Fita I., Gouet P., Jouve H., Melik-Adamayan W. und Murshudov, G.** (1997), Structure of catalases, in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 407-445
- Bravo J., Mate M., Schneider T., Switala J., Wilson K., Loewen P. und Fita I.** (1999), Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1,9 Å resolution, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 34, pp. 155-166
- Cao C., Leng Y. und Kufe D.** (2003), Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response, *Journal of Biological Chemistry* 278, pp. 39609-39614
- Carpena X., Soriano M., Klotz M., Duckworth H., Donald L., Melik-Adamayan W., Fita I. und Loewen P.** (2003), Structure of the clade I catalase, catF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution, *Proteins: Structure, Function and Genetics* 50, pp. 423-436
- Caravaca J. und May M. D.** (1964), The isolation and properties of an active peroxidase from hepatocatalase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 16, pp. 528-537
- Chauvatcharin N., Vattanaviboon P., Switala J., Loewen P. und Mongkolsuk S.** (2003), Cloning and characterization of *kataA*, encoding the major monofunctional catalase from *Xanthomonas campestris* pv. Phaseoli and characterization of the encoded catalase KatA, *Current Microbiology* 46, pp. 83-87
- Cereghino G. und Cregg J.** (1999), Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis, *Current opinion in biotechnology* 10, pp. 422-427
- Cereghino J. und Cregg J.** (2000), Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews* 24, pp. 45-66
- Chance B.** (1949), The reaction of catalase and cyanide, *The Journal of Biological Chemistry* 179, pp. 1299-1309
- Chance B.** (1949a), The composition of catalase-peroxide complexes, *The Journal of Biological Chemistry* 179, pp. 1311-1330
- Chelikani P., Fita I. und Loewen P.** (2004), Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, pp. 192-208
- Cheng L. und Packer L.** (1979), Photodamage to hepatocytes by visible light, *FEBS Letters* 97, pp. 124-128

- Cheng L.**, Kellogg III E. und Packer L. (1981), Photoinactivation of catalase, *Photochemistry and Photobiology* 34, pp. 125-129
- Cohen G.**, Rapatz W. und Ruis H. (1988), Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it, *European Journal of Biochemistry* 176, pp. 159-163
- Davison A.**, Kettle A. und Fatur D. (1986), Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate, *The Journal of Biological Chemistry* 261, pp. 1193-1200
- De Boer J.** und Feierabend J. (1974), Comparison of the effects of cytokinins on enzyme development in different cell compartments of the shoot organs of rye seedlings, *Z. Pflanzenphys.* 71, pp. 261-270
- Deisseroth A.** und Dounce A. (1970), Catalase: Physical and chemical properties mechanisms of catalysis, and physiological role, *Physiological Reviews* 50, pp. 319-375
- Demming-Adams B.** und Adams III W. (1993), The xanthophyll cycle, in: *Antioxidants in higher plants*, Hg: R. G. Alscher und J. L. Hess, CRC press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp. 91-110
- Demming-Adams B.** und Adams III W. (1996), The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, *Trends in Plant Science* 1, pp. 21-26
- Douglass S.**, Criddle R. und Breidenbach R. (1973), Characterization of deoxyribonucleic acid species from castor bean endosperm, *Plant Physiol.* 51, pp. 902-906
- Durner J.** und Klessig F. (1996), Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases, *The Journal of Biological Chemistry* 271, pp. 28492-28501
- Eising R.**, Trelease R., und Ni W. (1990), Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 278, pp. 258-264
- Eising R.**, Kleff S., Roholl C. und Tenberge K. (1996), Turnover of catalase in sunflower cotyledons, in: *Compositae: Biology and utilization. Proceedings of the International Compositae Conference, Vol. 2*, Hg: P. D. S. Caligari und D. J. N. Hind, Kew, 1994, pp. 45-60, Royal Botanic Gardens, Kew
- Eising R.**, Heinze M., Kleff S. und Tenberge K. (1998), Subcellular distribution and photooxidation of catalase in sunflower. In: *Antioxidants in higher plants: Biosynthesis, characteristics, actions and specific functions in stress defense*, Hg: G. Noga und M. Schmitz, Shaker-Verlag, Aachen, pp. 53-63
- Elgersma Y.** und Tabak H. (1996), Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning, *Biochimica et Biophysica Acta* 1286, pp. 269-283
- EMBL-EBI** Datenbank: <http://www.ebi.ac.uk>
- Feierabend J.** und Beevers H. (1972), Developmental studies of microbodies in wheat leaves, *Plant Physiology* 49, pp. 28-32

- Feierabend J.** und Kemmerich P. (1983), Mode of interference of chlorosis-inducing herbicides with peroxisomal enzyme activities, *Physiologia Plantarum* 57, pp. 346-351
- Feierabend J.** und Engel S. (1986), Photoinactivation of catalase *in vitro* and in leaves, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251, pp. 567-576
- Feierabend J.**, Schaan C. und Herwig B. (1992), Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II, *Plant Physiology* 100, pp. 1554-1561
- Feierabend J.** und Dehne S. (1996), Fate of the porphyrin cofactors during the light-dependent turnover of catalase and of the photosystem II reaction-center protein D1 in mature rye leaves, *Planta* 198, pp. 413-422
- Feierabend J.**, Streb P., Schmidt M., Dehne S. und Shang W. (1996), Expression of catalase and its relation to light stress and stress tolerance, in: *Physical Stresses in Plants, Genes and their Products for Tolerance*, Hg: S. Grillo und A. Leone, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 223-234
- Fita I.** und Rossmann M. (1985), The NADPH-binding site on beef liver catalase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, pp. 1604-1608
- Fita I.** und Rossmann, M. (1985a), The active center of catalase, *Journal of Molecular Biology* 185, pp. 21-37
- Foyer C.**, Lelandais M. und Kunert K. (1994), Photooxidative stress in plants, *Physiologia Plantarum* 92, pp. 696-717
- Foyer C.** (1997), Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis, in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 587-621
- Foyer C.** und Noctor G. (2000), Tansley Review No. 112, oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling, *New Phytol.* 146, pp. 359-388
- Frederick S.** und Newcomb E. (1969), Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes), *Journal of Cell Biology* 43, pp. 343-353
- Fridovich I.** (1978), The biology of oxygen radicals, *Science* 201, pp. 875-880
- Gellissen G.**, Pinotek M., Dahlems U., Jenzelewski V., Gavagan J., DiCosimo R., Anton D. und Janowicz Z. (1996), Recombinant *Hansenula polymorpha* as a biocatalyst: Coexpression of the spinach glycolat oxidase (GO) and the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene, *Appl. Microbiol Biotechnol* 46, pp. 46-54
- Gietl C.** (1990), Glyoxysomal malate dehydrogenase from watermelon is synthesized with an amino-terminal transit peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, pp. 5773-5777
- Gietl C.**, Faber K., van der Klei I. und Veenhuis M. (1994), Mutational analysis of the N-terminal topogenic signal of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase using the heterologous host *Hansenula polymorpha*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, pp. 3151-3155

- Gietl C.** (1996), Protein targeting and import into plant peroxisomes, *Physiologia Plantarum* 97, pp. 599-608
- Glover J.**, Andrews D. und Rachubinski R. (1994), *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, pp. 10541-10545
- Guet P.**, Jouve H.-M. und Diederberg O. (1995), Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH, *Journal of Molecular Biology* 249, pp. 933-954
- Goosen M.** (1993), Insect cell culture engineering: An overview, in: *Insect cell culture engineering*, Hg: M. Goosen, A. Daugulis und P. Faulkner, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong, pp. 1-16
- Gould S.**, Keller G.-A., Hosken N., Wilkinson J. und Subramani S. (1989), A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes, *The Journal of Cell Biology* 108, pp. 1657-1664
- Green M.** und Hill H. (1984), Chemistry of dioxygen, in: *Oxygen radicals in biological systems*, *Methods in Enzymology* 105, Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, San Francisco, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, São Paulo, pp. 3-22
- Grindberg L.**, O'Brien P. und Hrkal Z. (1999), The Effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin, *Free Radical Biology and Medicine* 26, pp. 214-219
- Grotjohann N.**, Janning A. und Eising R. (1997), *In vitro* photoinactivation of catalase isoforms from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346, pp. 208-218
- Guex N.** und Peitsch M. (1997), SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18, pp. 2714-2723
- Halliwell B.** (1991), Oxygen radicals: their formation in plant tissues and their role in herbicide damage, in: *Herbicides*, Hg: N. R. Baker und M. P. Percival, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 88-129
- Hanssen H.** und Roggenkamp R. (1989), Functional complementation of catalase-defective peroxisomes in a methylotrophic yeast by import of the catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*, *European Journal of Biochemistry* 184, pp. 173-179
- Havaux M.** (1998), Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts, *Trends in Plant Science* 3, pp. 147-151
- Havir E.** und McHale N. (1987), Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves, *Plant Physiol.* 84, pp. 450-455
- Havir E.** und McHale N. (1989), Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isoenzymes of tobacco, barley and maize, *Plant Physiol.* 91, pp. 812-815
- Hayashi M.**, Aoki M., Kondo M. und Nishimura M. (1997), Changes in targeting efficiencies of proteins to plant microbodies caused by amino acid substitutions in the carboxy-terminal tripeptide, *Plant Cell Physiol.* 38, pp. 759-768

- Heck D.**, Vetrano A., Mariano M. und Laskin J. (2003), UVB light stimulates production of reactive oxygen species, *Journal of Biological Chemistry* 278 (25), pp. 22432-22436
- Heinze M.**, Reichelt R., Kleff S. und Eising R. (2000), High resolution scanning electron microscopy of protein inclusions (cores) purified from peroxisomes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons, *Cryst. Res. Technol.* 35, pp. 877-886
- Heinze M.** und Gerhard B. (2002), Plant catalases, in: *Plant Peroxisomes*, Hg: A. Baker und I. A. Graham, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, pp. 103-141
- Hertwig B.**, Streb P. und Feierabend J., (1992), Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions; *Plant Physiology* 100, pp. 1547-1553
- Hillar A.**, Nicholls P., Switala J. und Loewen P.C. (1994), NADPH binding and control of catalase compound II formation: Comparison of bovine, yeast and *Escherichia coli* enzymes, *Biochemical Journal* 300, pp. 531-539
- Imai Y.**, Matsushima Y., Sugimura T. und Terada M. (1991), A simple and rapid method for generating a deletion by PCR, *Nucleic Acids Res.* 19, pp. 2785
- Inada Y.**, Kurozumi T. und Shibata K. (1961), Peroxidase activity of hemoproteins. I. Generation of activity by acid or alkali denaturation of methemoglobin and catalase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93, pp. 30-36
- Jakopitsch C.**, Auer M., Regelsberger G., Jantschko W., Furtmüller P., Rümer F. und Obinger C. (2003), Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidase, *Biochemistry* 42, pp. 5292-5300
- Jarvis D.** (1993), Foreign gene expression in insect cells, in: *Insect cell culture engineering*, Hg: M. Goosen, A. Daugulis und P. Faulkner, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong, pp.195-219
- Jiao M.**, Liang Y., Hong-Tao L. und Wang X. (2003), Studies on the unfolding of catalase induced by urea and guanidine hydrochloride, *Acta Chimica Sinica* 61, pp. 1362-1368
- Jimenez A.**, Hernandez J., del Rio L. und Sevilla F. (1997), Evidence for the presence of the ascorbate-glutathion cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology* 114, pp. 275-284
- Kalko S.**, Gelpi J., Fita I. und Orozco M. (2001), Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase, *J. Am. Chem. Soc.* 123, pp. 9665-99672
- Kamigaki A.**, Mano S., Terauchi K., Nishi Y., Tachibe-Kinoshita Y., Nito K., Kondo M., Hayashi M., Nishimura M. und Esaka M. (2003), Identification of peroxisomal targetig signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS 1 receptor, *The Plant Journal* 33, pp. 161-175
- Kar M.**, Streb P., Hertwig B. und Feierabend J. (1993), Sensitivity to photodamage increases during senescence in excised leaves, *Journal of Plant Physiology* 141, pp. 538-544

- Karnovsky M.** (1965), A formaldehyd-glutaraldehyde fixative of high osmolaty for use in electron microscopy, *The Journal of Cell Biology* 27, pp. 137a-138a
- Keren N., Berg A., van Kan P., Levanon H. und Ohad I.** (1997), Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, pp. 1579-1584
- Kleff S., Sander S., Mielke G, Eising R.** (1997), The predominant protein in peroxisomal cores of sunflower cotyledons is a catalase that differs in primary structure from the catalase in the peroxisomal matrix, *European Journal of Biochemistry* 254, pp 402-410
- Kirkman H. und Gaetani G. F.** (1984), Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, pp. 4343-4347
- Kirkman H., Galiano S., Gaetani G.** (1987), The function of catalase-bound NADPH, *The Journal of Biological Chemistry* 262, pp. 660-666
- Kirkman H., Rolfo M., Ferraris A. und Gaetani G.** (1999), Mechanisms of protection of catalase by NADPH, *The Journal of Biological Chemistry* 274, pp. 13908-13914
- Körner C.** (1999), *Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Kono Y. und Fridovich I.** (1982), Superoxide radical inhibits catalase, *The Journal of Biological Chemistry* 257, pp. 5751-5754
- Kost T. A. und Condreay J.A.** (1999), Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells, *Current Opinion in Biotechnology* 10, pp. 428-433
- Kragler F., Langeder A., Binder M. und Hartig A.** (1993), Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Cell Biology* 120, pp. 665-673
- Kujumdzieva A., Petrova V. und Rasheva T.** (2002), Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*, *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5, pp. 29-41, <http://www.ejb.org/content/vol5/issue1/full/6>
- Kurzok H.-G. und Feierabend J.** (1984), Comparison of a cytosolic and a chloroplast triosephosphat isomerase isoenzyme from rye leaves, *Biochimica et Biophysica Acta* 788, pp. 222-233
- Kuzio, J. und Faulkner P.** (1993), An overview of the molecular biology and applications of baculoviruses, in: *Insect cell culture engineering*, Hg: M. Goosen, A. Daugulis und P. Faulkner, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong, pp.17-50
- Lapinskas P., Ruis H. und Culotta V.** (1993), Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* catalase gene expression by copper, *Current Genetics* 24, pp. 388-393
- Lardinois O., Mestdagh M. und Rouxhet P.** (1996), Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in the presence of hydrogen peroxide, *Biochimica et Biophysica Acta* 1295, pp. 222-238

- Lehninger A.** (1983), Biochemie, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach Florida, Basel
- Levine R.**, Mosoni L., Berlett B. und Stadtman E. (1996), Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, pp. 15036-15040
- Lidon F.** und Henriques F. (1993), Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts, Photosynthetica 29, pp. 249-279
- Lledias F.**, Rangel P. und Hansberg W. (1998), Oxidation of catalase by singulet oxygen, The Journal of Biological Chemistry 273, pp. 10630-10637
- Loewen P.** (1997), Bacterial catalases in: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.273-308
- Luckow V.** und Summers M. (1988), Trends in development of baculovirus expression vectors, Bio/Technology 6, pp. 47-55
- Luckow V.** (1991), Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors, in: Recombinant DNA technology and applications, Hg: A. Prokop und R. Bajpani, McGraw-Hill, New York, pp. 97-153
- Lowry O.H.**, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951), Protein measurement with the Folin Phenol reagent, Journal of Biological Chemistry 193, pp. 265-275
- Margoliash E.** und Novegrodsky A. (1958), Inhibition of catalase by 3-Amino-1,2,4-triazol, Biochemical Journal 68, pp. 468-475
- Margoliash E.** und Schejter A. (1962), Kinetics of the irreversible inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazol in the presence of hydrogen peroxide and catalase-hydrogen peroxide complex I hydrogen donors, The Journal of Biological Chemistry 237, pp. 2359-2363
- Mate M.**, Sevinc M., Hus B., Bujons J., Bravo J., Switala J., Ens W., Loewen P. und Fita I. (1999), Mutants that alter the covalent structure of catalase hydroperoxidase II from *Escherichia coli*, The Journal of Biological Chemistry 274, pp. 27717-27725
- Mate M.**, Ortiz-Lombardia M., Marina A. und Fita I. (1999a), Crystallization and preliminary structural results of catalase from human erythrocytes, Acta Crystallographica Section D 55, pp. 1066-1068
- Mate M.**, Zamocky M., Nykyri L., Herzog C., Alzari P., Betzel C., Koller F. und Fita I. (1999b), Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Molecular Biology 286, pp. 135-139
- Mateos R.**, Leon A., Sandalio L., Gomez M., del Rio L. und Palma J. (2003), Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum*): Purification, characterization and antioxidant activity, Journal of Plant Physiology 160, pp. 1507-1516
- McNew J.** und Goodman J. (1994), An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*, The Journal of Cell Biology 127, pp. 1245-1257

- McNew J.** und Goodman J. (1996), The targeting and assembly of peroxisomal proteins: Some old rules do not apply, *Trends in Biochemical Sciences* 21, pp. 54-58
- Melik-Adamyan W.**, Bravo J., Carpena X., Switala J., Mate. M. und Fita I. (2001), Substrate flow in catalase deduced from the crystal structures of active site variants HPII from *Escherichia coli*, *Proteins* 44, pp. 270-281
- Middlekoop E.**, Wiemer E., Schoenmaker D., Strijland A. und Tager J. (1993), Topology of catalase assembly in human skin fibroblasts, *Biochimica et Biophysica Acta* 1220, pp. 15-20
- Mittler R.** (2002), Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science* 7, pp. 405-410
- Moskovitz J.**, Rahman M., Strassman J., Yancey S., Kushner S., Brot N. und Weissbach H. (1995), *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: Regulation of expression and role in protecting against oxidative damage, *Journal of Bacteriology* 177, pp. 502-507
- Moskovitz J.**, Weissbach H. und Brot N. (1996), Cloning and expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, pp. 2095-2099
- Moskovitz J.**, Berlett B., Poston J. und Stadtman E. (1997), The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, pp. 9585-9589
- Mullen R.**, Lee M. und Trelease R. (1997), Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase, *The Plant Journal* 12, pp. 313-322
- Mullineaux P.** und Creissen G. (1997), Glutathione reductase: Regulation and role in oxidative stress, in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 667-713
- Murphy L.**, Harris D., Barrell B. G., Rajandream M. A. and Walsh S. V. submitted sequence from nucleic acid CATA_YEAST P15202 to EMBL/GenBank/DDBJ databases MAR-1995, Swiss-Prot. Database, <http://us.expasy.org>
- Murshudov G.**, Melik-Adamyan W., Grebenko A., Barynin V., Vagin A., Vainshtein B., Dauter Z. und Wilson K. (1992), Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution, *FEBS Letters* 312, pp. 127-131
- Murthy M.**, Reid III T., Sicignano A., Tanaka N. und Rossmann M. (1981) Structure of beef liver catalase, *Journal of Molecular Biology* 152, pp. 465-499
- Nakatani M.** (1961), Studies on histidine residues in hemeproteins related to their activities, *The Journal of Biochemistry* 49, pp. 98-102
- Nemoto S.**, Otsuka M. und Arakawa N. (1997), Effect of high concentration of ascorbate on catalase activity in cultured cells and tissues of guinea pigs, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 43, pp. 297-309

- Nicholls P.** (1964), The reactions of azide with catalase, *Biochemical Journal* 90, pp. 331-343
- Nicholls P.**, Fita I. und Loewen P. (2001), Enzymology and structure of catalases, *Advances in Inorganic Chemistry* 51, pp. 51-106
- Noctor G.** und Foyer C. (1998), Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, pp. 249-279
- Noctor G.**, Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L. und Foyer C. (2002), Drought and oxidative load in the leaves of C₃ plants: A predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89, pp. 841-850
- Ogura Y.** und Yamazaki I (1983), Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide, *Journal of Biochemistry* 94, pp. 403-408
- O'Reilly D.**, Miller L. and Luckow V.(1992): *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual.* W. H. Freeman and Company, New York
- Oshino N.**, Oshino R., Chance B.(1973), The characteristics of the 'peroxidatic' reaction of catalase in ethanol oxidation, *Biochemical Journal* 131, pp. 555-567
- Osmond C.** und Grace S. (1995), Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field-quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis, *Journal of Experimental Botany* 46, pp. 1351-1362
- Pallett K.** und Young A. (1993), Carotenoids, in: *Antioxidants in higher plants*, Hg: R. G. Alscher und J. L. Hess, CRC press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp. 91-110
- Payne M.**, Petrillo K., Gavagan J., DiCosimo R., Wagner L. und Anton, D. (1997), Engineering *Pichia pastoris* for biocatalysis: Co-production of two active enzymes, *Gene* 194, pp. 179-182
- Petrova V.**, Drescher A., Kujumdzieva A. und Schmitt M. (2004), Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria, *Biochemical Journal* 380, pp. 393-400
- Pfündel E.** und Bilger W. (1994), Regulation and possible function of the violaxanthin cycle, *Photosynthesis Research* 42, pp. 89-109
- Polle A.** (1997), Defense against photooxidative damage in plants, in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 623-666
- Pulitz Z.**, Kubasek J., Duchene M., Marget M., Von Specht B. und Dornedy H. (1990), Antibody production in baculovirus-infected insect cells, *Biotechnology* 8 pp 651-654
- Purdue P.** und Lazarow P. (1996), Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence, *The Journal of Cell Biology* 134, pp. 849-862

- Putnam C.**, Arvai A., Bourne Y. und Tainer J. (2000), Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism, *Journal of Molecular Biology* 296, pp. 295-309
- Rachubinski R.** und Subramani S. (1995), How proteins penetrate peroxisomes, *Cell* 83, pp. 525-528
- Rehling P.** und Kunau W.-H. (1996), Das Peroxisom - ein etwas anderes Organell, *Biospektrum* 5/96, pp. 16-22
- Rehm H.** (1997), *Der Experimentator: Proteinbiochemie*, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Ruis H.** und Koller F. (1997), Yeast and fungal catalases, in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.309-342
- Sadanandom A.**, Poghosyan Z., Fairbairn D. und Murphy D. (2000), Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 123, pp. 255-263
- Salin M.** (1987), Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast, *Physiologia Plantarum* 72, pp. 681-689
- Sambrook J.**, Fritsch E. und Maniatis T. (1989), *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second Edition, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F.**, Nicklen S. und Coulson A. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, pp. 5463-5467
- Scandalios J.** (1990), Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress, in: *Advances in Genetics* 28, pp. 1-41
- Scandalios J.** (1994), Regulation and properties of plant catalases, in: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, Hg: C. Foyer und P. Molineaux, pp. 275-315
- Scandalios J.**, Guan L. und Polidoros A. (1997), Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation and expression, in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Hg: J. Scandalios, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 343-406
- Schmidt M.** und Feierabend J. (2000), Characterization of cDNA nucleotide sequences encoding two differentially expressed catalase isoenzyme polypeptides from winter rye (*Secale cereale* L.), *Plant Physiol.* 122, pp. 1457
- Schmidt M.**, Dehne S. und Feierabend J. (2002) Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the hemin cofactor and reversible changes of the translational efficiency of mRNA, *The Plant Journal* 31, pp. 601-613

- Sevinc M.**, Mate M., Switala J., Fita I. und Loewen P. (1999), Role of the lateral channel in catalase HPII of *Escherichia coli*, Protein Science 8, pp. 490-498
- Shang W.** und Feierabend J. (1999), Dependence of catalase photoinactivation in rye leaves on light intensity and quality and characterization of a chloroplast-mediated inactivation in red light, Photosynthesis Research 59, pp. 201-213
- Shang W.**, Schmidt M. und Feierabend J. (2003), increased capacity for synthesis of the D1 protein and of catalase at low temperature in leaves of cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.), Planta 216, pp. 865-873
- Sichak S.** und Dounce A. (1986), Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase, Archives of Biochemistry and Biophysics 249, pp. 285-295
- Sjöling S.** und Glaser E. (1998), Mitochondrial targeting peptides in plants, Trends in Plant Science 3, pp. 136-140
- Smith P. K.**, Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Garther F. K., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., und Klenk D. C. (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal. Biochem. 150, pp. 75-85
- Southern E.** (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, Journal of Molecular Biology 8, pp. 503-517
- Spurr A.** (1969), A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, Ultrastructure Res. 26, pp. 31
- Sreekrishna K.**, Brankamp R., Kropp K., Blankenship D., Tsay J., Smith P., Wierschke J., Subramaniam A., Birkenberger L. (1997), Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Gene 190, pp. 55-62
- Steinbiß H.-J.**, (1983), Photo- und metabolische Regulation der Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase bei *Chlorogonium elongatum*, Doktorarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen
- Straßburger E.**, Noll F., Schenk H. und Schimper A. (1998), Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, neubearbeitet von: Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer und Bresinsky, 34. Auflage, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Streb P.**, Michael-Knauf A. und Feierabend J. (1993), Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions, Physiologia Plantarum 88, pp. 590-598
- Streb P.** (1994), Lichtschäden und Stresswirkungen in Blättern und antioxidative Schutzmechanismen, Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Streb P.** und Feierabend J. (1996), Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves, Botanica Acta 109, pp. 125-132

- Streb P.**, Feierabend J. und Bligny R. (1997), Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants, *Plant Cell and Environment* 20, pp. 1030-1040
- Streb P.**, Shang W., Feierabend J. und Bligny R. (1998), Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants, *Planta* 207, pp.313-324
- Streb P.**, Shang W. und Feierabend J. (1999), Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress, *Plant, Cell and Environment* 22, pp. 1211-1223
- Streb P.**, Aubert, S., Gout E. und Bligny R. (2003), Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*, *Journal of Experimental Botany* 54, pp. 405-418
- Subramani S.** (1996), Convergence of model systems for peroxisome biogenesis, *Current Opinion in Cell Biology* 8, pp. 513-518
- Summers M. D.** und Smith G. E. (1987), A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, *Texas Agric. Exp. Sta. Bull.* 1555
- Swiss-Prot.** Datenbank, <http://us.expasy.org>
- Switala J.** und Loewen P. (2002), Diversity of properties among catalases, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401, pp. 145-154
- Tenberge K. B.** und Eising R. (1995), Immunogold labelling indicates high catalase concentrations in amorphous and crystalline inclusions of sunflower (*Helianthus annuus* L.) peroxisomes, *The Histochemical Journal* 27, pp. 184-195
- Tenberge K. B.**, Ruholl C., Heinze M. und Eising R. (1997), Purification and immunoelektron microscopical characterization of crystalline inclusions from plant peroxisomes; *Protoplasma* 196, pp. 142-154
- Thomas T.** und Trelease R. (1981), Cytochemical localization of glycolat oxidase in microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in higher plant tissues with the CeCl₃ technique, *Protoplasma* 108, pp. 39-53
- Trebst A.**, Depka B. und Holländer-Czytko H. (2002), A specific role for tocopherol and of chemical singulet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Letters* 516, pp. 126-160
- Trelease R.**, Xie W. Lee, M. und Mullen, R. (1996), Rat liver catalase is sorted to peroxisomes by its C-terminal tripeptide Ala-Asn-Leu, not by the internal Ser-Lys-Leu motif, *European Journal of Cell Biology* 71, pp. 248-258
- Tytler E.**, Wong T. und Codd G. (1984), Photoinactivation *in vivo* of superoxide dismutase and catalase in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *FEMS Microbiology Letters* 23, pp. 239-242

- Vainshtein B.**, Melik-Adamayan W., Barynin V., Vagin A., Grebenko A., Borisov V., Bartels K., Fita I. und Rossmann M. (1986), Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2,0 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* 188, pp. 49-61
- Vaughn K.** (1989) Subperoxisomal localization of glycolate oxidase, *Histochemistry* 91, pp. 99-105
- Vogt W.** (1995), Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets and reversal, *Free Radical Biology and Medicine* 18, pp. 93-105
- Volk S.** und Feierabend J. (1989), Photoinactivation of catalase at low temperature and its relevance to photosynthetic and peroxide metabolism in leaves, *Plant Cell and Environment* 12, pp. 701-712
- Willekens H.**, Chamnongpol S., Van Montagu M., Inze D. und Van Camp W. (1995), Role of H₂O₂ and H₂O₂-scavenging enzymes in environmental stress, *AgBiotech News and Information* 7, pp. 189N-195N
- Willekens H.**, Inze D., Van Montagu M. und Van Camp W. (1995a), Catalases in plants, *Molecular Breeding* 1, pp. 207-228
- Willekens H.**, Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inze D. und Van Camp W. (1997), Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants, *The EMBO Journal* 16, pp. 4806 – 4816
- Wise R.** (1995), Chilling-enhanced photooxidation: The production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light, *Photosynthesis Research* 45, pp. 79-97
- Wu J.**, Neimanis S. und Heber U. (1991), Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition, *Botanica Acta* 104, pp. 283-291
- Yang Q.** und DePierre J. (1998), Rapid one-step isolation of mouse liver catalase by immobilized metal ion affinity chromatographie, *Protein Expression and Purification* 12, pp. 277 –283
- Young A.** und Britton G (1990), Carotenoids and stress, in: *Stress response in plants: Adaptation and acclimation mechanisms*, Wiley-Liss Inc., New York, pp. 87-112
- Zamocky M.**, Herzog C., Nykyri L. und Koller F. (1995), Site-directed mutagenesis of the lower parts of the major substrate channel of yeast catalase A leads to highly increased peroxidatic activity, *FEBS Letters* 367, pp. 241-245
- Zamocky M.** und Koller F. (1999), Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 72, pp. 19-66

Posterpräsentationen

Teile dieser Arbeit sind auf folgenden Konferenzen als Posterpräsentation veröffentlicht worden:

Engel N., Schmidt M. und Feierabend J. (2000), Comparison of amino acid sequences of catalases with different light sensitivity and of their properties after expression in baculovirus-infected insect cells, Third conference on the biochemistry, physiology, ecology and population biology of arctic and alpine plants in Villar d'Arene, Frankreich, August 2000.

Engel N., Schmidt M. und Feierabend J. (2001), Identification, heterologous expression and comparison of functional and structural properties of a light-stable catalase from *Homogyne alpina* leaves, Conference of Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants, Nizza, Frankreich, November 2001.

Engel N., Schmidt M. und Feierabend J. (2003), Heterologous expression of plant catalases from alpine and non-alpine plants and comparison of their light-sensitivity, 4th Conference in Biochemistry, Ecophysiology and Population Biology of Alpine and Polar Plants in Trins, Österreich, Juli 2003.

Engel N., Schmidt M. und Feierabend J. (2003), Heterologous expression of plant catalases from alpine and non-alpine plants and comparison of their light-sensitivity, Conference on Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants, Freising-Weihenstephan, September 2003.

Veröffentlichungen

Teile der Arbeit werden veröffentlicht in:

Engel N., Schmidt M., Lütz C. und Feierabend J. (2004), Heterologous expression and comparison of structural and functional properties of plant catalases showing different sensitivities to photooxidative inactivation, Manuskript in Vorbereitung

7. Anhang

Secale cereale, CAT-1, 1685 bp, 492 Aminosäuren, MG: 56,6 kDa

	cttcactccaggaaggatgggatccctgcaagttccggccgctcgagcagcttcgacacc	58
	F T P G R <u>M</u> D P C K F R P S S S F D T	14
59	aagacgacgacgacgaacccccggccagccggtgtggaacgacaacgaggcgctcaccgtc	118
15	K T T T T N P G Q P V W N D N E A L T V	34
119	ggccccgctggccccgatcctgctggaggactaccacctgctggagaagatcgcccacttc	178
35	G P R G P I L L E D Y H L L E K I A H F	54
179	gcgcgcgacatccccggagcccttcgctccacgccggggcgcgcttccgccaagggttcttc	238
55	A R D I P E P F V H A G R A S A K G F F	74
239	gagtgcacccacgacgacgacgggacctcactgcgccgacttccctcccctcgccccggggcg	298
75	E C T H D V T G L T C A D F L P S P G A	94
299	ggaacgcccggatcgctccgcttctccaccgctcatccacgagcgcggtcccccgagacc	358
95	G T P V I V R F S T V I H E R G S P E T	114
359	atccgacgacccccgcggttccgcccgtcaagttctacacgcgcgagggcaactgggacctc	418
115	I R D P R G F A V K F Y T R E G N W D L	134
419	ctcggcaacaacttccccgctcttcttcatccgacgacggcatcaagttccccgacgctcatc	478
135	L G N N F P V F F I R D G I K F P D V I	154
479	cacgccttcaagcccaaccccccaagtcccacgtgcaggagtactggcgggtcttcgacttc	538
155	H A F K P N P K S H V Q E Y W R V F D F	174
539	cttcctcaccacccccgagagcctccacaccttcttcttcttcttcttcgacgacgctcggcatc	598
175	L P H H P E S L H T F F F L F D D V G I	194
599	cccaccgactaccgccacatggacgggttccggcgtaaacacctacaccttcgacccccgc	658
195	P T D Y R H M D G F G V N T Y T F V T R	214
659	gccggcaagtcccactacatcaagttccactggcgccccacctgcgcgctcagctgcctc	718
215	A G K S H Y I K F H W R P T C G V S C L	234
719	atggacgacgaggccaccctcgctcggcggaagaaccacagccacgccaccaggacctc	778
235	M D D E A T L V G G K N H S H A T Q D L	254
779	tacgactccatcgacgcccggtaacttccccgagtggaagctcttcgctgcaggctcatcgac	838
255	Y D S I D A G N F P E W K L F V Q V I D	274
839	cccgagcagcaggaccgctttgacttcgacccgctcgacgacaccaagacgtggccccgag	898
275	P E Q Q D R F D F D P L D D T K T W P E	294
899	gacctcgtccccctccagcccgtggggcgccctcgctcgaccgcaacgctcgacaacttc	958
295	D L V P L Q P V G R L V L D R N V D N F	314
959	ttcaacgagaacgagcagctcgcggttcggccccggcctcgctcgtgccccgggatctaactac	1018
315	F N E N E Q L A F G P G L V V P G I Y Y	334
1019	tccgacgacaagatgctgcagtgacgggtgttcgcctacgccgacacgcagcgtaccgc	1078
335	S D D K M L Q C R V F A Y A D T Q R Y R	354

1079 ctggggccaaattacctgatgctccccgtcaacgcgcccaggcggttcaagaagaac 1138
 355 L G P N Y L M L P V N A P K C G F K K N 374

1139 cactacgacggcgccatgaacttcatgcaccgcgacgaggagggtggactactaccctca 1198
 375 H Y D G A M N F M H R D E E V D Y Y P S 394

1199 cgtcacgcgcccgtccggcagcccagccggcagcttccccgtgccgacgcggcccgtc 1258
 395 R H A P L R H A E P A S F P V P T R P V 414

1259 gtcggaaaaagggagaagacgaggatcaagaaggagaacgacttcgtgcagcccggggag 1318
 415 V G K R E K T R I K K E N D F V Q P G E 434

1319 aggtaccgcagctggggcgcccagccagcaggacaggttcgtcgcccttcgccgacgcctc 1378
 435 R Y R S W A P D R Q D R F V A L R R R L 454

1379 gccaccccaagggtcagccacgagctccgcgtcatctggatcgacttcctctccaagtgt 1438
 455 A H P K V S H E L R V I W I D F L S K C 474

1439 gacaagtcgtgcccggatgaaggtggcgaaccgtctcaacgtgaagccaagcatgtgatga 1498
 475 D K S C G M K V A N R L N V K P S M *

1499 tggacctgccatggatgatgaatggaccgttctgtgtgtaaaatgtgtctatatcatgg 1558
 W T C H G * * M D R S V C K I C A I S W

1559 accagcaataagagaccatgccagctactgtggatcatgtggtcgattagctactgtgct 1618
 T S N K R P C Q L L W I M W S I S Y C A

1619 actaataagttactatcttttgttacagtaaactgcatgtactgcagcttaaactaaagt 1678
 T N K L L S F V T V N C M Y C S L N * S

1679 ggggtact 1685
 G Y

Soldanella alpina, CAT-1, 1772 bp, 492 Aminosäuren, MG: 56,9 kDa

1 tcttttctgctgcttctccacctaagcttttctctcacctccgcatggatccttacaagtac 60
 L F C R S P P K L S L T S A M D P Y K Y 6
 61 cgctcttcaagtgcctttcaacactcctttctggaccacaaattcaggtgctccagtgtgg 120
 7 R S S S A F N T P F W T T N S G A P V W 26
 121 aacaacaactcctcattgactggttgaaccagagggccaattttgcttgaggattaccat 180
 27 N N N S S L T V G T R G P I L L E D Y H 46
 181 ctagtggagaagcttgcaaatTTTgacagggagcgtatcccagaacgtgctgacatgct 240
 47 L V E K L A N F D R E R I P E R V V H A 66
 241 agaggagcaagtgcctaagggctTTTTcgaggttacacatgacatttctcaccttacttgt 300
 67 R G A S A K G F F E V T H D I S H L T C 86
 301 gccgatttcttaagagctccaggtgtccagacgccagttattggttcttctccactggt 360
 87 A D F L R A P G V Q T P V I V R F S T V 106
 361 attcatgaacgtggtagccctgagactccttagggaccctcgtggTTTTgcagtgaaattc 420
 107 I H E R G S P E T L R D P R G F A V K F 126
 421 tacacaagagagggtaactTTTgacttggTgggaacaatttcccagTTTTcttTgttctg 480
 127 Y T R E G N F D L V G N N F P V F F V R 146
 481 gatggaatgaaatttcccagacatggTccatgctcttaagcccaaccccaagtcacacatt 540
 147 D G M K F P D M V H A L K P N P K S H I 166
 541 caggaattggagaataactcgacttcttctctcaccacccagagagtttgcataTgttc 600
 167 Q E N W R I L D F F S H H P E S L H M F 186
 601 actttcTTTTcgacgatcttTggtgTtccgcaagattacaggcacatggaaggtcgggt 660
 187 T F L F D D L G V P Q D Y R H M E G S G 206
 661 gtgaatacatacacattaataaataaagctggaaaagctcaatatgttaagttccattgg 720
 207 V N T Y T L I N K A G K A Q Y V K F H W 226
 721 aaacctacatgtggagtgaaatgTttattagaagatgaggcaataaaggtcggaggcgca 780
 227 K P T C G V K C L L E D E A I K V G G A 246
 781 aatcatagtcacgccacgaaggatctatacgactcgatatcagctggaaattatcctgaa 840
 247 N H S H A T K D L Y D S I S A G N Y P E 266
 841 tggaaactctttattcagataatagagcctgatcatgaggataaattcgactttgatcca 900
 267 W K L F I Q I I E P D H E D K F D F D P 286
 901 cttgatgtgacaaaaactTggcctgaggatatcatacccttgatgcctgtgggtcgcttg 960
 287 L D V T K T W P E D I I P L M P V G R L 306
 961 gtgttgaacaaaaatatcgataatttctTtgcagaaaatgagcaattggcgttttgccca 1020
 307 V L N K N I D N F F A E N E Q L A F C P 326
 1021 gctcttatagtgccTggtgTttattattcggacgataagctgctccaaactcggatattt 1080
 327 A L I V P G V Y Y S D D K L L Q T R I F 346
 1081 tcttatgctgatacccaaaggcaccgtctTggacctaattatctgcagcttccacctaatt 1140
 347 S Y A D T Q R H R L G P N Y L Q L P P N 366
 1141 gcccctaagtgtgcccatacaacaatcaccatgagggTcttatgaactttatgcacaga 1200
 347 A P K C A H H N N H H E G L M N F M H R 386

1201 gatgaggaggtgaactat~~tttcccttcaaggttc~~gatccag~~tacgtcatgctgagaggcac~~ 1260
387 D E E V N Y F P S R F D P V R H A E R H 406

1261 ccaatccctcctcctgtcttgaccggaaagcgcgacaggtgcatgattgagaaagagaaac 1320
407 P I P P P V L T G K R D R C M I E K E N 426

1321 aatttcaagcagcctggagagagatacagaacctttgcaccagacaggcaagaacggttt 1380
427 N F K Q P G E R Y R T F A P D R Q E R F 446

1381 gtctgcaggtggggtgatgctttatctgaccacgtgtcaccatgaaatccgcagcatc 1440
447 V C R W V D A L S D P R V T H E I R S I 466

1441 tggatttctgtactggactcagggcgacaaaatctctgggacagaaattagcatctcgcttg 1500
467 W I S Y W T Q A D K S L G Q K L A S R L 486

1501 aatgtgaggccaaccatgtgaagttcatactgagttggatgtttcgagttgcagcagagt 1560
487 N V R P T M * S S Y * V G C F E L Q Q S

1561 gtgtaatagagagaataactcaaaagctgcataaactactgtctaaattggggttattgcc 1620
V * * R E * L K S C I N Y C L N W V I A

1621 cttttcttgtactgtactatagaaaccaagttgcatggttatgtgtgtgactttcatctt 1680
L F L Y C T I E T K L H G Y V C D F H L

1681 ccgatttcccataatctaataaattggaaaattctatggacttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1740
P I S H I * * I G K F Y G L K K K K K K K

1741 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1772
K K K K K K K K K K

Homogyne alpina, CAT-1, 1725 bp, 492 Aminosäuren, MG: 56,7 k Da

1 atggatccttacaagcagcggccggcaagcgttacaactccccggtttttgaccacaaatgccggt 66
1 M D P Y K Q R P A S A Y N S P F L T T N A G 22

67 ttacctgtttacaacaataactgcatcattgactgtcggaaatagagggtccaattctgctt 126
23 L P V Y N N T A S L T V G N R G P I L L 42

127 gaggactatcatttgattgagaaacttgccaattttactcgtgaacgaattccagaacgt 186
43 E D Y H L I E K L A N F T R E R I P E R 62

187 attgtccatgcaagagggtgcaagtgcaaagggattcttcgagggtcacacatgacatcact 246
63 I V H A R G A S A K G F F E V T H D I T 82

247 catctcacttgtgctgatttcccttcgccccaggagttcaaactcctaccatcgttcgt 306
83 H L T C A D F L R A P G V Q T P T I V R 102

307 ttctctactgttatccatgaacgtggaagccccgaaactatcagagatccccgaggtttt 366
103 F S T V I H E R G S P E T I R D P R G F 122

367 gcaacaaaatttatatacccgagagggtaactttgatattggtgaaacaatttccccggtc 426
123 A T K F Y T R E G N F D I V G N N F P V 142

427 ttttttactcgtgatgcaatggcattccctgatgtgattcacgcgtttaaaccaaaccg 486
143 F F T R D A M A F P D V I H A F K P N P 162

487 aagtcacacatccaagaagactggagaattctcgcacttcttatcacaccatccccgagagt 546
163 K S H I Q E D W R I L D F L S H H P E S 182

547 ttaaacacaatgacattctggcttgatgacatcgggtatcccaacagattaccgacacatg 606
183 L N T M T F W L D D I G I P T D Y R H M 202

607 gaaggctcaagtgtcaacgctctaactctagtaaacaagaaggaaaatgcactatgtg 666
203 E G S S V N A L T L V N K E G K M H Y V 222

667 aaattcacatggaaaccaacttgtggagtcaaatgtttaatggacgaagaagcaatcaaa 726
223 K F T W K P T C G V K C L M D E E A I K 242

727 atcggaggagctaatacacagtcatgccaccaagatctttacgactcgcattcaagctggt 786
243 I G G A N H S H A T Q D L Y D S I Q A G 262

787 aatttccctgaatggaagttgtttcttcaagttattgatcctgatcatgaagatcggctt 846
263 N F P E W K L F L Q V I D P D H E D R L 282

847 gactttgaccgcttgatgggacaatgacatggcctgatgacatcattcctttgcagcct 906
283 D F D P L D G T M T W P D D I I P L Q P 302

907 gttggaaggatggttttgaataagaatatcgacaacttctttgctgagaatgaacagctg 966
303 V G R M V L N K N I D N F F A E N E Q L 322

967 gcgcttaaccgggcttggttctcctgggatttattattctgatgataagatgctccaa 1026
323 A L N P G L V V P G I Y Y S D D K M L Q 342

1027 ggtcgaatctttgcgtattctgatactcagaggcaccgtcttggaccaaattaccttcag 1086
343 G R I F A Y S D T Q R H R L G P N Y L Q 362

1087 cttcctgttaatgvcgctaaatgtgctcatcgtaataatcactatgatggaaatgatgaat 1146
363 L P V N A P K C A H R N N H Y D G N M N 382

1147 ttcatgcacagagatgaggagggttgattacttcccttcgagggtatgatcgtgttcagcat 1206
383 F M H R D E E V D Y F P S R Y D R V Q H 402

1207 gctcagaagtacccgatcagtcctgctaaggttaccggaactcgtgataggactggtatc 1266
403 A Q K Y P I S P A K V T G T R D R T V I 422

1207 ccgaaagctaattgatttcaagcagccgggagagatacagatcatgggaaccagacagg 1326
423 P K A N D F K Q P G E R Y R S W E P D R 442

1327 caagaacgattcattatccgaatggttaagatgttgtctgaccacgggtcacccatgag 1386
443 Q E R F I I R M V K M L S D P R V T H E 462

1387 ctccgcagtatttggatctcatactggaccaggctgaccagtctctggggcagaagata 1446
463 L R S I W I S Y W T Q A D Q S L G Q K I 482

1447 gcatcacgcctcaatgtgcgccccaactattgaaacataaaaagtctttggaccgctctcta 1506
483 A S R L N V R P N Y * T * K S L D P S L

1507 agtttgttttatgtatgaagtcaatgtttgcagtccttttgttttgtaaatatttccgttt 1566
S L F Y V * S Q C L Q S F C F V I F P F

1567 cttaggaccttgaacttagaataagtgcacactcgatgtgcttaagttacagtgtgtca 1626
L K D L E L R I S A H S M C L S Y S V S

1627 ggttccattgggtttgaggcacacaagttatgtaagttgcttactgccatctatttaatg 1686
G S I G F E A H K L C K L L T A I Y L M

1687 catatgtttttgtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1725
H M F L * K K K K K K K K

Helianthus annuus CATA3, 1859 bp, 492 Aminosäuren, MG: 56,97 kDa

1 ctctctactgtcttattcttctactctctattcaagatcatgggatccctacaagcaacgcct 60
 S L L S Y L H S L F K I M D P Y K Q R P 8
 61 tcaagtgttacaacgccccctttctggactacaaatgcggtttaccgggtttacaacaac 120
 9 S S A Y N A P F W T T N A G L P V Y N N 28
 121 actgcatcattgactggttgaaatcgagggtccaattctccttgaggactatcatttgatt 180
 29 T A S L T V G N R G P I L L E D Y H L I 48
 181 gagaaacttgccaacttctcctcgagcggatccccgaacgtatcgttcatgaggggt 240
 49 E K L A N F T R E R I P E R I V H A R G 68
 241 gcgagcgcgaaaggggttcttctggaggtcacacacgacatcactcatctcacctgctgac 300
 69 A S A K G F F E V T H D I T H L T C A D 88
 301 ttctcctcgccccctggagttcaaactcctaccattggttcggttctcctgactggtatccat 360
 89 F L R A P G V Q T P T I V R F S T V I H 108
 361 gaacgtggaagccccgaaaccatccgagatccccgaggatttgcaacaagttctacacc 420
 109 E R G S P E T I R D P R G F A T K F Y T 128
 421 agagagggttaactttgacatcgtgggaaacaatttccccgtggttctttacgcgcgacgca 480
 129 R E G N F D I V G N N F P V F F T R D A 148
 481 atggcgttcccagacgtgatccacgcgtttaaaccgaaacccgaagtccacacatccaagaa 540
 149 M A F P D V I H A F K P N P K S H I Q E 168
 541 gactggaggattccttgacttcttctgtcacaccatccagagagcttgaacaccatgacattc 600
 169 D W R I L D F L S H H P E S L N T M T F 188
 601 tggctcgcgatgatgctcgggtatcccaaccgattaccgacacatggaaggctcgcgatgcaac 660
 189 W L D D V G I P T D Y R H M E G S S V N 208
 661 actctcacttttagttaacaaagaaggaaaaattcactatgtgaagttcacatggaagccc 720
 209 T L T L V N K E G K I H Y V K F T W K P 228
 721 acatgtggagtcgaaatggttgatggacgacgaagcgcgatcaaaatcggaggcgcgaatcac 780
 229 T C G V K C L M D D E A I K I G G A N H 248
 781 agtcacgccactcaagatctttacgattcgatccaagctggttaacttccctgaatggaag 840
 249 S H A T Q D L Y D S I Q A G N F P E W K 268
 841 ctgtatctccaagtgattgaccctgatcatgaagataggcttgactttgaccgctcgcgat 900
 269 L Y L Q V I D P D H E D R L D F D P L D 288
 901 ggcaccatgacctggccccgaggacatcatacctttgcagcccgttgggcgtatgggtgttg 960
 289 G T M T W P E D I I P L Q P V G R M V L 308
 961 aacaagaacattgacaacttcttctgtgaaaatgaacagctagcgttcaaccgggtctt 1020
 309 N K N I D N F F A E N E Q L A F N P G L 328
 1021 gttgttccctgggatttattactctgatgataagatgcttcaagggcgtattttcgcgtac 1080
 329 V V P G I Y Y S D D K M L Q G R I F A Y 348
 1081 tctgatacccaaaggcaccgtctcggaccgaattacttgcagctccctgtcaatgcacct 1140
 349 S D T Q R H R L G P N Y L Q L P V N A P 368
 1141 aagtgtgctcatcataataatcattatgatggaacatgaacttcatgcacagagatgag 1200
 369 K C A H H N N H Y D G N M N F M H R D E 388

1201 gaggttgattacttcccttcgaggtatgatcgtggttcaacatgctaagcagtacccgatc 1260
389 E V D Y F P S R Y D R V Q H A K Q Y P I 408

1261 aattcccggtcaagttactggaacccgtgacaggactgtgatcccaaaaatacaacgatttc 1320
409 N S R Q V T G T R D R T V I P K Y N D F 428

1321 aagcagcccggagacagataccgatcatgggatccagccaggcaagaaagattcattgtc 1380
429 K Q P G D R Y R S W D P A R Q E R F I V 448

1381 cgaatgtgtaagatggtgtctgacccacgggtaaccacgaactccgcagtatttggatc 1440
449 R M C K M L S D P R V T H E L R S I W I 468

1441 tcctactggacccaggccgaccagtctctggggcagaagatagcatcacgcctcaatgtg 1500
469 S Y W T Q A D Q S L G Q K I A S R L N V 488

1501 cgcccccaattattgaacacggttatcttgagtttgggcccgattaagctagattgatgat 1560
489 R P N Y * T R L S * V W A R L S * I D D

1561 catgctataggaggtccatctctaagattggtatggttacacaagcgggtgttgatgtatc 1620
H A I G G P S L R L L C Y T S G V V C I

1621 agtcctacctttcgtctgtaaatattttatcttttacttaaggaacctgaaacttagaata 1680
S P T F R L * Y F I F Y L R N L K L R I

1681 agcgcacacctagatgtgtgagtcactgtgtttcaggttcgggtctgtaaagtgaaagcc 1740
S A H L D V * V T V F Q V R V C K V K A

1741 taaacttttttggcacacatggtatgtaagttgttttcttcaaagtgaatgttggttttt 1800
* T F L A H M L C K L F F F K C N V V F

1801 ggctatctatgttgatgcttccggttcattgtattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1859
G Y L F D A S V H V L K K K K K K K K

8. Danksagung

Prof. Dr. Feierabend möchte ich für die interessante Aufgabenstellung und seine Diskussionsbereitschaft danken. Besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass ich nach 2½ verlorenen „Hefe-Jahren“ die Chance der „Baculovirus-Ära“ bekommen habe und er mich fachlich und menschlich jederzeit unterstützt hat. Dr. Matthias Schmidt war während meiner Promotionszeit eine der zentralsten Säulen. Fachlich stand er mir unermüdlich zur Seite und persönlich halfen er und seine Frau Susanne mir nicht nur einmal, schwierige Zeiten durchzustehen. Danke! Für die tägliche Assistenz im Laboralltag, die Pflege meiner Insektenzellen, die Hilfe bei der Einhaltung der Dienstwege und vor allem für ihre „Care“-Pakete (dass „das Kind nicht verhungert“) möchte ich mich bei Kerstin Pieper, Christel van Oijen und Regina Ennemann herzlich bedanken. Bei Dr. Peter Streb möchte ich mich für seine Ratschläge und die Möglichkeit, dass ich meine Pflänzchen in ihrem natürlichen Lebensraum besichtigen durfte, bedanken. Bei Martin Feussner, Michael Uebeler, Dr. William Shang, Stefan Schubert, Dr. Oliver In, Dr. Lutz Schäfer, Dr. Volker Beyel, Nina Rähler, Holger Both, Cornelia Anken, Gabi Wicker, Jürgen Grief, Thomas Veith, David Walmsley, Suse Kaupp, Petra Speuser, Christine Schüll, Bernd Seidendorf und allen anderen ehemaligen Mitarbeiter/Innen des AK Feierabends möchte ich mich für steten Zuspruch, lustige Mittags- und Kaffeepausen und eine schöne Zeit bedanken. Allen Mitarbeiter/Innen aus den „Keller-Werkstätten“ ein Dankeschön für die Hilfe bei technischen und organisatorischen Problemen.

Dr. Helmut Reiländer und speziell dabei Thorsten Schedletzky aus dem MPI für Biophysik in Frankfurt/Main möchte ich als „Retter in der Not“ für die Einführung in das Baculovirussystem danken. Prof. Dr. Entian und Prof. Dr. Hollenberg gebührt Dank für die Überlassung diverser Hefestämme.

Diese Arbeit wurde durch finanzielle Mittel der DFG an Professor Feierabend unterstützt.