

**Identifizierung und Analyse der an der pflanzlichen Zellwandbiosynthese  
beteiligten Gene in *Arabidopsis thaliana***

vorgelegt von  
Diplom-Ingenieurin  
Anja Kuschinsky  
aus Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften  
- Dr.-Ing.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof Dr. rer. nat. Lothar Kroh

Berichter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

Berichter: Dr. Markus Pauly

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.01.2006

Berlin 2006

D 83

# Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Markus Pauly vom Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu können, für seine kontinuierliche Betreuung und für die unermüdliche Korrektur und Begutachtung meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl vom Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität in Berlin für seine konstruktive Betreuung und die Begutachtung meines Projektes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Lothar Willmitzer, Herrn Dr. Alisdair Fernie und Herrn Dr. Wolf-Rüdiger Scheible vom Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm, für die jährliche Begutachtung meiner Projekte, ihre Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen.

Ich danke Herrn Dr. Kirk Schnorr von der Firma Novozymes in Kopenhagen, dafür, dass er das Zustandekommen eines meiner Projekte ermöglichte, für seine Betreuung während meiner Zeit in seinem Labor in Kopenhagen, sowie für die hilfreichen Diskussionen.

Ebenso möchte ich allen Mitgliedern der AG Pauly danken. Mein besonderer Dank für ihre Mitarbeit geht an Kerstin Zander, Norma Funke und Shamim Rahman.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich bei Alex für seine Unterstützung in der Zeit meiner Doktorarbeit bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis I

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die pflanzliche Zellwand und ihre kommerzielle Nutzung	1
1.2 Die Bestandteile der Zellwand	2
1.3 Synthese der Zellwandbestandteile	5
1.3.1 Synthese an der Plasmamembran	5
1.3.2 Synthese im Golgiapparat	6
1.3.2.1 Nukleotidzucker für die Matrix-Polysaccharidsynthese	6
1.3.2.2 Die Synthese der Polysaccharide im Golgiapparat	8
1.4 Apoplastische Proteine und ihre Synthese	9
1.4.1 Proteinsynthese, Zielsteuerung und Modifikation der Proteine	10
1.5 Die Analyse der apoplastischen Proteine	13
1.6 Ziel der Arbeit	16
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Primer	17
2.1.3 Plasmide (Vektoren und Konstrukte)	20
2.1.4 Antikörper	20
2.1.5 Organismen	21
2.1.5.1 Bakterien	21
2.1.5.2 Pflanzen	21
2.1.6 Wachstumsbedingungen	21
2.1.6.1 Bakterien	21
2.1.6.2 Pflanzen	21
2.1.6.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1 RNA-Isolation aus pflanzlichen Geweben	22
2.2.2 Isolation genomischer DNA aus pflanzlichem Material	22
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.4 Southern Blot	23
2.2.5 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	23
2.2.6 Hybridisierung des Blots	23
2.2.7 cDNA Synthese	23
2.2.8 Semiquantitative RT-PCR	23
2.2.9 Quantitative RT-PCR	24
2.2.10 Pflanzentransformation	24
2.2.11 Kreuzung zweier <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	24
2.2.12 Molekulare Analyse von <i>Arabidopsis</i> T-DNA Mutanten	24
2.2.13 Sequenzierung	24
2.2.14 Herstellung einer cDNA Bank	25
2.2.15 Transposon assisted signal trapping (TAST)	25
2.2.16 Sequenzierung der getaggtten Plasmide	25
2.2.17 Expressionsanalyse durch Macroarray	26
2.3 Analytische und präparative Methoden	27
2.3.1 Protoplastenherstellung und –regeneration	27

2.3.2	Zellwandisolierung .....	27
2.3.3	Isolation der Pektine aus Zellwandmaterial .....	27
2.3.4	Monosaccharidanalyse durch GC-MS .....	27
2.3.5	Metaboliten-Profilung durch Gas-Chromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie (GC-MS) .....	28
2.3.6	Bestimmung des kristallinen Zellulosegehalts.....	29
2.3.7	Bestimmung des Gehalts an Uronsäure .....	29
2.3.8	Bestimmung des Chlorophyllgehalts in Arabidopsisblättern .....	29
2.3.9	Bestimmung des Stärkegehalts in Pflanzengewebe.....	29
2.3.10	UDP-Glucose Bestimmung.....	30
2.3.11	Lipidanalyse durch Dünnschicht Chromatographie (DC) .....	31
2.3.12	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie .....	31
2.3.13	Zuckerbestimmung durch Dionex.....	31
2.4	Mikroskopie und Histologie .....	32
2.4.1	Lokalisationsbestimmung durch das Green Fluorescence Protein (GFP) .....	32
2.4.2	Gewebedünnschnitte von <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln und Antikörper-markierung der Zellwandzucker.....	32
2.4.3	Expressionsanalyse durch Promotor-GUS Fusion.....	33
2.4.4	Ermittlung von Schäden der Plasmamembranen und toter Zellen durch Fluoreszindiacetat (FDA).....	33
2.5	Bioinformatik.....	34
2.5.1	Analyse von Proteinen, ihrer Funktion und ihrer N-terminaler Peptidsequenzen	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Transposon assisted signal tagging (TAST).....	35
3.1.1	Transposon Tagging einer cDNA Bank aus regenerierten Protoplasten und bioinformatische Analyse der N-terminalen Signalsequenzen .....	35
3.1.2	Expressionsanalyse der durch TAST gefundener Gene.....	46
3.1.3	Lokalisationsbestimmung durch das Green-Fluorescent-Protein (GFP) .....	48
3.2	Untersuchung einer T-DNA Knock-out Linie mit stark verkürztem Wurzelwachstum.....	52
3.2.1	Funktionale Analyse des <i>UGE3</i> -Gens .....	52
3.2.2	<i>UGE4</i> , ein weiteres Mitglied der <i>UGE</i> -Genfamilie.....	66
3.2.3	Kreuzung der Mutanten <i>uge4</i> und <i>uge3</i> .....	68
3.2.4	Analyse der Wurzelzellen .....	72
3.2.5	Analyse der Zellwand .....	73
3.2.6	Untersuchung der Zellmetabolite und Zellkompartimente .....	79
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
4.1	TAST.....	89
4.1.1	Isolation apoplastischer Proteine und Selektivität des TAST-Systems .....	89
4.1.2	Kandidatengene und ihre Lokalisation .....	91
4.1.3	TAST als Selektionssystem und mögliche Anwendungen in der Zukunft .....	93
4.2	Die <i>uge3-1</i> Mutante .....	94
4.2.1	Der <i>uge3-1</i> Phänotyp im Vergleich zu anderen Mutanten der <i>UGE</i> -Genfamilie	94
4.2.2	Die Analyse der galaktosehaltigen Verbindungen in den Mutanten der <i>UGE</i> - Genfamilie.....	96
4.2.3	Stärkeakkumulation und Phosphatmangel als mögliche Verursacher des <i>uge3-1</i> Phänotyps .....	97
4.2.4	Das Zusammenspiel der <i>UGE</i> -Isoformen.....	100

4.2.5 Mutanten mit verkürztem Wurzelwachstum.....	100
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>6. Referenzen</b>	<b>104</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>118</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGI	<i>Arabidopsis</i> gene identification
AGP	Arabinogalaktan-Protein
Api	Apiose
Ara	Arabinose
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
AtUTR1	<i>Arabidopsis thaliana</i> UDP-Galaktose/UDP-Glukose Transporter
B	Bor
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
C	chloroplastidäre Signalsequenz
Ca	Calcium
cDNA	copy Desoxy-Ribonuklein-Säure
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CATMA	Complete <i>Arabidopsis</i> Transcriptome MicroArray
CAZy	Carbohydrate Active enZYmes
Chl a und b	Chlorophyll a und b
<i>cob</i>	<i>cobra</i>
Col-0	Columbia
CSC	cellulose synthase complex
CT-Wert	threshold cycle
C-terminal	Carboxy-terminal
cTP	chloroplastic transit peptide
DAP	Dihydroxyaceton-Phosphat
DC	Dünnschicht Chromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMFA	Dimethylformamid
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
DNAse	Desoxy-Ribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMBL-EBI	European Bioinformatics Institute
ER	Endoplasmatischen Reticulum
EtOH	Ethanol
FDA	Fluoreszindiacetat
Fe	Eisen
Fruk.	Fruktose
GA	Gibberellin
GABI	Genomanalyse im biologischen System Pflanze
<i>gai</i>	<i>gibberellic acid insensitive</i>
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsäure
GC-MS	Gaschromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie
GDP	Guanin-Diphosphat
GFP	Green fluorescent Protein

GlkA	Glukuronsäure
Gluk.	Glukose
GONST	Golgi-Localized GDP-Mannose Transporter
GPI	Glykophosphatidylinositol
GRP	Glycin-reichen Proteine
GST	Gene Sequence Tag
GTP	Guanin-Triphosphat
GUS	$\beta$ -Glucuronidas
G1P	Glukose-1-Phosphat
G3P	Glycerol-3-Phosphat
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gly3PDH	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase
Gly3Pox	Glycerol-3-Phosphate Oxidase
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGA	Homogalakturonan
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
HPGP	Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine
JPL-Medium	Jouanneau Péaud-Lenoël Medium
K	Kalium
KAT	Köln <i>Arabidopsis thaliana</i> T-DNA Tagged Lines
KO	Knockout
KOH	Kalilauge
l	Liter
LB	Leftborder
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LiCl	Lithiumchlorid
Lok	Lokalisation
m	Meter
M	mitochondriale Signalsequenz
MALDI-TOF	Matrix-Associated-Laser-Desorption Ionization Time of Flight
MES	2-Morpholino-Ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
$\mu$ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektroskopie
MS-Medium	Murashige Skoog Medium
MSTFA	N-Methyl- N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid
mTP	mitochondrial transit peptide
mT	matrix targeting
m/z	Masse/Ladung
MUR1	GDP-D-Man-4,6-Dehydratase
MUR4	UDP-Xylose-4-Epimerase
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NST	Nukleotidzucker-Transporter
N-terminal	Amino-Terminal
NTP	Nukleotid-Triphosphat
P	Phosphat
PBS	Phosphat gepufferte Salinlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PRP	Prolin-reiche Proteine
psi	Pascal
PVP	Polyvinyl Pyrrolidon
RB	Right Border
RC	Reliability Class
<i>Reb</i>	<i>root epidermal bulger</i>
RGI	Rhamnogalakturonan I
RGII	Rhamnogalakturonan II
<i>rga</i>	<i>repressor of gai-3</i>
Rha	Rhamnose
<i>RHD</i>	<i>ROOT HAIR DEFICIENT</i>
RHM	UDP-L-Rhamnose-Synthase
RNA	Ribonuklein-Säure
rpm	Rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
<i>rsw</i>	<i>radial swelling</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Kettenreaktion
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
s	Sekunde
S	sekretorische Signalsequenz
ØS	durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score)
S.a	Signalanker
Sac.	Saccharose
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>shr</i>	<i>short root</i>
Si	Silicium
SP	Signal Peptide
SPaseI	SignalpeptidaseI
SRP	signal recognition particle
SSC	Standard-Salin-Citrat
S-score	signal peptide score
SSPE	Sodium Chloride-Sodium Hydrogen Phosphate
Tab.	Tabelle

TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TAST	Transposon assisted signal tapping
T-DNA	Transfer-DNA
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Triflouressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Unit
UDP	Uridin-Diphosphat
UTP	Uridin-Triphosphat
UPDG	UDP-Glukose
UGD	UDP-Glukose-Dehydrogenase
UGE	UDP-Glukose-Epimerase
UGPase	UDP-Glukose Pyrophosphorylase
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	ultraviolett
vol.	Volumen
vs	versus
WT	Wildtyp
XEG	Xyloglukan-spezifischer Endoglukanase
X-Gluk	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure-Cyclohexylammoniumsalz
Xyl	Xylose
YEB-Medium	Yeast Extract Broth Medium
Zn	Zink
-	keine Signalsequenz

# 1. Einleitung

## 1.1 Die pflanzliche Zellwand und ihre kommerzielle Nutzung

Die Bildung der pflanzlichen Zellwand zählt zu den bedeutendsten Prozessen der Biosphäre. Ihre Bestandteile bilden einen Großteil aller organischen Substanzen auf unserem Planeten. Die Funktion der Zellwand ist vielfältig. Sie dient nicht nur der Stabilisierung, sondern ist auch im Wachstum der Zelle involviert. Zellwände bilden die Verbindung benachbarter Zellen und ermöglichen den Schutz vor Pathogenen (Ryan, 1990). Sie sind an den Prozessen der Samenkeimung und der Fruchtreife beteiligt. Nicht zuletzt bilden sie regulatorische Moleküle zur Stressantwort und sind Teil der pflanzlichen Signalwege (Fry, 1988; Carpita und McCann, 2000).

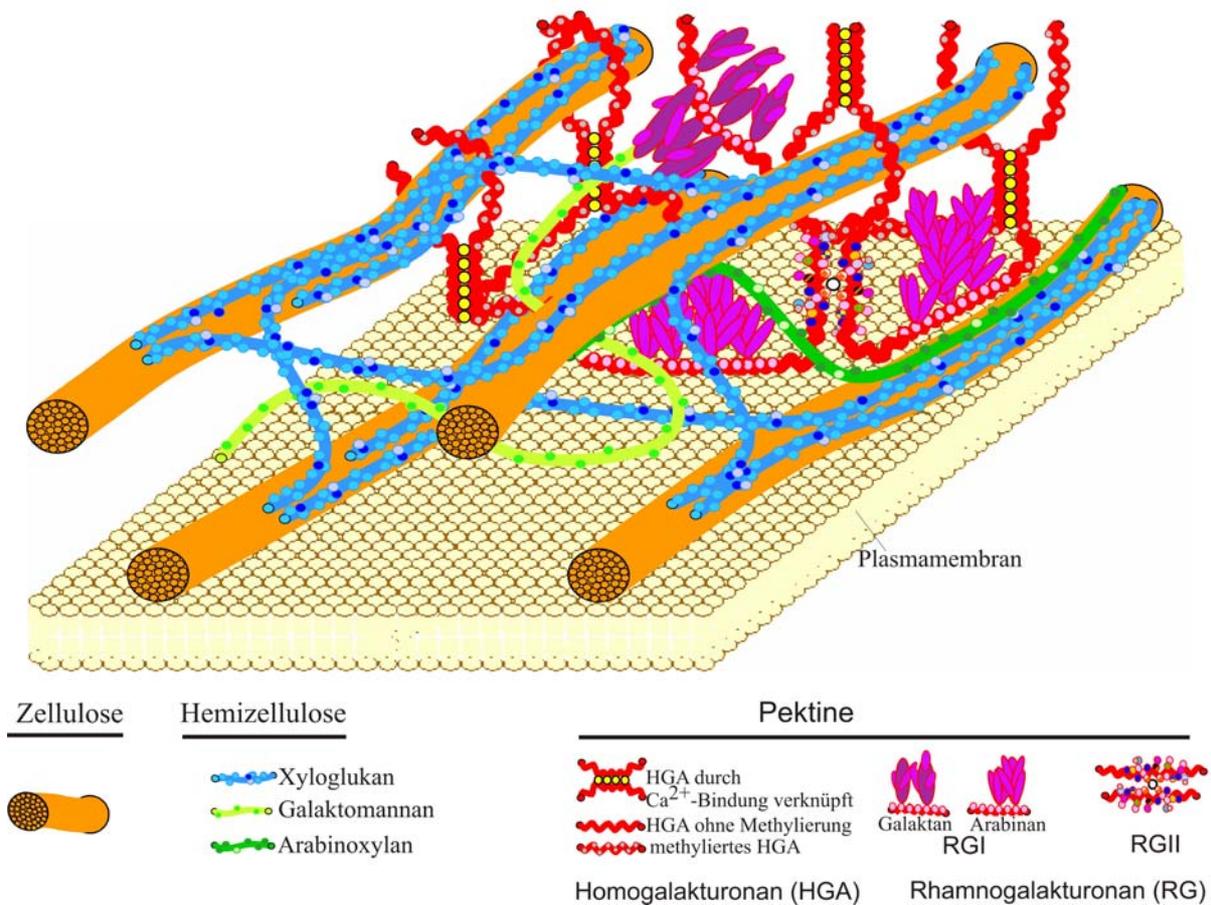
Bei allen pflanzlich erzeugten Lebensmitteln wie Obst und Gemüse spielt die Festigkeit der Zellwand eine Rolle bei der Lagerfähigkeit und Haltbarkeit dieser Produkte (Bruening und Lyons, 2000). Auch in der Weiterverarbeitung pflanzlich erzeugter Lebensmittel wie z.B. in der Weinherstellung ist die Zellwand von Bedeutung. Hier ist eine Zellwand, die das Pressen der Trauben zur Gewinnung des Traubensaftes erleichtert von Vorteil (Doco *et al.*, 1997). Bestandteile der Zellwand können kommerziell als Gele und Stabilisatoren eingesetzt werden (Morris und Wilde, 1997). Auch in der Papierherstellung ist das Produkt Zellwand und ihre Komponenten wichtig (Pilate *et al.*, 2002). Die Polysaccharide der Zellwand können zu medizinischen Zwecken dienen, wie z.B. durch Aufnahme über den Magen- Darm- Trakt zur Beeinflussung des Cholesterinspiegels oder aber bei der Unterstützung des Immunsystems (Terpstra *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2001). Alle für den Menschen unverdaulichen Bestandteile der Pflanzenzellen werden als Ballaststoffe bezeichnet. Sie können nicht von körpereigenen Enzymen des menschlichen Magen-Darm-Traktes abgebaut werden und gelangen unverdaut in den Dickdarm. Pektine werden schnell und fast komplett von den Bakterien im Darm abgebaut und dem Körper zugeführt. Die Zellulosebestandteile der Pflanzenzelle werden dagegen kaum von Mikroorganismen im Darm zersetzt, sondern fast vollständig mit dem

Stuhl ausgeschieden. Wie alle Ballaststoffe können sie jedoch große Mengen von Wasser binden und erhöhen so das Volumen des Stuhls. Dadurch beschleunigen sie die natürliche Darmbewegung und sorgen dafür, dass der Speisebrei schneller den Darm passiert.

## 1.2 Die Bestandteile der Zellwand

Die pflanzliche Zelle ist im Vergleich zur tierischen nicht nur von einer Plasmamembran, sondern zusätzlich von einer Zellwand umgeben (Raven *et al.*, 1999). T. H. Huxleys berühmter Aphorismus lautete: Die Pflanze ist ein Tier in einer hölzernen Box (Huxley, 1853). Die pflanzliche Zellwand und der angrenzende interzelluläre Raum bilden einen Teil des Apoplasten. Der Apoplast beinhaltet den gesamten Raum, der zwischen Plasmamembran und Cuticula liegt. Vereinfacht gesagt, können die pflanzlichen Zellen als Protoplasten gesehen werden, die vom Apoplasten umgeben sind. Protoplasten werden als organisierter lebender Teil der Zelle ohne Zellwand bezeichnet.

Die Zusammensetzung der Zellwand ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle, aber auch von der Art des Gewebes und der Pflanzenspezies. Die Zellwand besteht aus drei Schichten, der Mittellamelle, der primären und sekundären Zellwand (Carpita und Gibeaut, 1993). Die Mittellamelle entsteht während der Zellteilung. In der Telophase des Zellzyklus bildet sich zwischen den auseinanderweichenden Chromosomen eine verhältnismäßig dichte Zone von zylinder- bis tonnenartiger Gestalt, der Phragmoplast, der aus Mikrotubuli besteht, die dieselbe Polarität zeigen wie die Mikrotubuli der Spindel. In der Mitte des Phragmoplasten, d.h. also in der Äquatorialebene, sammeln sich Golgivesikel (Schopfer und Hepler, 1991). Sie schließen sich zur Zellplatte zusammen, die vom Zentrum ausgehend wächst, bis die Seitenwände der Zelle erreicht werden (Samuels *et al.*, 1995). Die Zellplatte verschmilzt mit der Plasmamembran der elterlichen Zelle und teilt diese in zwei Hälften. Sie bildet die pektinreiche Mittellamelle (Verma, 1996). Die primäre Zellwand wird nachfolgend während des Zellwachstums gebildet. Sie zeichnet sich durch ihre Flexibilität und Dehnbarkeit aus. Diese Zellwand setzt sich aus zahlreichen Polysacchariden und Proteinen zusammen. Genauer betrachtet besteht die primäre Zellwand dikotyler Pflanzen aus Zellulose-Mikrofibrillen, die in einer hydratisierten, amorphen Matrix eingebettet sind. Sie setzt sich in ihrer Trockenmasse aus ca. 30% Zellulose, 30% Hemizellulose, 35% Pektin und 1–5% Proteinen zusammen (Cosgrove, 1997) (Abb.1). Nach Abschluss des Zellwachstums wird eine ligninreiche, sehr viel dickere und starrere, die so genannte sekundäre Zellwand gebildet.



**Abb. 1 Modell der pflanzlichen primären Zellwand.** Modell nach Dr. M. Pauly. Die pflanzliche Zelle wird neben der Plasmamembran auch von der primären Zellwand umschlossen. Hier sind Zellulose, Hemizellulose und Pektine miteinander verknüpft.

Die Zellulose-Mikrofibrillen sind relativ steif. Sie bestehen aus kristallinen, linearen Zellulosefasern, die sich aus  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 verknüpften Glukoseeinheiten zusammensetzen und die der Zellwand ihre Festigkeit verleihen. Die einzelnen Zellulosefasern sind über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden und bilden so meist kristalline Mikrofibrillen (Brown *et al.*, 1996). Diese Anordnung und Festigkeit der Zellulose-Mikrofibrillen würde erklären, warum Zellulose nahezu unempfindlich gegen pathogene Attacken ist.

Die Hemizellulosen der Zellwand verbinden die Zellulose-Mikrofibrillen untereinander, wobei die größte Gruppe in dikotylen Pflanzen die Xyloglukane bilden. Genau wie die Zellulose besitzen die Xyloglukane ein Rückgrat aus  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 verknüpften Glukoseeinheiten. Diese können Seitenketten aus Xylose tragen, die Galaktose und Fukose substituiert sein können (McNeil *et al.*, 1984; Fry, 1989).

Die Pektine bilden eine gelartige Matrix, in die das Netzwerk aus Zellulose und Hemizellulose eingebettet ist. Sie wirken als Füllstoff unterstützend für die Struktur der Zellulose. Pektine sind aus einer Reihe von Polysacchariden aufgebaut; alle beinhalten

Galakturonsäure (GalA). Die Pektine lassen sich in drei Klassen, die der Homogalakturonane (HGA), der Rhamnogalakturonane I (RGI) und II (RGII) einteilen (Carpita und McCann, 2000). HGA besteht aus einer unverzweigten Kette von 100-200  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 verknüpften GalA. Die HGAs könnten für die gelartige Struktur der Pektine verantwortlich sein, da ihre geladenen Carboxyenden über Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Moleküle mit benachbarten Pektinen verbunden sind. HGA können aber auch durch Esterbindungen methyliert oder acetyliert sein (Taiz und Zeiger, 1998; Willats *et al.*, 2001; William *et al.*, 2001).

RGI ist Hauptbestandteil der Mittellamellen und der primären Zellwände. Es besteht aus der sich wiederholenden Struktur eines Disaccharids, das sich aus  $\alpha$ -1,2-Rhamnose (Rha) und  $\alpha$ -1,4-GalA zusammensetzt (Sørensen *et al.*, 2000). Die Moleküle der GalA können acetyliert sein (Komalavilas und Mort, 1989). 20-80% der Rhamnose-Einheiten sind durch Seitenketten substituiert. Diese bestehen aus linearen oder verzweigten  $\alpha$ -L-Arabinose (Ara)- oder  $\beta$ -D-Galaktose (Gal)-Einheiten. Dabei variiert die Zusammensetzung und Länge der Seitenkette je nach Gewebe und Pflanzenspezies (Mohnen, 1990; O'Neill, 1990; Lerouge *et al.*, 1993).

Sehr viel komplizierter ist das hoch verzweigte RGII aufgebaut. Es besteht aus 11 verschiedenen Zuckermonomeren. 21 Enzyme werden für die Verknüpfung dieser Moleküle untereinander benötigt (O'Neill *et al.*, 2001).

Weitere Komponenten der Zellwand sind die Glykoproteine, Enzyme und Mineralien. Die Mehrzahl der Glykoproteine besteht aus 10% Proteinen und mehr als 90% Kohlehydraten. Die chemische Analyse der Glykoproteine zeigte, dass der Proteinanteil reich an den Aminosäuren Hydroxyprolin, Prolin, Serin und Threonin ist (Lamport, 2001). Diese Aminosäuren stellen die Einzelkomponenten der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (HPGP) und der Glycin-reichen Proteine (GRP) dar (Cassab, 1998; Kieliszewski und Shpak, 2001). Zu den HPGPs zählen die Extensine, Arabinogalaktan-Proteine (AGP) und Prolin-reiche Proteine (PRP). Das Rückgrat der HPGP ist mit Ara- und Gal-Einheiten substituiert, die die Hauptzuckeranteile darstellen. Der Proteinanteil der AGPs ist reich an Hydroxyprolin, Alanin, Glycin, und Serin. Die Kohlehydratseitenketten werden über Serin oder Hydroxyprolin verknüpft. Ara und Gal sind die Hauptzucker der AGPs und repräsentieren die Mehrheit der O-glykosylierten OH-Gruppen der Hydroxyprolin- und Serin-Seitengruppen. Ara und Gal stellen 30-40% der Zucker, daneben sind Uronsäuren noch in geringeren Mengen vertreten. Die Kohlehydratseitenketten können aus bis zu 50 Molekülen bestehen. Die AGPs werden von der Pflanzenzelle in den Apoplasten sekretiert oder über Glykophosphatidylinositol- (GPI) Membrananker an die Plasmamembran gebunden (Youl *et*

*al.*, 1998). Die zellwandassoziierten AGPs spielen eine Rolle in der Zellexpansion und Zelldifferenzierung.

Die primären Zellwände besitzen Enzyme, die am Zellwandmetabolismus beteiligt sind, wie Endo- und Exoglykanasen, Methyl- und Acetylerasen, sowie Transglykosylasen, aber auch Enzyme, die für die Verknüpfung der Zellwandkomponenten untereinander verantwortlich sein können (Peroxidasen) oder Expansine, die die Bindungen der Xyloglukane und Zelluloseeinheiten während der Zellexpansion lösen (Fry, 1995; Cosgrove, 1999). Die Mineralien der Zellwand sind stark von den Wachstumsbedingungen der Pflanze abhängig. Mineralen wie Ca, Kalium (K), Natrium (Na), Eisen (Fe), Magnesium (Mg), Silicium (Si), Zink (Zn), und Bor (B) können bis zu 5 % der Zellwandtrockenmasse dikotyler Pflanzen ausmachen. Calcium ist ein typischer Vertreter der anionischen Pektinpolysaccharide (Mathon *et al.*, 1996). Wahrscheinlich hat es großen Einfluss auf das rheologische Verhalten der primären Zellwand. Bor ist an der Verknüpfung der RGII-Stränge beteiligt (Mathon *et al.*, 2000).

### **1.3 Synthese der Zellwandbestandteile**

Die einzelnen Bestandteile der Zellwand werden in vier Schritten erzeugt. Die Herstellung des Donors (des Nukleotidzuckers), die Initiation der Polymersynthese, die Polymerelongation und die Termination der Polymersynthese (Delmer und Stone, 1988). Die Schlüsselenzyme dieser Synthese sind die Polysaccharidsynthasen und Glykosyltransferasen, die die Bindungen zwischen den monomeren Nukleotidzuckern und den bereitstehenden Oligosacchariden herstellen. Die Synthese der Zellulose erfolgt an der Plasmamembran, während die Matrix-Polysaccharide (Hemizellulosen und Pektine) im Golgiapparat hergestellt werden.

#### **1.3.1 Synthese an der Plasmamembran**

Zellulose wird direkt an der Plasmamembran synthetisiert. UDP-Glukose ist das Donor-Molekül für diese Synthese der Zellulose. Das Enzym Zellulose-Synthase katalysiert diese Reaktion. Es bildet einen membranüberspannenden Komplex (CSC: cellulose synthase complex) mit rosettenförmiger Struktur (Brown *et al.*, 1996; Perrin, 2001; Lai-Kee-Him *et al.*, 2002). Die CSC kann in zwei Untereinheiten, die katalytische und regulatorische eingeteilt werden. Die als aktive Seite bezeichnete Glykosyltransferase bindet cytosolische UDP-Glukose und addiert sie an die wachsende Zellulosekette. Die entstehende Zellulosekette wird durch eine Pore, die durch die rosettenförmige Anordnung des Komplexes entsteht, in den Apoplasten entlassen (Reiter, 2002; Scheible und Pauly, 2004). Wahrscheinlich wird die zur Zellulosesynthese benötigte UDP-Glukose durch die Spaltung von Saccharose in UDP-



UDP-Glukose wird aus UTP und Glukose-1-P, GDP-Mannose aus GTP und Mannose-1-P hergestellt. Ausgangssubstrat beider Reaktionen ist der Phosphatzucker Fruktose-6-P, der aus dem Calvin-Cyclus stammt (Seifert *et al.*, 2004). Zwei alternative Synthesewege zur Herstellung der Nukleotidzucker sind möglich. Zucker, die bereits in die Polysaccharide der Zellwand eingebaut waren, können recycelt, oder sie können über den so genannten Myoinositol-Weg synthetisiert werden. Im Recyclingweg wird das freie Monosaccharid durch eine C1-Kinase unter der Verwendung von ATP in einen Phosphatzucker umgewandelt. Aus diesem wird dann durch eine NTP-Pyrophosphorylase der entsprechende Nukleotidzucker. Es ist noch nicht bekannt, ob dieser Syntheseweg für alle Zucker der Zellwand existiert. Im Myoinositolweg wird Myoinositol zu Glukuronsäure (GlkA) oxidiert und dann in den aktiven Zucker UDP-Glukuronsäure umgewandelt (Feingold und Avigad, 1980). GDP-Mannose kann in GDP-L-Fukose umgewandelt werden. Fukose kommt in Gykoproteinen und in den Bestandteilen der Zellwand, wie z.B. den Xyloglukanen vor. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Der erste wird durch GDP-D-Man-4,6-Dehydratase (MUR1) katalysiert (Bonin *et al.*, 1997). Mutationen in *MUR1* führten zu einer Reduktion an Fukose in den Pektinen und Xyloglukanen der Sprosse, nicht aber der Wurzeln (Reiter *et al.*, 1997). Wahrscheinlich wird dieses Gewebe durch eine zweite Isoform der GDP-D-Man-4,6-Dehydratase mit L-Fukose versorgt (Bonin *et al.*, 1997). Die fehlende Fukose dieser Gewebe wurde durch L-Galaktose, einem seltenen Zucker der Pflanzen, der normalerweise nicht in der Zellwand vorkommt, ersetzt (Zabackis *et al.*, 1996).

UDP-Glukose-Dehydrogenase (UGD) katalysiert den ersten Schritt in der Umwandlung von UDP-Glukose zu UDP-Glukuronsäure. Die irreversible Reaktion stellt einen der Hauptverzweigungspunkte der Nukleotidzucker-Synthesewege dar (Reiter und Vanzin, 2001). Die Expression des *UGD*-Gens ist an das Wachstum der Pflanze gebunden. Die höchste Expression ließ sich in den Hauptwurzeln und wachsenden Blätter finden (Seitz *et al.*, 2000). UDP-Glukuronsäure kann auch über die Oxidation von Myoinositol hergestellt werden. Es konnte in Kartoffeln gezeigt werden, dass auch bei einem limitierten Angebot an Myoinositol die Zellwandzusammensetzung keine Unterschiede zeigte. Anzunehmen ist, dass sich beide Synthesewege auf kompensatorische Weise ausgleichen (Keller *et al.*, 1998).

Eine Epimerisierungsreaktion von UDP-Glukuronsäure führt zu UDP-Galakturonsäure, einem Baustein zur Synthese der Pektine. Gleichzeitig ist UDP-Glukuronsäure die Vorstufe zur Herstellung von UDP-Xylose und UDP-Apiose. MUR4 (UDP-Xylose-4-Epimerase) katalysiert die Epimerase-Reaktion von UDP-Xylose zu UDP-Arabinose. *mur4* Mutanten zeigte eine Reduktion an Arabinose in der Zellwand (Reiter *et al.*, 1997).

UDP-Glukose ist Ausgangssubstrat für die Synthese von UDP-Rhamnose. Die Biosynthese wurde in Bakterien untersucht und ihre Enzyme wurden identifiziert (4,6-Dehydrtase, 3,5-Epimerase, 4-Reduktase) (Naismith, 2004). In *Arabidopsis* konnten durch BLAST-Vergleiche der bakteriellen Gene 3 sequenzähnliche Gene der putativen UDP-L-Rhamnose-Synthase (*RHM1*, *RHM2*, *RHM3*) identifiziert werden (Reiter und Vanzin, 2001). Eine T-DNA KO-Mutante mit Insertion im *RHM2* Gen zeigte eine Reduktion des RGI-reichen Samenschleims (Usadel *et al.*, 2004).

UDP-Glukose-Epimerase (UGE) katalysiert die reversible Epimerisierung von UDP-Glukose zu UDP-Galaktose, einem Nukleotidzucker, der in den Bestandteilen der Zellwand, mit Ausnahme der Zellulose vorkommt. Dörmann und Benning (1996) gelang es *UGE1* zu isolieren. *UGE1*-Antisense Pflanzen zeigten keinen Phänotyp. Sie besaßen jedoch im Vergleich zum Wildtypen eine höhere Sensibilität gegenüber externer Galaktose, die dem Medium beigelegt wurde, wohingegen *UGE1*-Überexpressionspflanzen eine höhere Toleranz gegenüber Galaktose zeigten. Die Zellwände dieser auf Galaktose wachsenden Pflanzen wiesen einen reduzierten Galaktosegehalt im Vergleich zu den Antisense-Pflanzen oder dem Wildtyp auf. Wahrscheinlich ist die Synthese der Galaktane in der Zellwand durch die Expressionsrate der Enzyme Galaktan-Synthase /Galaktantransferase oder durch den Fluss im Golgiapparat kontrolliert. Die extern zugelegte Galaktose kann den Pool der zur Verfügung stehenden UDP-Galaktose erhöhen, aber im Falle der Überexpression sorgt die hohe UGE-Aktivität dafür, dass UDP-Galaktose in UDP-Glukose umgewandelt wird und so nicht mehr für den Einbau in die Zellwand zur Verfügung steht (Dörmann und Benning, 1998). UGE besteht aus einer Genfamilie mit insgesamt 5 Mitgliedern. Ihre Gene kodieren cytosolisch lokalisierte Enzyme (Dörmann und Benning, 1996; Reiter und Vanzin, 2001). Eine T-DNA KO-Mutante mit Insertion im *UGE4* Gen konnte von Seifert und Kollegen isoliert und phänotypisch bestimmt werden. Die epidermalen Wurzelhaarzellen der *uge4* Mutante waren kugelförmig und die Wurzellänge im Vergleich zum Wildtypen verkürzt. Es war möglich, diesen Phänotyp durch die externe Addition von Galaktose im Medium zu komplementieren. Der Phänotyp wurde durch den defizienten Einbau von UDP-Galaktose in die AGPs und der Zellwandpolymere hervorgerufen (Seifert *et al.*, 2002; 2004).

### **1.3.2.2 Die Synthese der Polysaccharide im Golgiapparat**

Der Golgiapparat ist sowohl Syntheseort als auch Teil des intrazellularen Transportsystems. In der Pflanzenzelle erfolgt in den Dictyosomen des Golgiapparats die Zusammensetzung der Polysaccharid-Ketten der Hemizellulosen und Pektine. Dabei werden Nukleotidzucker, die als Donor dienen durch Glykosyltransferasen zu den entsprechenden Akzeptor-Oligosacchariden

transportiert und angeheftet (Dupree und Sherrier, 1998). Nach Beendigung der Synthese werden die Polysaccharide anschließend in Golgivesikeln durch das Cytoplasma zum Apoplasten transportiert und in die Zellwand eingebaut (Gibeaut, 2000; Keegstra und Raikhel, 2001; Richmond und Sommerville, 2001; Sterling *et al.*, 2001; Dhugga *et al.*, 2004). Um die für diesen Vorgang benötigten Nukleotidzucker bereitstellen zu können, wird ein Nukleotidzucker-Transporter (NST) in der Golgimembran benötigt, der die cytosolischen Nukleotidzucker zu den entsprechenden Glykosyltransferasen transportiert. Die gleichen NSTs werden auch für die Glykosylierung der Glykoproteine und Glykolipide benötigt. Einige dieser Transporter wurden in *Arabidopsis* charakterisiert. GONST1 (Baldwin *et al.*, 2001), sowie GONST 2-5 (Handford *et al.*, 2004) transportieren GDP-Mannose, AtUTR1 UDP-Galaktose und UDP-Glukose (Norambuena *et al.*, 2002). Die NSTs sind Proteine mit multimembranüberspannenden Domänen, die wahrscheinlich als Antiporter funktionieren, indem sie Nukleoside gegen spezifische Nukleotidzucker tauschen (Munoz *et al.*, 1996; Neckelmann und Orellana, 1998). Da die NSTs die Substrate für die Glykosyltransferasen stellen, könnten sie durch diese Substrate reguliert sein. Wahrscheinlich bilden die cytosolischen Nukleotidzucker-synthetisierenden Enzyme, die Nukleotidtransporter und die Glykosyltransferasen einen Komplex, der in der Lage ist, Nukleotidzucker vom Cytosol zu den Glykosyltransferasen in das Lumen des Endomembran-Systems zu transportieren. Dieser Komplex bietet gleichzeitig auch einen Kontrollmechanismus über die Synthese der Polysaccharide und ihrer Bestandteile (Seifert, 2004).

Der Golgiapparat dient nicht nur den synthetisierten Polysacchariden als Transportsystem, sondern auch den Proteinen (einschließlich der Zellwandproteine), die am Endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert werden. Golgivesikel transportieren die darin enthaltenen Proteine an ihren Bestimmungsort wie z.B. den Apoplast.

## 1.4 Apoplastische Proteine und ihre Synthese

Apoplastische Proteine spielen eine Rolle in der Verteidigung der Pflanze (z.B. bei Verwundungen und bei Infektionen durch Pathogene) (Bolwell *et al.*, 2002). Dabei werden im Apoplasten als Reaktion auf die Pathogenattacken Chitinasen und Endo- $\beta$ -1,3-Glukanasen aktiviert. Apoplastische Proteine werden bei Stress gebildet, der durch Ozon, Schwermetalle, osmotische Stimuli oder auch Kälte hervorgerufen werden kann (Dani *et al.*, 2005). Apoplastische Proteine spielen auch bei zellwandspezifischen Prozessen wie der Expansion und Differenzierung der Zelle eine Rolle. So beeinflussen z.B. Hydrolasen, Transglykolasen, Lyasen und andere Proteine die Zellwandstruktur (Fry, 1995; Rose und Bennett, 1999;

Cosgrove, 2003; Rose *et al.*, 2003); zusätzlich sind Peroxidasen für die Vernetzung der Zellwand verantwortlich. Die Expansion der Zelle wird durch äußere Einflüsse wie Licht, Schwerkraft, Sauerstoff, oder Wassermangel beeinflusst.

Proteine, die in den Apoplasten sekretiert werden, werden im ER synthetisiert und durch den Golgiapparat zum Apoplasten transportiert. Golgiapparat und ER liegen häufig nahe beieinander. Vom ER werden die so genannten Primärvesikel abgeschnürt und zur cis-Seite des Golgiapparats transportiert, hier fusionieren sie zu einer Zisterne (Moore *et al.*, 1991). Die cis-Seite wird auch als Regenerations- und Bindungsseite bezeichnet. Auf der trans-Seite des Golgiapparats kann man dagegen häufig einen Zerfall der Dictyosomenzisternen in die Golgivesikel beobachten (Sekretions- oder Reifungsseite) (Staelin und Moore, 1995).

#### **1.4.1 Proteinsynthese, Zielsteuerung und Modifikation der Proteine**

Die Proteinbiosynthese der Eukaryonten ist monocystronisch. Die Blockade erfolgt am 5'-Ende durch eine Cap-Sequenz, am 3'-Ende durch eine Adenylsäure-reiche ca. 200 Nukleotide lange Sequenz. Beide Modifikationen schützen die mRNA (Messenger-RNA) und tragen zur Stabilität bei. Die Initiationsphase der Translation verläuft bei Eukaryonten als ein komplexer Vorgang. Dies wird verständlich, wenn man an die Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle denkt, an ihre oft weitgehende Spezialisierung, sowie an die laufende Anpassung der physiologischen Schwankungen. Das Startcodon ist fast immer AUG. Das vom 5'-Ende der mRNA gesehene erste AUG wird als Initiationscodon genutzt. Nachfolgende AUG-Trinukleotide dienen als Elongationscodon für Methionin. Besonders komplex ist das Wechselspiel der vielen Initiationsfaktoren. Die t-RNA (Transfer-RNA) transportiert einzelne Aminosäuren in aktivierter Form zu den Ribosomen und ermöglicht so das Verlängern der Proteinkette. Welche Aminosäuren wo eingebaut werden, bestimmt die Sequenzabfolge der mRNA. Das Polypeptid wächst vom Aminoende in Richtung Carboxyende durch schrittweise Addition von Aminosäuren.

Eukaryontische Ribosomen können in zwei Klassen eingeteilt werden, die cytosolischen und membrangebundenen. Beide Ribosomenklassen sind strukturell identisch. Sie unterscheiden sich lediglich durch die Art der Polypeptide, die sie synthetisieren. Freie Ribosomen synthetisieren meist lösliche und mitochondrialen Proteine. Membrangebundene Ribosomen synthetisieren dagegen Transmembranproteine, Proteine, die sekretiert werden, innerhalb des ER wirken oder in Lysosomen (membranhüllten Vesikeln, die eine Batterie von Hydrolyseenzymen zum Abbau hochmolekularer Zellkomponenten zum Recycling enthält) inkorporiert werden.

Noch während das Protein am Ribosom synthetisiert wird, beginnt sich die Kette vom N-terminalen Ende her in eine definierte Tertiärstruktur zu falten. Auch eine Quartärstruktur kann sich schon ausbilden. Auf diese Weise werden Proteine vor proteolytischem Abbau durch cytosolische Proteasen geschützt. Die post-translationale Modifikation läuft teilweise im Cytosol, in den Organellen und in den Intermembranräumen ab.

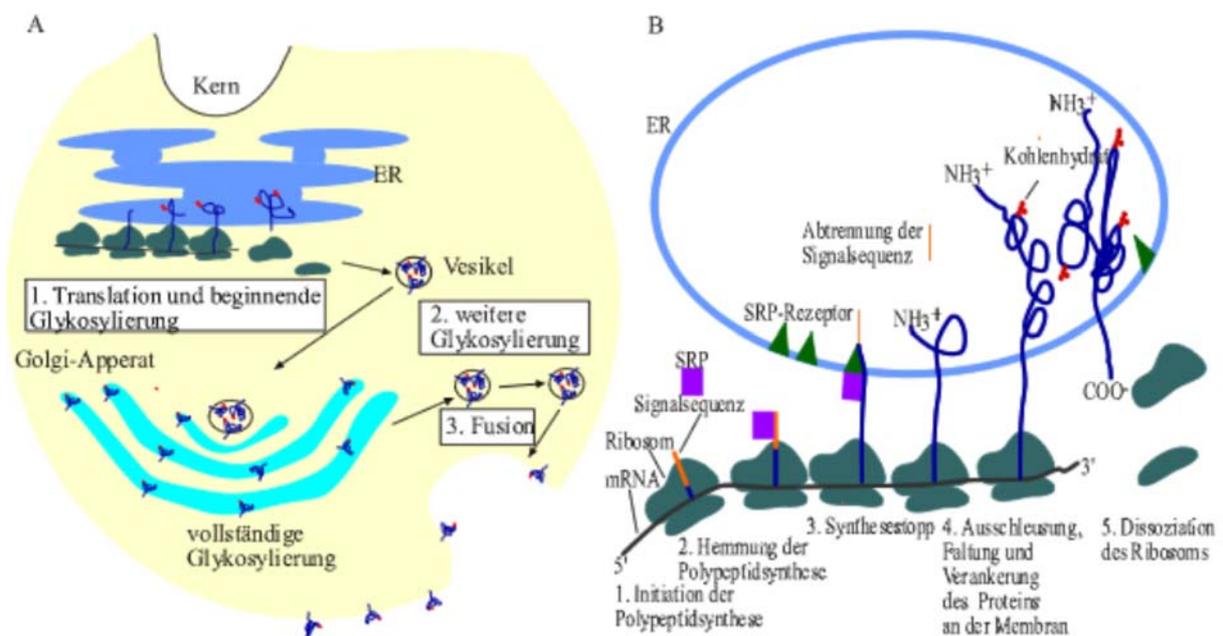
Nach ihrer Synthese müssen Proteine zu ihrem Funktionsort dirigiert werden. Bei Prokaryonten sind dies z.B. das Cytoplasma, die innere Membran, der Intermembranraum oder der extrazelluläre Raum, bei Eukaryonten Mitochondrien, Chloroplasten oder der Apoplast. Zur Zielbestimmung benutzen Pro- und Eukaryonten Signalsequenzen.

Alle sekretierten ER- und lysosomalen Proteine, auch viele Transmembranproteine der Eukaryonten werden mit einer N-terminalen Leitsequenz aus 13- 36 Aminosäuren, dem so genannten Signalpeptid synthetisiert (von Heijne, 1990a,b; Rapoport, 1992; Rusch und Kendall, 1995; Schatz und Dobberstein, 1996). Die Signalsequenzen besitzen folgende Eigenschaften:

- Das N-terminale Ende enthält mindestens einen positiv geladenen Rest (*n*-Region).
- Das Zentrum der Signalsequenz besteht aus 12-15 hydrophoben Aminosäuren (*h*-Region).
- Der C-terminalen Spaltstelle sind ca. 5 Aminosäuren vorgelagert (*c*-Region).

Ansonsten zeigen die Sequenzen wenig Ähnlichkeit. Das Signalpeptid taucht aus der ribosomalen Oberfläche empor, nachdem ca. 80 Aminosäuren miteinander verknüpft wurden. Ein Nucleoprotein, das so genannte Signalerkennungsprotein (SRP, signal recognition particle) bindet an das Ribosom. Dadurch wird das Wachstum der Polypeptidkette blockiert und sie gelangen nicht ins Cytosol. Der SRP-Ribosomenkomplex diffundiert zur Oberfläche des ER und wird dort an den SRP-Rezeptor (Docking Protein) gebunden. Das gebundene Ribosom nimmt die Peptidsynthese wieder auf und der wachsende Peptidfaden kann mit seinem Aminoende durch die Membran in das Lumen des ER eindringen. Durch Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen (Chaperonen) wird verhindert, dass die wachsende Peptidkette eine für den Membrandurchtritt hinderliche Struktur einnimmt. Nachdem das Signalpeptid in das Lumen des ER gelangt ist wird es durch eine membrangebundene Signalpeptidase abgetrennt. Polypeptide mit Signalpeptid werden als Präprotein bezeichnet. Andere Enzyme im Lumen initiieren eine post-translationale Modifikation des noch wachsenden Polypeptidfadens, wie etwa die spezifische Anheftung von Kohlehydraten, um Glykoproteine zu bilden (Robinson und Ellis, 1984; Hawlitschek *et al.*, 1988; Arretz *et al.*, 1991).

Am Ende der Polypeptidsynthese dissoziiert das Ribosom vom ER ab. Sekretorische, ER- und lysosomale Proteine durchdringen das ER vollständig und gelangen in das Lumen. Transmembranproteine haben einen hydrophoben ca. 20 Aminosäuren langen Membrananker oder eine Transfer-Stop-Sequenz, wodurch die Passage der wachsenden Polypeptidketten durch die Membran arretiert wird. Transmembranproteine bleiben in der ER-Membran eingebettet, wobei das Carboxyende auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert ist (Abb.3A). Alle anderen Proteine werden über Vesikel vom ER zum Golgiapparat transportiert. Hier erfolgt eine weitere post–translationale Modifikation der Proteine, wie z.B. die Bildung der Glykoproteine. Im Golgiapparat werden die Proteine sortiert und in membranumhüllte Vesikel gepackt, wodurch sie an ihren endgültigen Bestimmungsort transportiert werden können (Abb. 3B).



**Abb. 3 (A) Post-translationale Prozessierung integraler Membranproteine.** (1) Bereits während der ribosomalen Synthese beginnt die Glykosylierung im Lumen des ER. (2) Nach beendeter ribosomaler Synthese schnüren sich Vesikel vom ER ab, die das Protein enthalten und transportieren das Protein zum Golgiapparat, wo die Prozessierung beendet wird. (3) Danach schnüren sich wiederum Vesikel mit dem nativen Protein aus dem Golgiapparat ab und fusionieren mit der Membran des endgültigen Ziels der Proteine, z.B. mit der Plasmamembran.

**(B) Synthese eines membrangebundenen Proteins.** (1) Die Initiation der Polypeptide erfolgt an der mRNA, die Ribosomen binden an diese. (2) Ist eine Signalsequenz in der wachsenden Peptidkette vorhanden, so bindet ein Signalerkennungspartikel (SRP) daran und hemmt die Polypeptidsynthese. (3) Der SRP-Ribosomenkomplex diffundiert zur Oberfläche des ER und wird dort an den SRP-Rezeptor gebunden. (4) Wiederaufnahme der Peptidsynthese, der wachsende Peptidfaden kann mit seinem Aminoende durch die Membran in das Lumen des ER eindringen. Abspalten der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase und post-translationale Modifikation. (5) Am Ende der Polypeptidsynthese, Dissoziation des Ribosoms (Voet und Voet, 1994).

Der Export löslicher Proteine, die im ER eine Aufgabe übernehmen, wird durch die Sequenz Lys-Asp-Glu-Leu am Carboxyende unterbunden; eine Änderung dieser Sequenz bewirkt ihre Sekretion.

Die Signalthypothese gilt auch für Bakterien. Bakterien synthetisieren Proteine im Cytosol. Ihre Ribosomen assoziieren mit der Plasmamembran und können Proteine, die N-terminale Signalsequenzen besitzen, direkt in das Periplasma hinein synthetisieren. Von dort aus gelangen die Proteine über die äußeren Membranen in das Medium. Die Leitsequenzen tragen ähnliche Motive wie die der Eukaryonten (von Heijne, 1985).

## 1.5 Die Analyse der apoplastischen Proteine

Die Extraktion der apoplastischen Zellwandproteine ist schwierig. Durch die mannigfaltige Verknüpfung zwischen den Proteinen und Zellwandpolysacchariden zeigen die Zellwandproteine eine geringe Löslichkeit; auch die Modifikationen, wie die Glykosylierung erschweren die Analyse. Kontaminationen durch andere Zellkompartimente während der Präparation können nicht verhindert werden, was zu großen Fehlern und somit zur Verfälschung der Ergebnisse führen kann.

Erste Versuche der Proteom Analyse erfolgte durch die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) und die Massenspektroskopie (MS) in *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* (Shevchenko *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1996). Die Auflösung und Reproduzierbarkeit der 2D-Elektrophorese ist allerdings ein limitierender Faktor. Es gelang, durch die Weiterentwicklung der MS-Technik zur Matrix-Associated-Laser-Desorption Ionization (MALDI) in Kombination mit Time-of-flight (TOF) die Sensitivität und Reproduzierbarkeit zu verbessern (Karas und Hillenkamp, 1988; Aebersold und Mann, 2003). Auch sind Proteomic Analysen kosten- und zeitintensiv. Sie bieten keine Möglichkeit des Hochdurchsatzverfahrens. Eine Verbesserung der Methode wurde durch eine Separierung der zu untersuchenden Probe in Zellkompartimente, wie die Organellen erzielt. So wurde die Auflösung erhöht und die Gesamtkomplexität vereinfacht (Jung *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* gelang es die Proteine verschiedenster Organelle inklusive der Plasmamembran (Santoni *et al.*, 1998; Kawamura und Uemura, 2003) und des Apoplasten (Robertson *et al.*, 1997; Chivasa *et al.*, 2002; Haslam *et al.*, 2003; Ndimba *et al.*, 2003; Boudart *et al.*, 2005), aber auch post-translationale Modifikationen (Vener *et al.*, 2001; Borner *et al.*, 2002; 2003; Elortza *et al.*, 2003) zu analysieren. Durch die fortschrittliche Entwicklung der MS-Technologie und der Möglichkeit, auf komplette Genomsequenzen zurückgreifen zu können, ist es heute möglich, Proteine von Organellen oder Geweben unter unterschiedlichen Umwelteinflüssen zu untersuchen. Die Proteomics Analyse der *Arabidopsis* Zellwandproteine steht dabei noch am Anfang. Neben den analytischen Verfahren zur Untersuchung der in den Apoplasten sekretierten Proteine wurden weitere Selektionsverfahren entwickelt. Dabei wurden Gene mit

N-terminaler Signalsequenz durch eine translationale Fusion mit einem Reporter gen identifiziert. Dem Reporter gen fehlt bei dieser Art der Selektion das entsprechende Sekretionssignal. Das erste Selektionssystem wurde von Tashiro *et al.* (1993) entwickelt. Tashiro wollte sekretorische Gene einer cDNA aus einer Stromazelle des Knochenmarks isolieren. Dabei wurde die cDNA in einen Vektor ligiert, der über  $\alpha$ -Einheit des Interleucin-2-Rezeptors (Tac) verfügte. Die Fusion beider Einheiten wurde durch spezifische Tac-Antikörper in COS-7 (African green monkey, kidney) Zellen nachgewiesen. Die geringe Transfektionsrate der Zelllinie von 200 Klonen schränkte die Methode zu Screeningzwecken jedoch ein.

Riesmeier *et al.* (1992) entwickelten ein Selektionssystem für Saccharose-Transportproteine in *S. cerevisiae* (nicht für apoplastische Proteine). Dabei wurde der Hefestamm YSH 2 64-1A verwendet, der Saccharose und Maltose aus dem Medium nicht aufnehmen konnte. Eine cDNA, die aus Spinatblättern isoliert wurde, diente als Ausgangsmaterial zu Identifikation von Saccharose-Transportproteinen. Die cDNA wurde in einen Vektor mit Invertase-Gen ohne Signalsequenz kloniert. So konnten alle positiven Klone, bei denen eine Fusion zwischen einer Signalsequenz aus einem Gen der cDNA und der fehlerhaften Invertase stattfand auf Medium mit Saccharose wachsen. Jacobs *et al.* (1997) griffen dieses Selektionssystem auf, um aus einer cDNA humaner peripheraler Blutzellen (PBMC) Gene, die für Sekretionsproteine kodierten, zu isolieren. Neben Cytokinen konnten als Neuentdeckung Chemokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gefunden werden. Auch Yamane *et al.* (2005) verwendete das Invertase-Selektionssystem, um die sekretorischen Proteine einer cDNA aus bestäubten und nichtbestäubten Stempeln des Pfirsichs *Prunus persica* zu identifizieren, die an der zellübergreifenden Kommunikation benachbarter Zellen während der Bestäubung des Stempels beteiligt sind. Neben Proteinen der Abwehrreaktion konnten auch Glykoproteine identifiziert werden, die für die Haftung der Pollenwand am Stempel verantwortlich sind.

Surpili *et al.* (2002) wandelten die Methode der Hefeselektion ab, indem sie als Reporter PHO5 verwendeten. PHO5 kodiert für eine saure Phosphatase, die bei Verbrauch der Phosphatreserven der Zelle in den periplasmatischen Raum sekretiert wird, um aus dort eventuell vorhandenen organischen Phosphatverbindungen Phosphat zu gewinnen. Eine cDNA wurde aus Kartoffelschließzellen gewonnen und in einen Vektor kloniert, der *pho5* trug, das über keine Signalsequenz und kein Startcodon verfügte. Die Selektion erfolgte im *S. cerevisiae* phosphatasedefizienten Stammes YHH-33. Die PHO5 Aktivität konnte anhand der Bildung eines roten Diazofarbkomplexes nachgewiesen.

Auch Transposons konnten in unterschiedlicher Art und Weise zur Selektion von Sekretionsproteinen genutzt werden (Gentschev *et al.*, 1996; Das und Xie, 1998; Ravn *et al.*, 2000; Gibson und Caparon, 2002). Eine Modifikation des MuA-Transposons (SigA2) aus Bakteriophagen wurde in Becker *et al.* (2004) beschrieben. SigA2 trug dabei als Reportergen die  $\beta$ -Lactamase ohne Signalsequenz. Die  $\beta$ -Lactamase des SigA2 Transposon konnte nur dann aktiv werden, wenn es zu einer Insertion in ein Gen mit N-terminalem Sekretionssignal und einem benötigten Fusionsprodukt im Leserahmen kam. Wurde das getaggte Gen in *E. coli* transformiert, so konnten die Wirtszellen aufgrund dieser Fusion auf Ampicillin wachsen. Als weiterer Selektionsmarker trug SigA2 Chloramphenicol. Gene mit N-terminaler Signalsequenz, die für sekretorische Proteine kodiert konnten auf diese Weise aus einer Gen-Bibliothek der Bakterien *Bacillus haldodurans* und *Sulfolobus solfataricus* identifiziert werden.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Identifikation apoplastischer Proteine, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Als Modellsystem der Zellwandneubildung sollten regenerierende Protoplasten dienen. Während der Regeneration bilden Protoplasten eine vollständige neue Zellwand. Als Selektionssystem sollte das Transposon-Assisted-Signal Trapping (TAST) verwendet werden. Nach erfolgter Selektion sollten die N-terminalen Signalsequenzen dieser Proteine anhand von bioinformatischen Programmen untersucht und die apoplastische Lokalisation einiger ausgewählter Kandidatengene durch GFP-Fusion verifiziert werden. Um die Rolle der selektierten Gene während der Zellwandsynthese besser einordnen zu können, sollte ihre Expression während der Protoplastenregeneration geprüft werden.

Die Funktion einzelner Gene, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, kann durch das Ausschalten des zu untersuchenden Gens in Knockout Mutanten untersucht werden. Eine *Arabidopsis* T-DNA Mutante wurde in einem phänotypischen Screen anhand ihres Wurzellängenwachstums auf sachharosehaltigem Medium von Dr. Wolf-Rüdiger Scheible (Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland) isoliert. Diese T-DNA Mutante wies ein stark verkürztes Wurzelwachstum auf. Durch Plasmidrescue wurde die Insertion der T-DNA im Gen At1g63180 (UDP-glucose epimerase like protein, *UGE3*) festgestellt. Als Epimerase katalysiert UGE in *A.thaliana* die Reaktion der Nukleotidzucker UDP-D-Glukose zu UDP-D-Galaktose, aber auch die Umkehrreaktion. Da *UGE3* ein Nukleotidzuckermodifizierendes Enzym ist und möglicherweise an der Synthese der Zellwandpolysaccharide beteiligt ist, sollte die T-DNA Mutante analysiert werden. Galaktose ist in den unterschiedlichen Komponenten der Zellwand enthalten. Galaktose kann sowohl Bestandteil der primären Zellwandkomponenten der Pektine und Hemizellulosen, sowie der Proteine der Zellwand (APGs) sein. Galaktose kann auch in Speicherstoffen wie z.B. der Raffinose enthalten sein und unter anderem auch als Bestandteil der Membranen der Chloroplasten in Form von Galaktolipid vorkommen. Deshalb sollte die Zusammensetzung der Zellwand, der Gehalt der Speicherstoffe und anderer Bestandteile der Zelle in der Mutante im Vergleich zum Wildtypen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen, wenn nicht anders angegeben. Pflanzen- und Bakterienmedien wurden mit Produkten von Difco Laboratories (Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Standard molekularbiologische Kits und Säulen wurden von den Firmen Machery und Nagel (Düren, Deutschland) und Qiagen (Hilden, Deutschland), das SMART™ cDNA Library Construction Kit von Clontech (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) bezogen. Restriktionsenzyme und T4 DNA Polymerase waren Produkte der Firmen Roche (Mannheim, Deutschland) und New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland). Taq und Pfu Polymerase wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Das Enzym Cellulase Onozuka R-10 kam von der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland) und Macerozym R-10 von der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande).

#### 2.1.2 Primer

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma TibMolBiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert:

Primer der Real-time und RT-PCR:

At1g72530_for	5'-GATGGTGACAATAGATACGGAGGA-3'
At1g72530_rev	5'-TCATCATACGGAACAACCTTCTCCA-3'
At2g28390_for	5'-AACTCTATGCAGCATTGATCCACT,
At2g28390_rev	5'-TGATTGCATATCTTTATCGCCATC-3'
At3g18780_for	5'TCCCTCAGCACATTCCAGCAGAT-3'
At3g18780_rev	5'AACGATTCCTGGACCTGCCTCATC-3'
At4g05320_for	5'-GGCCTTGATAAATCCCTGATGAATAAG-3',
At4g05320_rev	5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT-3'
At4g26410_for	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3'
At4g26410_rev	5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'
At4g27960_for	5'-TCACAATTTCCAAGGTGCTGC-3'
At4g27960_rev	5'-TCATCTGGGTTTGGATCCGT-3'
At4g33380_for	5'-TTGAAAATTGGAGTACCGTACCAA-3'
At4g33380_rev	5'-TCCCTCGTATACATCTGGCCA-3'

At4g34270_for	5'-GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA-3'
At4g34270_rev	5'-TCAACTGGATACCCTTTTCGCA-3'
At4g38070_for	5'-GAAAGCAAAGGGCGGTGAGAG-3'
At4g38070_rev	5'-CAAGGCACACTTGGTTCTTCC-3'
At5g46630_for	5'-TCGATTGCTTGGTTTGGGAAGAT-3'
At5g46630_rev	5'-GCACTTAGCGTGGACTCTGTTTG-3'
At5g15710_for	5'-TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT-3'
At5g15710_rev	5'-GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA-3'
RT1_real_for	5'-TGGACATGACTATCCCACCGA-3'
RT1_real_rev	5'-AGCAATAGCTTCCTGAGCGC-3'
RT2_real_for	5'-TGTCTATGGCTGGCCTAAGGAG-3'
RT2_real_rev	5'-GGTTAGTGGCAGAAATTGGTGACT-3'
RT3_real_for	5'-TTCTGAGGTACTTCAATCCGGTTG-3'
RT3_real_rev	5'-CGGTATGCCCTTTGGATCTTCCT-3'
RT4_real_for	5'-TTCTCTCTCGTTTCGATCCAA-3'
RT4_real_rev	5'-CCTGGTGGACGGTGAGATTTT-3'
RT5_real_for	5'-TATACGGTTCTGACCCGGAATG-3'
RT5_real_rev	5'-GGATTGTGCACCAACAGGATTG-3'
RTApt1A	5'-TCCCAGAAATCGCTAAGATTGCC-3'
RTApt1B	5'-CCTTTCCTTAAGCTCTG-3'
RT_new_3_for	5'-TTTCAGACTCAAAGATTGGCTGTA-3'
RT_new_3_rev	5'-GCTTCTTCTGGAAACCCCAT-3'

Primer der CATMA-Kollektion:

	Forward-Primer		Reverse-Primer
C1	5'-CTTACGTTCTGTCGGAC-3'	R1	5'-TATCCGAGCGTCAGCTA-3'
C3	5'-GGCTTTACAGTTACGGG-3'	R2	5'-CCACTTGGGCACACTAT-3'
C4	5'-TTGCCAAGAGGGTCTAC-3'	R3	5'-GGGTACCTTCGCATTAC-3'
C5	5'-CACCTCGGATCGTTTTA-3'	R4	5'-TGCGCAATCGTTCAGTC-3'
C6	5'-CACCTCGGATCGTTTTA-3'	R5	5'-GTACCAGCGGTTTATTA-3'
C7	5'-AGCGACGGCATTCTATC-3'	R6	5'-TACCGTATTGCCGAAGG-3'
C8	5'-GTTATACGACGGACAGC-3'	R7	5'-TGGCAACGTGCCCTTAT-3'
C9	5'-CCTGTGCGACGTTATCT-3'	R8	5'-TACCCAGACTTCCGTTT-3'
C10	5'-AAGGGAGTCCGGTGTAT-3'	R9	5'-GGCGAAGCGTTCCATTA-3'
C11	5'-GCCAAGTTGCGTGTCTA-3'	R10	5'-TACCTTACCGACCGAGT-3'
C12	5'-TATACGAATTCCTGGGG-3'	R11	5'-CGCTACAGCGCACTTTA-3'
C13	5'-TTCTACCGGACCTACCA-3'	R12	5'-GCGCACAGGTTGTCTAT-3'
C14	5'-AAGATACGGCACGCTAC-3'	R13	5'-ACGCCTTCATTCGTCTA-3'
C15	5'-GTCCGCTGTATACGAGA-3'	R14	5'-TGCGACGTCAATTCAGT-3'
C16	5'-GCGAGTTCGTACGACAT-3'	R15	5'-CGCAGCCAGGTGTATTA-3'
C17	5'-TACCCTGTGTCCCGTTT-3'	R16	5'-GTGCCTTCGACAGACTA-3'
C18	5'-CGCGTATTGCGAGAGTA-3'		
C19	5'-CCTACGGTATCGTGTC-3'		
C20	5'-CCGATATCCAGTCAGGA-3'		
C21	5'-CGCGTTCTATCCTACAG-3'		
C22	5'-GTACGCGTTACACGAGT-3'		
C23	5'-CCCTACGGCAATTCGT-3'		
C24	5'-GGGTCTATCTGGTCAT-3'		

Primer zur Amplifikation der GFP-Konstrukte (Endonuklease-Schnittstellen sind angegeben und unterstrichen):

At3g12120 (XhoI)	5'- <u>CTCGAGAT</u> GGGGTGCAGGTGGAAGAATGC-3'
At3g12120 (Sall)	5'- <u>GTCGACT</u> AACTTATTGTTGTACCAGTACACA-3'
At3g13520 (XhoI)	5'- <u>CTCGAGAT</u> GGAGTCAATGAAGATGAAGC-3'

At3g13520 (Sall)	5'- <u>GTCGAC</u> GAAAGAGAAACCCTGATGCCAA-3'
At3g46430 (XhoI)	5'- <u>CTCGAGAT</u> GAGGTTGTTTCGATCCATGGC-3'
At3g46430 (Sall)	5'- <u>GTCGACCCTTCTGTGTTGCTGGAC</u> GAA-3'
At4g19810 (XhoI)	5'- <u>CTCGAGAT</u> GTCTTCAACAAAACATCATATCG-3'
At4g19810 (Sall)	5'- <u>GTCGACAACCTTCTGTATAGTTCTGGTGG</u> -3'
At4g24780 (XhoI)	5'- <u>CTCGAGAT</u> GGCTTCTTCTTCTTTTGGTC-3'
At4g24780 (Sall)	5'- <u>GTCGACAAGAAGAAGGCC</u> CATAATCCAA-3'
At4g31840 (XhoI)	5'- <u>CTCGAGAT</u> GGCTTCTTCTTCTTTTGG-3'
At4g31840 (Sall)	5'- <u>GTCGACAAAGAAGAAGGCC</u> CATAATCCA-3'
At5g64040 (EcoRV)	5'- <u>GATATCAT</u> GGCGGCCATGAACTCGAGTGT-3'
At5g64040 (Sall)	5'- <u>GTCGACCCATTTCCAGAAAACATTGGAACCA</u> -3'

## Sequenzierungsprimer des TAST Systems:

SeqA	5'-AGCGTTTGC GGCCGCGATCC-3'
SeqB	5'-TTATTCGGTCGAAAAGGTCC-3'
Vec_for	5'-ATGCAGCTGGCACGACAGGT

## Primer der T-DNA Screens:

START	5'-ATGGGTTCTTCTGTGGAA-3'
STOP	5'-TCAAATAGATGCAGGAAAAT-3'
RB	5'-GCAATAATGGTTTCTGACGT-3'
LB_new	5'-GGAGATATCACATGAATCCAG-3'
5	5'-ATATTGACCATCATCTCATTGC-3'
10	5'-AGAAGGTTTTCTCCGAAACA-3'
11	5'-CAGTAGCGGACGAAGAAAAT-3'
Screen3Prom_for	5'-GACTCTTTAAATCCTTGTGTC-3'
Screen3Prom_rev	5'-ACCACCAGTCACCAAATGT-3'
T-DNA_for	5'-TCAGAAACCATTGCGCGTTCAA-3'
T-DNA_rev	5'-ACGAGGAAGCGGTCAGCAGCCCA-3'
Sul_for	5'-CCACACGTGGATCGATCCGT-3'
Sul_rev	5'-GAACCCTAATTCCCTTATCTGGG-3'

## Primer der Konstruktamplifikationen (Endonuklease-Schnittstellen sind angegeben und unterstrichen):

UGPR-3_for (SmaI)	5'- <u>TCCCCCGGGCAAACCCACTTCCCAA</u> AATC-3'
UGPR-4_rev (Sall)	5'-AGCGCG <u>TCGACAGGGAAACGAATTT</u> CGAAT-3'
UGCOM-1_for	5'-AAACTTTATACTTTATTAACCGAA-3'
UGCOM-2_rev (BglII)	5'-GGA <u>AGATCTTTTTT</u> ATTTGGTCAA-3'
UGCOM-3_for (BglII)	5'-GGA <u>AGATCTTGT</u> TGGAACAAAAGAGAGAT-3'
UGCOM-4_rev	5'-CGCCTTGTGCGTACGTTGAT-3'
Linker-1_for (KpnI)	5'- <u>GGTACCCCGCGC</u> GACACCG-3'
Linker-2_rev (EcoRI)	5'- <u>GAATTC</u> CGGTGTCGCGCGG-3'
Antis-03_for (SmaI)	5'- <u>TCCCCCGGGCTGCAGTGA</u> ACTATAAATGA-3'
Antis-03_rev (Sall)	5'-ACGCG <u>TCGACTTAAATAGTGA</u> AGAAAGCTT-3'

### 2.1.3 Plasmide (Vektoren und Konstrukte)

Plasmidname	Funktion	Referenz
pA7-GFP	Expression in Pflanzenzellen (nicht dauerhaft)	Dr. Czempinski, Universität Potsdam, Deutschland
pBI101.1	Stabile Expression des GUS-Gens in Pflanzen, Kanamycin-Resistenz in Pflanzen	Jefferson <i>et al.</i> (1987)
pBinAR	Stabile Überexpression in Pflanzen durch 35S-Promotor, Kanamycin-Resistenz in Pflanzen	Höfgen und Willmitzer (1990)
pBinAR-Hyg	Stabile Überexpression in Pflanzen durch 35S-Promotor, Hygromycin-Resistenz in Pflanzen	Höfgen und Willmitzer (1990)
pCRII-Topo	Klonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pMHas7i	Klonierungsvektor	Dr. Schnorr, Novozymes, Kopenhagen, Dänemark
mitochondriale GFP-Kontrolle: pre101	pre-b: Untereinheit b der mitochondrialen ATPase aus <i>N. plumbagnifolia</i> in pA7-GFP	Dr. Czempinski, Universität Potsdam, Deutschland
apoplastische GFP-Kontrolle	ATP-Diphosphorylase (RROPI) aus <i>Solanum tuberosum</i> in pA7-GFP	Dr. Geigenberger, Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie
plasmamembran GFP-Kontrolle	Ammonium-Transporter der Plasmamembran aus <i>A.thaliana</i> (At1g64780) in pA7-GFP	Dr. Geigenberger, Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie

### 2.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper zur Markierung von Zellwandpolymeren wurden verwendet:

Antikörper Name	Immunogen	Epitopstruktur des Kohlenhydrat Antigens	Referenz	Bezug	Sekundärantikörper
CCRC-M1	Xyloglukan	$\alpha$ -L-fukosyliertes Xyloglukan	Puhlmann <i>et al.</i> (1994); Freshour <i>et al.</i> (2003)	CarboSource Services, Complex Carbohydrate Research Center, Athens, Georgia, USA	Anti-MouseIgG (Whole Molecule), FITC Conjugate (3,5 mg/ml), Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
CCRC-M2	RG I	$\alpha$ -L-fukosyliertes Rhamnogalakturonan I	Puhlmann <i>et al.</i> (1994)	CarboSource Services, Complex Carbohydrate Research Center, Athens, Georgia, USA	Anti-MouseIgG (Whole Molecule), FITC Conjugate (3,5 mg/ml), Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
LM5	RG I	$\beta$ -(1,4)-Galaktose Oligomere	Jones <i>et al.</i> (1997)	PlantProbes, Leeds, England	Anti-Rat IgG (Whole molecule) FITC Conjugate (1 mg/ml), Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
LM6	RG I	$\alpha$ -(1,5)-Arabinose Oligomere	Willats <i>et al.</i> (1998)	PlantProbes, Leeds, England	Anti-Rat IgG (Whole molecule) FITC Conjugate (1 mg/ml), Sigma, Saint Louis, Missouri, USA

## 2.1.5 Organismen

### 2.1.5.1 Bakterien

#### 2.1.5.1.1 *Escherichia coli*

Stamm	Genotyp des Stammes	Bezug
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1, lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
TOP10F'	<i>lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>); mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

#### 2.1.5.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm	Genotyp des Stammes	Bezug
pGV 3101	pmP90 (pTiC58ΔT-DNA)	Koncz und Schell (1986)

### 2.1.5.2 Pflanzen

#### 2.1.5.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Für alle Analysen wurden die Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (Linnaeus) Heynhold des Ökotypen Columbia (Col-0) und zur Lokalisationsanalyse Blätter des Ökotypen C24 verwendet.

## 2.1.6 Wachstumsbedingungen

### 2.1.6.1 Bakterien

Für *Escherichia coli* (*E. coli*) Kulturen wurde LB-Medium (Luria-Bertani) nach Sambrook *et al.* (1989), für *Agrobacterium tumefaciens* wurde YEB-Medium (Yeast Extract Broth) nach Van Larebeke *et al.* (1977) verwendet.

### 2.1.6.2 Pflanzen

#### *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* Samen wurden in 70% Ethanol (EtOH) gewaschen und anschließend in 5% Natriumhypochlorid, 0,2% Triton X-100 für 15 Min sterilisiert. Die sterilisierten Samen wurden 4-5 Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Zur Analyse der Samen auf Festmedium, wurden diese in 0,15% Agarose auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) ausgelegt. Als Zuckerquelle diente standardmäßig 1% Saccharose und zur Festigung des Mediums wurden 1,2% Agar oder 0,5% Gelrite verwendet. Zur Analyse der Samen in Flüssigkultur wurde MS-Medium mit 1% Saccharose als Zuckerquelle verwendet.

Zur Selektion transgener Pflanzen T-DNA Knockout (KO)-Linien der GABI-KAT Kollektion (Rosso *et al.*, 2003) (Köln, Deutschland) wurden das Antibiotikum Sufadiazin (50 µg/ml) verwendet. Die Pflanzen Linie *uge3-1* wurden auf Kanamycin (10 mg/ml) selektiert. Die ausplattierten Samen wurden über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend im Phytotron bei permanentem Licht (Lichtintensität: 120 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> Licht, Feuchtigkeit: 60%, Temperatur: 20°C), im Tag/Nachtrhythmus von 8/16h Licht/Dunkelheit oder im Gewächshaus auf Erde (Einheitserde GS90, Gebrüder Patzer, Sinntal-Jossa, Deutschland) inkubiert.

Zur Selektion transformierter Pflanzen mit dem Vektor pBinAR-Hyg wurde das Antibiotikum Hygromycin (20 µg/ml) und für die Vektoren pBI101.1, pBinAR das Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml) verwendet.

### **2.1.6.3 *Arabidopsis thaliana* Zellkultur**

Zellen einer *A.thaliana* Zellkultur des Ökotypen Columbia, die aus Blattgewebe generiert wurde, wurde von Stephan Eberhard (Complex Carbohydrate Research Center, Athens, Georgia, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Medium nach Jouanneau und Péaud-Lenoël (1967) (JPL) bei permanentem Licht, auf dem Schüttler bei 92 rpm gezogen. Von dieser Kultur wurden jede Woche 12 ml abgenommen und in 100 ml frisches JPL-Medium umgesetzt. Die Zellkultur wuchs in 500 ml Erlenmeyerkolben.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

Standard molekularbiologische Methoden wie Klonierung, DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen, Trennung von DNA-Fragmenten durch Gel-Elektrophorese, sowie die Herstellung von Standardlösungen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989).

### **2.2.1 RNA-Isolation aus pflanzlichen Geweben**

Die RNA Isolation aus pflanzlichen Geweben erfolgte nach einer Methode nach Logemann *et al.* (1987). Ca. 300 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und zu einem feinen Pulver zermahlen. Dieses wurde in 2 vol. RNA-Extraktion Buffer (eine wässrige Lösung, die aus 20 mM MES (pH 7,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 6 M Guanidinhydrochlorid und 5 µl/ml β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit 2 vol. Phenol/Chloroform (1/1,v/v) versetzt. Nach 5 min Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und die Extraktion wiederholt. Die wässrige Phase wurde mit 1 M Essigsäure und 0,7 vol. 100% EtOH bei -20°C gefällt. Nach 15 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und erneut mit 1 vol. 3 M Natriumacetat (NaOAc) gefällt. Nach 15 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und mit 70% EtOH gewaschen. Danach wurde das Pellet in 50 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf 65°C erwärmt, um nichtlösliche Partikel abzutrennen. Es folgte eine 30 min Fällung mit 5 M Lithiumchlorid (LiCl) bei Raumtemperatur (RT). Nach 20 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und getrocknet. Danach wurde das Pellet in ca. 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.2 Isolation genomischer DNA aus pflanzlichem Material**

Die Isolation genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Murray und Thomson (1980). Ca. 300 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und zerkleinert. Das Blattmaterial wurde in 300 µl Extraktionspuffer (2% (w/v) Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid, 1,4 M Natriumchlorid (NaCl), 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH8,0)) für 30 Min bei 65°C inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden abgetrennt und der Überstand in 300 µl Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen. Die DNA wurde mit 300 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und anschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O (mit 0,1 µg of RNaseA) aufgenommen.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für eine Amplifikation eines PCR-Produktes waren folgende Schritte notwendig. Die Denaturierung (bei 96 °C), die Primeranlagerung bei einer Temperatur von 50°-65°C und die Verlängerung bei einer Temperatur von 72 °C. Die benötigten Zyklenzahlen lagen zwischen 25 bis 35.

### 2.2.4 Southern Blot

Genomische DNA wurden nach 2.2.2 isoliert. 2-5 µg der genomischen DNA wurden mit einer Restriktionsendonuklease (30 U) in einem 50 µl Reaktionsvolumen über Nacht verdaut. Die geschnittene DNA wurde auf durch Agarose-Gelelektrophorese separiert. Anschließend wurde das Agarose-Gel in einer 1%igen HCl Lösung bei RT für 20 Min inkubiert. Das Agarose-Gel wurde in H<sub>2</sub>O gewaschen und für 30 Min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) inkubiert. Danach wurde die denaturierte DNA durch Kapillartransfer im 10x SSPE Puffer (1,5 M NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA (pH 7,4)) auf eine Nylonmembran geblotet (Porablot, Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Nach dem Blotten wurde die Membran in 2x SSPE gewaschen und durch UV-Crosslink (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) fixiert.

### 2.2.5 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Die Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde erfolgte mit dem Prime-a-Gene labeling System (Promega, Mannheim, Deutschland). Die Sonde wurde anschließend durch die Micro G-50 Spin-Columns der Firma Amersham (Freiburg, Deutschland) aufgereinigt und denaturiert.

### 2.2.6 Hybridisierung des Blots

Nach dem Blotten der Nylonmembran wurden diese für 2 h bei 65°C im Prähybridisierungspuffer (5x SSPE, 0,1% (w/v) Ficoll 400, PVP K30, BSA, SDS je 5g und 100 mg/µl Heringssperma) inkubiert. Dann wurde die radioaktiv markierte Sonde in den Prähybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membrane einmal für 5 Min in der Waschlösung I (2x SSC, 0,1% SDS) bei RT und zweimal für 15 Min bei 65°C in Waschlösung II (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Der Nachweis erfolgt dabei durch einen photographischen Film (Kodak X-Omat AR Film, Kodak, Rochester, NY, USA).

### 2.2.7 cDNA Synthese

Gesamt RNA (2-4 µg) wurden mit DNase (1U), RNase frei (Roche, Mannheim, Deutschland) im Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) inkubiert. Die DNase wurde anschließend für 10 Min bei 75°C hitzeinaktiviert. Die First strand cDNA wurde mit M-MuLV Reverse Transcriptase (QBIogene, Heidelberg, Deutschland) nach Protokoll synthetisiert.

### 2.2.8 Semiquantitative RT-PCR

Die Qualität der amplifizierten cDNA aller RT Reaktionen (2.2.7) wurde anhand der Amplifizierung des *APT1* Transkripts, eines konstitutiv exprimierte Genes (Moffatt *et al.*, 1994) geprüft. Die verwendeten Primer wurden in Orsel *et al.* (2002) beschrieben.

### 2.2.9 Quantitative RT-PCR

Die Expressionsanalyse durch Real-time RT-PCR wurden mit 9 µl einer 1/30 (v/v) Verdünnung und dem SyberGreen Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl im GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Um die relativen Expressionslevel ermitteln zu können, wurden konstitutiv exprimierte Gene nach Czechowski *et al.* (2004) gewählt.

### 2.2.10 Pflanzentransformation

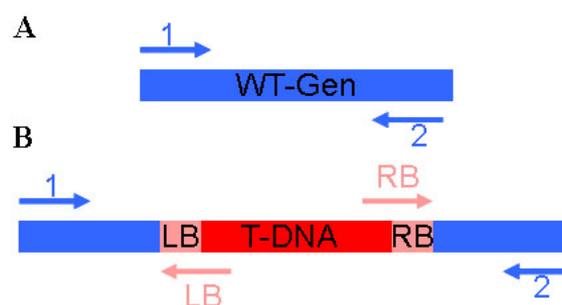
Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch Floralendip in *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Methode wurde durch Clough und Bent (1998) beschrieben. Transgene Samen konnten auf Selektivplatten (2.1.6.2) von nicht-transformierten Samen separiert werden.

### 2.2.11 Kreuzung zweier *Arabidopsis* Pflanzen

Pflanzen, die ca. 4-6 Wochen alt waren und über einen Blütenstand verfügten, der zum größten Teil aus geschlossen Blüten bestand, wurden zur Kreuzung zweier Linien verwendet. Bis auf 6 Blüten wurden alle Blüten der Pflanzen, die als mütterliche Pflanzen zur Kreuzung dienen sollten entfernt. Nur geschlossen Blüten sollten zur Kreuzung gewählt werden, um eine schon erfolgte Bestäubung ausschließen zu können. Aus diesen 6 Blüten wurden alle Stamen entfernt, nur der der Blüte Stempel sollte bestehen bleiben. Nach einer Ruhepause von 2 Tagen wurden diese Blüten mit den Pollen der zu kreuzenden männlichen Pflanze bestäubt.

### 2.2.12 Molekulare Analyse von *Arabidopsis* T-DNA Mutanten

*Arabidopsis* T-DNA Mutanten wurden durch die GABI-KAT Kollektion (Rosso *et al.*, 2003) (Köln, Deutschland) bezogen. Homozygote Linien wurden durch PCR Screening ermittelt (Abb.4).



**Abb. 4** Homozygote KO-Linien wurden durch PCR-Screening ermittelt. (A) WT Gen: Das WT Gen konnte mit den genspezifischen Primern 1 und 2 amplifiziert werden. (B) WT Gen mit T-DNA Insertion: Das WT Gen kann nicht mehr mit den genspezifischen Primern 1 und 2 amplifiziert werden, da die Insertion der T-DNA zu groß ist. Je nach Orientierung der T-DNA können die genspezifischen Primern (1 und 2) mit den Borderspezifischen Primern der linken Borderseite (LB) und der rechten Borderseite (RB) der T-DNA kombiniert werden und so die Insertionsstelle der T-DNA festgestellt werden.

### 2.2.13 Sequenzierung

Alle DNA Sequenzierungen erfolgten durch die Firma DLBMC (Berlin, Deutschland) oder Novozymes AS, Kopenhagen, Dänemark).

### 2.2.14 Herstellung einer cDNA Bank

Nach der Isolation der Gesamt-RNA (2.2.1) wurden 40 µg zur Isolation der polyA<sup>+</sup> mRNA durch Oligotex Suspension (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Herstellung einer cDNA Bank erfolgte durch das SMART™ cDNA Library Construction Kit nach Herstellerhinweisen (Clontech, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Die cDNA Bank wurde in den *E.coli* Vektor pMHas7i durch die SfiI-Restriktionsschnittstellen kloniert und anschließend in One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transformiert. pMHas7i ist die modifizierte Form des Vektors pMHas5 (WO 03/044049 A1), bei der durch die EcoRI- und NotI-Schnittstellen ein Teilstück der Multiple-Cloningsite des Vektors pTriplEx2 (Clontech, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) eingefügt wurde. Dieses Teilstück beinhaltet die für die weitere Klonierung benötigten SfiI-Schnittstellen. Die Modifizierung des Vektor pMHas5 wurde durch Novozymes AS (Kopenhagen, Dänemark) durchgeführt. Positiven Transformanten wurden auf LB-Agarplatten durch Kanamycin (25 µg/ml) selektiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Herunterwaschen mit dem S1 Buffer und anschließend nach Herstellerangaben mit dem DNA Midiprep Kit NucleoBond PC100 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert.

### 2.2.15 Transposon assisted signal trapping (TAST)

Die Transposon-Tagging Reaktion erfolgte bei RT durch die Inkubation von 500 ng cDNA (2.2.14) mit 4 µl 5x Reaktionspuffer für MuA Transposase, 2 µl SigA2 (134 ng/µl) (Abb.2), 1 µl MuA Transposase und 11 µl H<sub>2</sub>O (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland). SigA2 trug neben einer Chloramphenicol-Resistenz eine β-Lactamase, ohne Signalsequenz (Abb.5).



**Abb. 5 Das Transposon SigA2.** Das Transposon trägt neben der Chloramphenicol Resistenz das Gen β-Lactamase, ohne Signalsequenz. Die Primer SeqA oder SeqB wurden zur Sequenzierung verwendet.

Die Transposonreaktion wurde bereits im internationalen Patent WO 03/0440440 und in Becker *et al.* (2004) beschrieben. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (65°C) gestoppt und die getaggtten Plasmide in *E.coli* Zellen transformiert. Die transformierten *E.coli* Zellen wurden auf LB-Agarplatten (Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (10 µg/ml) und Ampicillin (15 µg/ml)) für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die überlebenden Kolonien wurden auf LB-Agarplatten umgesetzt, die Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (10 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) enthielten. Die DNA von den verbliebenen Kolonien wurde durch das QIAprep 96 Turbo Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Vorschrift isoliert.

### 2.2.16 Sequenzierung der getaggtten Plasmide

Der Transposonprimer SeqA oder SeqB (Abb.5) wurde zum Sequenzieren der getaggtten DNA verwendet (durch Novozymes AS, Kopenhagen, Dänemark). Das Entfernen von Vektorsequenzen, Sequenzen schlechter Qualität und das Zusammensetzen der resultierenden Contigs erfolgte durch die Software phredPhrap (Ewing *et al.*, 1998) bei Novozymes (Kopenhagen, Dänemark)

Die Identifizierung aller sequenzierten DNA Fragmente und Proteinanalyse erfolgt durch Blasten in NCBI und in der EMBL-EBI Datenbank.

Die Sequenzierung der ungetaggtten Klone erfolgte mit den vektorspezifischen Primern Vec\_for durch DLMBC (Berlin, Deutschland).

## 2.2.17 Expressionsanalyse durch Macroarray

Kandidatengene wurden durch PCR, unter Verwendung der GST CATMA Kollektion (Complete *Arabidopsis* Transcriptome MicroArray) amplifiziert (<http://www.catma.org>). Die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem Forwardprimer C (C1, C3-24) und dem reversen Primer R (R1-16).

Die GSTs der CATMA Kollektion konnten in folgenden Platten und Primerkombinationen amplifiziert werden (Tab.1):

**Tab. 1 Plattenposition und Primerkombination für die Amplifikation der entsprechenden GSTs der CATMA-Kollektion.** Dabei wurde die Nummer der CATMA-Platte in der CATMA-Kollektion, die Position des GSTs auf der Platte, der AGI-Code des Arabidopsissgens, die Länge des GSTs und die benötigten Forward- (F) und Reverseprimer (R) angegeben. (CATMA: Complete *Arabidopsis* Transcriptome MicroArray, GST: Gene Sequence Tag, AGI: *Arabidopsis* gene identification)

CATMA Platte	Position	AGI Code	Länge	C	R	CATMA Platte	Position	AGI Code	Länge	C	R
CATMA0101001	F11	At2g02120	295	11	6	CATMA0101091	B1	At3g56310	400	1	10
CATMA0101003	C11	At2g05710	181	11	11	CATMA0101099	C5	At4g09030	221	5	11
CATMA0101011	G1	At2g19990	482	1	15	CATMA0101101	B3	At4g11650	343	3	2
CATMA0101011	C7	At2g20530	184	7	11	CATMA0101103	B1	At4g13950	262	1	10
CATMA0101012	E2	At2g21160	151	14	13	CATMA0101107	H8	At4g31840	216	8	16
CATMA0101013	B1	At2g22450	203	1	2	CATMA0101109	B3	At3g27400	167	3	2
CATMA0101018	D7	At2g29960	173	19	4	CATMA0101110	H10	At4g38920	268	22	8
CATMA0101022	E4	At2g34585	257	16	5	CATMA0101111	C1	At4g39090	166	1	11
CATMA0101024	A1	At2g36670	228	13	9	CATMA0101120	F6	At1g09850	301	18	14
CATMA0101024	B5	At2g37130	398	17	10	CATMA0101126	G10	At1g16850	228	22	7
CATMA0101025	F7	At2g38540	152	7	6	CATMA0101135	G10	At1g28400	168	10	15
CATMA0101027	C12	At2g41290	198	12	11	CATMA0101137	A12	At1g31420	216	12	1
CATMA0101027	H7	At2g40880	169	7	16	CATMA0101142	D5	At1g44960	244	17	4
CATMA0101029	A10	At2g43570	275	10	8	CATMA0101143	D5	At1g48440	160	5	12
CATMA0101032	G11	At2g47470	400	23	15	CATMA0101143	C8	At1g48750	196	8	11
CATMA0101038	H11	At3g02885	188	23	8	CATMA0101150	E9	At1g59740	175	21	5
CATMA0101040	H11	At3g05200	186	23	16	CATMA0101150	F9	At1g59740	298	21	6
CATMA0101045	B7	At4g16500	195	7	2	CATMA0101155	B1	At1g65490	373	1	10
CATMA0101046	B1	At4g17050	157	13	2	CATMA0101160	F7	At1g71950	162	19	14
CATMA0101047	E3	At4g18280	178	3	13	CATMA0101160	E2	At1g71380	199	14	13
CATMA0101048	A8	At4g19810	168	20	9	CATMA0101162	F2	At1g73590	152	14	6
CATMA0101050	E5	At4g21960	331	17	5	CATMA0101162	C8	At1g74020	187	20	3
CATMA0101052	F12	At4g24780	308	24	14	CATMA0101164	C1	At1g75630	191	13	11
CATMA0101052	C5	At4g24190	180	5	11	CATMA0101167	A12	At1g79940	181	12	9
CATMA0101055	F7	At4g27520	279	7	14	CATMA0101175	G6	At5g06480	173	6	15
CATMA0101057	G1	At3g09820	202	1	7	CATMA0101176	D5	At5g07340	206	17	12
CATMA0101058	C9	At3g11520	300	21	3	CATMA0101184	A6	At5g17190	207	18	9
CATMA0101059	E10	At3g12700	400	10	13	CATMA0101185	H12	At5g18850	158	12	8
CATMA0101059	C4	At3g12120	300	4	11	CATMA0101187	D7	At5g20500	251	7	12
CATMA0101060	C9	At3g13520	199	21	11	CATMA0101187	E4	At5g20230	208	4	13
CATMA0101060	F9	At3g13540	187	21	14	CATMA0101196	H3	At5g38630	309	15	16
CATMA0101062	D6	At4g34960	200	18	4	CATMA0101200	D6	At5g43980	211	18	12
CATMA0101069	A4	At3g18280	199	4	1	CATMA0101204	C8	At5g48580	186	20	11
CATMA0101076	H9	At3g26950	249	21	16	CATMA0101209	F1	At5g53650	177	1	6
CATMA0101076	A10	At3g26950	205	22	9	CATMA0101213	F8	At5g58650	269	8	6
CATMA0101081	C1	At3g44280	168	1	3	CATMA0101216	D9	At5g62350	154	21	12
CATMA0101086	D8	At3g51730	233	20	4	CATMA0101219	A9	At5g65810	205	9	9
CATMA0101087	C9	At3g52850	221	9	11						

Die Konzentration der amplifizierten PCR Produkte wurde auf einem Agarose-Gel geprüft. Die resultierenden PCR Produkte wurden auf einen Filter gespottet wie in Colebatch *et al.* (2002) beschrieben. 10 µg gesamt RNA der Zeitpunkte 14 h, 26 h und 58 h wurden für die Herstellung der komplexen radioaktivenmarkierten Sonde verwendet. Das radioaktive Markieren der Sonde erfolgte durch das LabelStar Array Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach Prähybridisierung der Filter wurden sie für 24 h mit der radioaktiven Sonden inkubiert.

Die radioaktiven Signale wurden über Nacht im BioImager BAS CASSETTE 2325 (FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland) detektiert und am folgenden Tag gescannt. Die Detektion und Quantifikation der Signale erfolgte mit Hilfe der AIS Software (4.0 rev. 1.7; Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Kanada). Der lokale Hintergrund wurde in jede einem Spot pro Rast als Leerprobe gemessen.

## 2.3 Analytische und präparative Methoden

### 2.3.1 Protoplastenherstellung und –regeneration

Die Protoplastsherstellung einer *Arabidopsis* Zellkultur wurde nach einer modifizierten Methode nach Altmann *et al.* (1992) durchgeführt. Nachdem die Zellen zweimal mit JPL, 350 mM Mannitol gewaschen wurden, erfolgte die Resuspension in JPL, 350 mM Mannitol, 1% Cellulase Onozuka R-10 (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,5% Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande). Die Protoplastierung erfolgte während einer Inkubationszeit von 5-6 h bei RT. Zellen und Protoplasten wurden anschließend durch einen Nylonsieb gefiltert und getrennt. Die abgetrennten Protoplasten wurden in JPL, 200 mM Mannitol, 150 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen mit JPL, 200 mM Mannitol, 150 mM CaCl<sub>2</sub> und zweimaliges Waschen mit JPL 300 mM Mannitol, 50 mM CaCl<sub>2</sub>. Nach der Resuspension in JPL, 400 mM Saccharose, sollte die Konzentration nicht geringer als  $\sim 3 \cdot 10^5$  Protoplasten/ml ( $\sim 90$  vol.) sein. Die entstandenen Protoplasten wurden für 0 h, 3 h, 6 h, 14 h, 26 h, 42 h, 58 h in einer Petrischale bei RT regeneriert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet.

### 2.3.2 Zellwandisolierung

Frisches Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und in der Retch-Mühle (Retsch, Haan, Deutschland) zerkleinert (25 rpm, 1 min). Das Pflanzenmaterial wurde anschließend mit einem 1/1 (v/v) Methanol-Chloroform Gemisch extrahiert. Die Prozedur wurde so lange wiederholt, bis kein grünes Pigment mehr zu extrahieren war. Die verbleibende Zellwand wurde mit Aceton gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet.

### 2.3.3 Isolation der Pektine aus Zellwandmaterial

Zur Isolation der Pektine aus der Zellwand wurden 2 mg Zellwandmaterial (2.3.2) über Nacht mit 8,5 U Endopolygalakturonase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 4,5 U Pektin-Methylesterase (Novozyme, Kopenhagen, Dänemark) im 0,1 M Ammoniumformat-Puffer (pH 4,7) bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die Analyse der freigesetzten Pektine erfolgte durch die Bestimmung der Uronsäuren nach 2.3.7.

### 2.3.4 Monosaccharidanalyse durch GC-MS

Die Polysaccharide der Zellwand wurden durch Hydrolyse in ihre Monosaccharide gespalten. Die resultierenden Monosaccharide wurden anschließend zu Alditol-Acetaten derivatisiert und in einer Gaschromatographischen/Massenspektrometrischen Analyse getrennt und identifiziert (Albersheim *et al.*, 1967).

#### Trifluoressigsäure (TFA) Hydrolyse

Zellwandmaterial (2 mg) wurden in 2 M TFA (250 µl) für 1 h bei 121°C im Heizblock (Labtech-International, Burkhardtsdorf, Deutschland) hydrolysiert. Als interner Standard diente Inositol (1 mg/ml). 50 µl wurden dem Zellwandmaterial zugefügt und hydrolysiert. Zur

hydrolysierten Probe wurden 300 µl Isopropanol gegeben und bei 40°C evaporiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das Zellwandpellet wurde anschließend in 400 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen.

#### **Reduktion**

Die entstandenen Monosaccharide wurden in einer 1 M Ammoniumhydroxyd-Lösung (250 µl), die 10 mg/ml Natriumborhydrid enthielt, für 1 h bei RT inkubiert. Überflüssiges Reduktionsmittel wurde durch die Zugabe von konz. Essigsäure (20 µl) entfernt. Anschließend wurden der Probe 250 µl Essigsäure:Methanol (1/9, v/v) zugegeben und die Lösung bei 50°C evaporiert. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt.

#### **Acetylierung**

Essigsäureanhydrid und Pyridin (je 50 µl) wurden zur Probe gegeben und für 20 Min bei 121°C inkubiert. Nach der Zugabe von Toluol wurde das Lösungsmittel bei einer Temperatur von 50°C evaporiert und dreimal wiederholt. Die Probe wurde anschließend durch die Zugabe von je 500 µl H<sub>2</sub>O und Methylenchlorid gewaschen. Nach einer Phasentrennung wurde die organische Phase in ein Eppendorf-Gefäß überführt und das Lösungsmittel bei 50°C evaporiert. Das Pellet wurde in 100-400 µl Aceton gelöst.

#### **Detektion**

Die Auftrennung und Detektion der Alditol-Acetate erfolgt im Agilent 6890N Network GC System (Waldbronn, Deutschland) über eine Supelco 24110-U Säule. Das Temperaturprogramm bestand aus den folgenden Schritten: 2 Min 160°C, erhitzen auf 200°C mit einer Geschwindigkeit von 20°C/min. Die Temperatur wurde für 5 Min gehalten und anschließend auf 245°C mit einer Geschwindigkeit von 20°C/min gesteigert. Die Temperatur wurde für 12 Min gehalten. Die Auswertung und Quantifizierung der Peaks erfolgte durch die ChemStation Software (Agilent, Waldbronn, Deutschland).

### **2.3.5 Metaboliten-Profilung durch Gas-Chromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie (GC-MS)**

Die Extraktion und Trennung der Metaboliten wurde nach Wagner *et al.* (2003) durchgeführt. Ziel war es, polare und lipide Metabolite herauszulösen, in zwei Phasen aufzutrennen und für die GC-MS-Messung aufzubereiten.

#### **Extraktion:**

Ca 60 mg frisches Pflanzenmaterial wurden für die Extraktion verwendet. Durch die 15 min Inkubation bei 70°C in 300 µl 100% Methanol, das als polares Lösungsmittel diente, wurden Proteine und Enzyme inaktiviert, so dass nach der Zugabe Veränderungen der Metaboliten auch bei RT minimiert wurden. Die Zugabe von 200 µl Chloroform, das als ein lipophiles Lösungsmittel diente, erfolgte für 5 Min bei 37°C. Unpolare Stoffe wurden aus dem Pflanzenmaterial herausgelöst. Durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O wurde das Gemisch in polare und lipide Phase getrennt. Als Standards dienten: Nonadecansäuremethylester (60 µg) als lipophiler Standard, Ribitol (6 µg) als polarer Standard, d4-Alanin (30 µg) diente der Quantifizierung von Alanin in der Pflanze. Durch die Zugabe von D-(-)-Isoascorbat (15 µg) konnte das Maß des Sauerstoffeinfluss jeder Probe ermittelt werden, da es leicht oxidiert. Nichtlösliches Pflanzenmaterial wurde durch die anschließende 5 min Zentrifugation abgetrennt. Aus der polaren Phase wurden je 160 µl Aliquots abgenommen und in der Speed Vac (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) über Nacht getrocknet.

#### **Derivatisierung:**

Durch die Zugabe von 40 µl O-Methylhydroxylaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin) entstanden aus Carbonyl-, Carboxyl- und Ketogruppen Methyloximen bei einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 30°C. Zur Silylierung wurden 70 µl N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid (MSTFA) verwendet. 10 µl Alkanmix dienten als Zeitstandard. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur von 37°C für 30 Min.

80 µl jeder Probe wurden zur Messung in der GC verwendet. Die GC-MS Analyse erfolgte in GC 8000/Voyager Massenspektrometer (ThermoQuest, Manchester, England). Die Auswertung und Quantifizierung der Peaks erfolgte durch die MassLab FindTarget Software. Standards und Chemikalien wurden bei Campro Scientific (Emmerich, Deutschland) bezogen.

### **2.3.6 Bestimmung des kristallinen Zellulosegehalts**

Die Bestimmung des kristallinen Zellulosegehalts erfolgte nach Updegraff (1969). 2-5 mg Zellwand (2.3.2) wurden in einer wässrigen Lösung, die 73% (v/v) Essigsäure, 9% (v/v) Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) enthielt, für 30 Min bei einer Temperatur von 100°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Pellet, das die kristalline Zellulose enthielt, mit H<sub>2</sub>O und fünfmal mit Aceton gewaschen. Das Pellet wurde dann mit 72 % (v/v) Schwefelsäure für 30 Min bei RT, für 15 Min im Ultraschall und wieder bei RT inkubiert. Der Gehalt an freigesetzter Glukose wurde durch den Anthron-Assay (Dische, 1962) anhand eines Glukosestandards bestimmt. Zu je 50µl Probe wurde 1 ml Anthron-Lösung (0,2% Anthron in konz. Schwefelsäure) gegeben. Die Absorption der freigesetzten Glukose wurde nach 5 min kochen im Wasserbad bei einer Wellenlänge von 640 nm im Max Plus ELISA Reader (Molecular Devices, München, Deutschland) gemessen.

### **2.3.7 Bestimmung des Gehalts an Uronsäure**

Der Gehalt an Uronsäure wurde durch eine modifizierte Methode von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) bestimmt. Als Ausgangsmaterial wurden 100 µl des Überstandes der hydrolysierten Zellwand aus der TFA-Hydrolyse (2.3.4) verwendet. Diese wurden mit 600 µl konzentrierter Schwefelsäure und 125 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> für 5 Min im Wasserbad gekocht. Danach wurden die Proben für 5 Min abgekühlt und anschließend 20 µl Biphenyl Lösung (0,15% m-Hydroxy-Biphenyl in 0,5% NaOH) zugegeben. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm im ELISA Reader gemessen und die Konzentration mit Hilfe eines Galakturonsäure Standards bestimmt.

### **2.3.8 Bestimmung des Chlorophyllgehalts in Arabidopsisblättern**

Die spektralphotometrische Bestimmung erlaubt die Ermittlung der Gehalte von Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b) (Lichtenthaler und Wellburn, 1983). 10 mg frisches Pflanzenmaterial wurden in 250 µl EtOH (80%) für 20 Min bei 80°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand (S1) abgenommen und auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in 150 µl EtOH (80%) gelöst und für 20 Min bei 80°C inkubiert. Erneut wurde nach einer Zentrifugation der Überstand (S2) abgenommen und auf Eis gestellt. Das Pellet in 250 µl EtOH (50%) gelöst und für 20 Min bei 80°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation der Überstand (S3) abgenommen und auf Eis gestellt. Die Überstände S1+S2+S3 wurden vereint. Das Pellet wurde zur Bestimmung von Stärke verwendet.

Die Chlorophyllbestimmung erfolgt in Duplikaten zu je 50 µl Extrakt und 120 µl 98% EtOH. Die Absorption wurde bei den Wellenlänge 645 nm und 665 nm im ELISA Reader gemessen.

### **2.3.9 Bestimmung des Stärkegehalts in Pflanzengewebe**

Die Stärkebestimmung erfolgte enzymatisch durch die Bestimmung der durch die Spaltung von Amyloglukosidase freigesetzten Glukose (Hendriks *et al.*, 2003). Dafür wurde das Pellet, das nach der Extraktion des Chlorophylls (2.3.8) entstanden war, in 80 µl HCl, 0,5 M Acetat, 0,1 M NaOH (pH 4,9) suspendiert. 40 µl wurden für 10-16 h bei 37°C mit 60 µl des Stärke-

Abbauenden-Mixes (500  $\mu$ l Amyloglukosidase (Roche, Mannheim, Deutschland), 5  $\mu$ l  $\alpha$ -Amylase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in 25 ml 50 mM Acetat/NaOH, pH4,9) inkubiert.

Die dadurch freigesetzte Glukose wurde durch Hexokinase und ATP zu Glukose-6-Phoshat. Unter Mitwirkung von NADP<sup>+</sup> und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, wurde Glukose-6-Phoshat zu Glukonat-6-Phoshat oxidiert (10-50  $\mu$ l Probe und 160  $\mu$ l Glukose-Mix (0,1M HEPES/KOH, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7,0; 480  $\mu$ l ATP, 480  $\mu$ l NADP<sup>+</sup>, 80  $\mu$ l G6PDH, 1  $\mu$ l Hexokinase). Dabei entstand eine stöchiometrische Menge NADPH, dessen Absorption bei einer Wellenlänge 340nm im ELISA Reader gemessen wurde.

### 2.3.10 UDP-Glucose Bestimmung

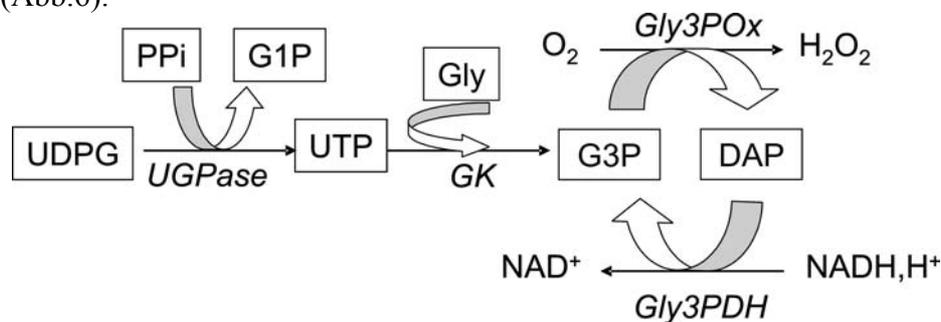
Zur Vorbereitung der UDP-Glucose-Messung, wurden die Proben durch eine modifizierte Methode nach Jelitto *et al.* (1992) extrahiert.

#### TCA-Extraktion

200 mg frisches Pflanzenmaterial wurden flüssigem Stickstoff gefroren und in der Retch-Mühle zerkleinert. Es wurde in 600  $\mu$ l 16% Trichloressigsäure (TCA) in Diethylether suspendiert und bei 4°C für 20 Min inkubiert. Danach wurden 800  $\mu$ l 16% TCA in H<sub>2</sub>O (mit 5 mM EGTA) zugegeben und für 3 h auf Trockeneis inkubiert. Es erfolgte die Abtrennung von Proteinen und Stärke. Der wässrigen Phase wurde 1 ml wassergesättigter Diethylether zugefügt und insgesamt dreimal gewaschen. Danach wurde der pH mit 5 M KOH, 1 M Triethanolamin auf den Wert 6-7 eingestellt. Der Diethylether wurde anschließend abgedampft.

#### UDP-Glucose Messung

Zur Bestimmung der UDP-Glucose wurde ein Cycling-Assay nach Gibon *et al.* (2002) verwendet. Dabei wurde die Absorption des entstandenen NAD<sup>+</sup> im Synergy Microplatten Reader (Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen (Abb.6).



**Abb. 6 Cycling-Reaktion:** UDP-Glucose (UPDG) und PPI wurde durch das Enzym UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGPase) zu UTP und Glukose-1-Phosphat (G1P) umgesetzt. Glukosekinase katalysierte die nachfolgende Reaktion von UTP und Glycerol zu Glycerol-3-Phosphat (G3P). Die Basis des Cycling-Assays war die enzymatische Reaktion zwischen Glycerol-3-Phosphate Oxidase (Gly3POx) und Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (Gly3PDH). Gly3POx katalysierte die O<sub>2</sub>-abhängige Umwandlung von Gly3P zu Dihydroxyaceton-Phosphat (DAP). Gleichzeitig oxidierte Gly3PDH NADH zu NAD<sup>+</sup>.

Der Assay wurde in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Konzentration des Extraktes sollte einem Standard von bis zu 5  $\mu$ M entsprechen (als Standard wurden 0,5-5  $\mu$ M UDP-Glucose verwendet). Folgende Enzyme und Puffer wurden verwendet: 42  $\mu$ l Tricin/KOH (gelöst in 200 mM (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ l Glycerokinase 50 U/ml (gelöst in 200 mM Tricin/KOH (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 3  $\mu$ l Glycerol-3-Phosphat Oxidase 500 U/ml (gelöst in 200 mM (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ l Glycerol-3- Phosphat Dehydrogenase 200 U/ml, (gelöst in 200 mM (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ l Katalase 130.000 U/ml (gelöst in 200 mM (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ l NADH 66 mM, 2  $\mu$ l Glycerol 250 mM, H<sub>2</sub>O (Endvolumen: 100 $\mu$ l). Die Absorption wurde bei 340 nm gemessen (ca. 20Min), bis der Wert konstant war

( $V_1$ ). Dieser entsprach dem Leerwert. 2  $\mu$ l UGPase 50 U/ml (gelöst in 200 mM (pH 7,8), 10 mM  $MgCl_2$ ) wurden zugegeben und die Absorption wurde bei 340 nm gemessen (ca. 20 Min), bis der Wert konstant war ( $V_2$ ). Anhand der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_2 - V_1$ ) wurden mit Hilfe der Standardkurve die Konzentrationen an UDPG bestimmt.

### 2.3.11 Lipidanalyse durch Dünnschicht Chromatographie (DC)

Die Lipide aus pflanzlichem Gewebe wurden nach einer Methode nach Dörmann *et al.* (1995) extrahiert.

Ca. 2 frische Blätter wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Durch die Zugabe von 100  $\mu$ l Methanol/Chloroform/Ameisensäure (1/1/0,1 [v/v/v]) und 50  $\mu$ l 1 M KCl, 0,2 M  $H_3PO_4$  wurden die wässrige und Lipidphase getrennt. Die Extrakte wurde auf einer mit Ammoniumsulfat imprägnierten Silicagel-Dünnschicht Chromatographie Platte (Si 250 PA; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton/Toluol/Wasser (91/30/8 [v/v/v]) getrennt. Die Platten wurden mit Jod angefärbt und visuell analysiert.

### 2.3.12 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF MS Analyse wurde zur Untersuchung der Xyloglukane der Zellwand verwendet. Die Zellwand wurde mit einer spezifischen Xyloglukanase verdaut und die freigesetzten Oligosaccharide wurden im MALDI-TOF MS untersucht (Lerouxel *et al.*, 2002). Zur Analyse der Xyloglukane wurde Zellwand (2.3.1) (aus ca. 40 mg Frischgewicht) in 25 mM Ammoniumformat-Puffer resuspendiert. Die Zellwand wurde anschließend in 0,2 U Xyloglukan-spezifischer Endoglukanase (XEG) (Novozymes AS, Kopenhagen, Dänemark) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und aus einem Aliquot von 5  $\mu$ l dem Kationentauscher Bio-Rex MSZ 501(D) Resin (BioRad, München, Deutschland) zugegeben. 1  $\mu$ l 2,5-Dihydroxybenzoesäure Matrix (Gentisic acid, DHB; 10mg/ml in  $H_2O$  gelöst) (Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde auf eine MALDI-Platte gespottet und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde 1  $\mu$ l Probe auf die getrocknete Matrix getropft und ebenfalls getrocknet. Die Analyse der Xyloglukane erfolgt im Voyager DE-Pro MALDI TOF (Applied Biosystems, Langen, Deutschland).

### 2.3.13 Zuckerbestimmung durch Dionex

Die Extraktion der Zucker aus Pflanzengeweben erfolgte nach einer Methode nach Zuther *et al.* (2004). 50-100mg frisches Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in der Retch-Mühle (Retsch, Haan, Deutschland) zerkleinert. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde zweimal mit 1 ml 80% EtOH bei 80°C für 30 Min extrahiert. Nach 5 min Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und 2 ml 80%EtOH zugegeben. Die Proben wurden über Nacht in der Speed-Vac (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Anschließend wurden sie in 1 ml  $H_2O$  aufgenommen und entionisiert (AG 501-X8 Resin, Bio-Rad, München, Deutschland) und Glukose, Fruktose, Saccharose, und Raffinose wurden durch Ionenchromatographie (High-performance anion exchange chromatography (HPAEC)) über die Säule CarboPac PA-100 getrennt. Für die Auftrennung wurde das Dionex DX-500 Gradienten-Chromatographie-System (Dionex GmbH, Idstein Deutschland), das mit einem aperometrischen Detektor verbunden war, verwendet. Für die Galaktiolbestimmung wurde eine MA1 Säule im gleichen System verwendet.

## 2.4 Mikroskopie und Histologie

### 2.4.1 Lokalisationsbestimmung durch das Green Fluorescence Protein (GFP)

Zur Lokalisationsbestimmung durch Green Fluorescent Protein (GFP) wurden die Kandidatengene durch PCR Amplifikation isoliert und durch die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pA7-GFP, der das GFP Gen trägt, kloniert. Die Plasmid-DNA wurde in *E.coli* TOP 10 Zellen transformiert. 2,5 µg Plasmid-DNA wurden an 3 mg Gold-Microcarrier (1.0 Micron Gold, BIO-RAD, München, Deutschland) gebunden. 4 Wochen alte *Arabidopsis* Blätter des Ökotyps C24 wurden zur Bombardierung mit dem PDS-100/He System (BIO-RAD, München, Deutschland) mit einem Druck von 1.100 psi verwendet. Die Ausführung erfolgt nach Herstellerprotokoll. Nach der Bombardierung wurden die *Arabidopsis* Blätter für 36 h bei RT inkubiert. Die Analyse der Blätter erfolgt mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DM IRB Mikroskop, LeicaSP11 Laserscanning Einheit; Solms, Deutschland) unter Verwendung des Filters YFP (Erregerfilter: 500/20 nm, Sperrfilter: 535/30 nm).

### 2.4.2 Gewebedünnschnitte von *Arabidopsis*-Wurzeln und Antikörpermarkierung der Zellwandzucker

Zur Analyse der Zellwandzucker wurden aus 8 Tage alten *Arabidopsis*-Wurzel-Dünnschnitte nach einer modifizierten Methode nach Baskin *et al.* (1992a) angefertigt.

#### **Fixierung:**

Die Wurzeln wurden in 4% Paraformaldehyd, 50 mM Pipes, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> für 2 h bei RT fixiert. Anschließend wurden sie dreimal in 50 mM Pipes, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> für je 10 Min gewaschen. Um den Wurzeln eine definierte Orientierung zu geben, wurden diese mit einem kleinen Tropfen 2% Low-gelling Temperatur Agarose überzogen und in 10% EtOH überführt.

#### **Dehydrierung:**

Die Dehydrierung erfolgt in einer Serie aus EtOH-Schritten: 25% EtOH, 30 Min; 4°C; 50% EtOH, 30 Min, -20°C; 75% EtOH, 30 Min, -20°C; 95% EtOH, 30 Min, -20°C; 100% EtOH über Nacht, -20°C.

Um die Wurzeln im Präparat sichtbar zu machen, wurde eine geringe Menge Fast Green (in 100% EtOH gelöst) zugegeben.

#### **Infiltration:**

Die Infiltration mit LR White (Plano GMBH, Wetzlar, Deutschland) erfolgte durch die Inkubation mit: 25% LR White, 30 Min; 4°C; 50% LR White, 30 Min; 4°C; 75% LR White, 30 Min; 4°C; 100% LR White über Nacht, 4°C.

#### **Einbetten der Proben:**

Die Proben wurden in 100% LR White in Gelatine-Kapseln (0,37ml Vol., 6,0 mm Durchmesser; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) überführt und für 24 h bei einer Temperatur von 60°C gehärtet.

#### **Dünnschnitte:**

Dünnschnitte der Stärke 1 µm wurden mit einem Glasmesser in einem Reichert-Jung Ultracut E Microtom (Leica, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Die Gewebedünnschnitte wurden auf Objektträgern, (Diagnostic Microscope Slide, 8 Well, 6mm; Erie Scientific Company, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland), die einen hydrophoben Überzug besaßen, fixiert. Zur besseren Haftung der Dünnschnitte, wurden die Objektträger in einem Gemisch aus Aceton/Vectabond (1/50) (v/v) (Linaris, Wertheim, Deutschland) vorbehandelt.

**Primäre Antikörpermarkierung:**

Zur Analyse der Zellwand wurden verschiedene Antikörper verwendet. Alle Antikörper wurden (1/5) (v/v) in PBS-Puffer (pH7,4) und der 3% (v/v) Blotting-Grade Blocker, nonfat dry milk (BioRad, München, Deutschland), verdünnt.

**Sekundäre Antikörpermarkierung:**

Als sekundäre Antikörper, wurden Anti-MouseIgG und Anti-RatIgG verwendet. Beide sekundären Antikörper wurden (1/100) (v/v) in PBS-Puffer (pH7,4), der 3% (v/v) Blotting-Grade Blocker, nonfat dry milk, (BioRad, München, Deutschland) verdünnt.

**Mikroskopische Analyse:**

Die Analyse der markierten Dünnschnitte erfolgte mit dem BX41 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), das mit einer digitalen SPOT 2.2.1 Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) verbunden war.

### 2.4.3 Expressionsanalyse durch Promotor-GUS Fusion

Die Expressionsanalyse durch Promotor-GUS-Fusion erfolgt durch die Transformation von *A.thaliana* Pflanzen mit dem Vektor pBI101.1. Durch die entsprechenden Schnittstellen war in diesen die Promotorregion des zu untersuchenden Gens kloniert worden. pBI101.1 trägt das Glukuronidasegen. Die Glukuronidase Aktivität wurde nach einer Methode, die in Jefferson *et al.* (1992) beschrieben wurde nachgewiesen. Dabei wurden verschiedene Pflanzengewebe in 10 ml Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7,2), 10 mM EDTA, 0,1% TritonX 100, 5 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Glucuronsäure-Cyclohexylammoniumsalz (X-Gluk), 50 µl Dimethylformamid (DMFA) für 48 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Glukuronidase setzt X-Gluk zu einem blauen Farbstoff um. Die Reaktion wurde gestoppt und das Chlorophyll aus dem pflanzlichen Gewebe mit 70% EtOH gewaschen. Der Waschschrift wurde mit einer 95%igen EtOH Lösung wiederholt.

### 2.4.4 Ermittlung von Schäden der Plasmamembranen und toter Zellen durch Fluoreszindiaceat (FDA)

Durch (FDA) lassen Schäden der Plasmamembranen und tote Zellen nachweisen. FDA kann in die Zelle eindringen und wird dort zu freiem Fluoreszin und Fluoreszinacetat hydrolysiert. Das in der Zelle befindliche Fluoreszin kann nicht mehr über die Membran aus der Zelle gelangen. Ist die Zelle intakt, so bleibt das Fluoreszin in der Zelle. Intakte Zelle können anhand der Fluoreszenz nachgewiesen werden, wohingegen beschädigte oder tote Zelle keine Fluoreszenz aufweisen.

FDA (50mg/ml) wurden in Aceton gelöst. Wurzeln wurden in einer 1:1000 (v/v) Verdünnung in 1x PBS-Buffer 30 Min bei RT inkubiert und anschließend dreimal in 1x PBS-Puffer gewaschen. Die Analyse erfolgte mit dem BX41 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland), das mit einer digitalen SPOT 2.2.1 Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) verbunden war.

## 2.5 Bioinformatik

### 2.5.1 Analyse von Proteinen, ihrer Funktion und ihrer N-terminaler Peptidsequenzen

Die Analyse der N-terminalen Signalpeptide wurde mit Hilfe der Programme iPSORT, SignalP3.0 and TargetP1.1 durchgeführt. Für weitere Analysen wurden ProtFun2.2 and CAZY verwendet. Als Datenbanken wurden EMBL-EBI, NCBI und TAIR verwendet.

iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>) ist ein Programm, das die N-terminalen Peptidsequenzen gegebener Proteinsequenzen in Signalpeptide der sekretorischen, chloroplastidären und mitochondrialen Lokalisation einteilt (Bannai *et al.*, 2002).

Das Programm SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) berechnet über Ähnlichkeitswerte N-terminaler Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Signalsequenz, und deren Abspaltstelle und die Kombination aus beiden (Emanuelsson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997, Bendtsen *et al.*, 2004). Für jeden Organismus der Eukaryonten, Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wurden zwei verschiedene neutrale Netzwerke verwendet. Eines, das das aktuelle Signalpeptid bestimmt und eines, das die Schnittstelle der Signalpeptidase I (SPase I) festlegt.

Mit TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) lässt sich die Lokalisation eukaryontischer Proteine bestimmen. Sie lassen sich in Signalpeptide der sekretorischen, chloroplastidären und mitochondrialen Lokalisation einteilen (Emanuelsson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997).

ProtFun2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) ordnet der gegebenen Proteinsequenzen eine Funktion zu. Das Programm durchsucht dabei eine große Anzahl an Datenbanken, der Proteinzuzuordnung, um möglichst viele Informationen der post-translationalen Modifikation und Lokalisation zu erhalten, um dem zu untersuchenden Protein folgende Funktionen zuzuordnen zu können: Rolle des Proteins auf zellulärer Ebene, Enzymklasse und Genontologie (Jensen *et al.*, 2002).

Die CAZY (Carbohydrate Active enZymes) Datenbank (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) beschreibt Enzymfamilien, die strukturähnliche und Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme beinhaltet, die glykosidische Bindungen modifizieren, abbauen oder aufbauen (Coutinho *et al.*, 1999, a,b).

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ist öffentlich zugängliche Datenbank, die als molekularbiologische Informationsquelle zur Analyse von Protein- und Nukleotidsequenzen genutzt wurde.

TAIR (The Arabidopsis Information Resource) <http://www.arabidopsis.org/home.html> ist eine umfangreiche Datenbank, die als *Arabidopsis thaliana* Informationsquelle diente und zur Analyse von Proteinen und ihrer Funktionen genutzt wurde.

Die Datenbank der EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/>) diente der Analyse von Protein- und Nukleotidsequenzen.

## 3. Ergebnisse

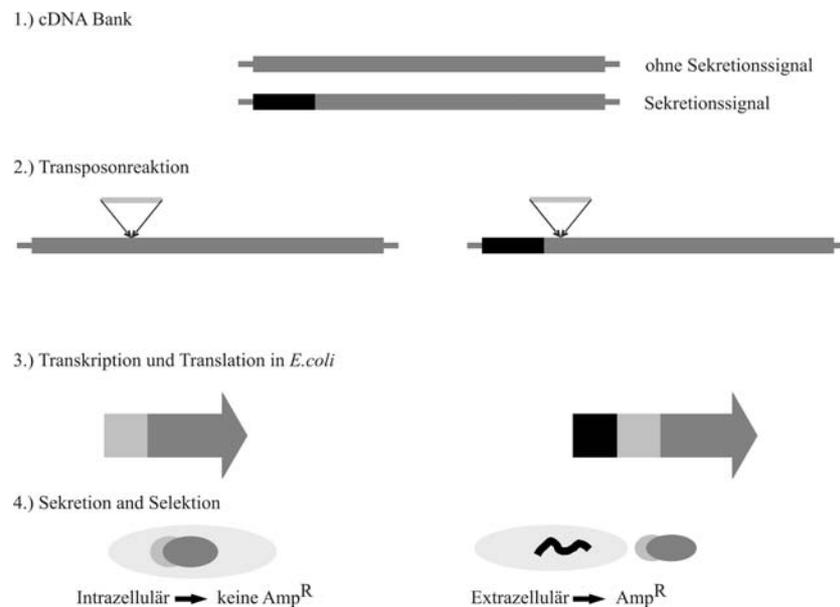
### 3.1 Transposon assisted signal tapping (TAST)

#### 3.1.1 Transposon Tagging einer cDNA Bank aus regenerierten Protoplasten und bioinformatische Analyse der N-terminalen Signalsequenzen

Um eine Identifikation möglicher Kandidatengene, die in den Apoplasten sekretiert werden und am Aufbau der Zellwand beteiligt sind, zu ermöglichen, wurde die TAST-Methode verwendet (siehe Einleitung 1.5). Als Modellsystem dienten Protoplasten einer *Arabidopsis* Zellsuspension, die zur Simulation der Zellwandneubildung gewählt wurden. Zellkulturen als Ausgangsmaterial bieten im Vergleich zu anderen pflanzlichen Geweben den Vorteil der Homogenität. Sie können unter definierten Bedingungen wachsen und bilden große Mengen Biomasse. Durch die Protoplastierung dieser Zellen und die nachfolgende synchronisierte Regeneration bis zum vollständigen Wiederaufbau der Zellwand, können essentielle Vorgänge der Zellwandsynthese analysiert werden.

Nach erfolgter Protoplastierung der Zellen einer *Arabidopsis* Zellsuspension, wurden diese nach einer Regenerationszeit von 0 h, 3 h, 6 h, 14 h, 26 h, 42 h und 58 h geerntet und zur RNA Isolation verwendet. Aus der Gesamt-RNA jedes Erntezeitpunktes (~81-180 µg) wurden je 40 µg zur polyA+ mRNA Aufreinigung verwendet. Diese wurden vereinigt und zur Herstellung einer cDNA-Bank verwendet. Nach der Transformation der cDNA Bank in *E.coli* und Aufreinigung der DNA, wurde die Plasmid-DNA für die Transposon-Tagging-Reaktion verwendet. Das Transposon SigA2 trägt neben einer Chloramphenicol-Resistenz das Gen der  $\beta$ -Lactamase, ohne Signalsequenz. Springt das Transposon in ein Gen mit einer Signalsequenz, die von *E.coli* erkannt wird, so kann die  $\beta$ -Lactamase als Fusionsprotein sekretiert werden. Das Enzym kann nun den  $\beta$ -Lactam Ring des Ampicillins spalten, die

*E.coli* Wirtszelle ist somit Ampicillin resistent. Positive getaggte Klone konnten durch Dreifachselektion auf Kanamycin (Kontrolle für erfolgreiche Transformation des Vektors), Chloramphenicol (Kontrolle für erfolgreiches Transposon-Tagging des Vectors) und Ampicillin (Fusion des Transposons mit einem Gen, welches für ein sekretiertes Protein kodiert) isoliert werden (Abb.7).



**Abb. 7 Transposon Reaktion:** 1.) Die cDNA Bank besteht aus Genen die über (k)ein Sekretionssignal verfügen. 2.) Das Transposon springt willkürlich in die Gene der cDNA Bank. 3.) Die Transkription und Translation der getaggtten Gene erfolgt nach Transformation in *E.coli*. 4.) Die Selektion der positiven getaggtten Transformanten erfolgt durch die Selektion auf Ampicillin-haltigem Wachstumsmedium. Amp<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenz.

Insgesamt wuchsen auf den Platten der Dreifachselektion bei einer Ampicillin-Konzentration von 15 µg/ml 623 Kolonien. Nach erfolgtem Überimpfen dieser Kolonien auf Platten der Dreifachselektion mit erhöhter Ampicillin-Konzentration (100 µg/ml) wurden insgesamt 604 Kolonien selektiert. Von diesen Kolonien wurden 600 zur DNA-Aufreinigung verwendet. Die Sequenzierung der 600 getaggtten Plasmide erfolgte mit den Primern SeqA und SeqB. Vektorsequenzen und Sequenzen schlechter Sequenzläufe wurden durch phredPhrap entfernt. Es ergaben sich insgesamt 526 Sequenzen, die zu 154 unabhängigen Contigs zusammengefasst werden konnten (Tab.2, Anhang Tab. I, II, III, IV). Die Transposon-Insertionen in den einzelnen Genen erfolgte zufällig. Als Beispiel wurde das Gen At1g55210 gewählt, dass durch 8 Transposons getaggt wurde. Deutlich ist in Abb.8 die zufällige Verteilung der Transposons in diesem Gen sichtbar. Die Insertionstendenz der Transposons konzentriert sich eher auf den C-Terminus des Gens.



**Abb. 8 Transposonverteilung und Insertionsstellen am Beispiel des Gens At1g55210.** Alle Transposon-Insertionsstellen wurden durch die entsprechenden Positionen im Gen angegeben.

Die N-terminalen Sequenzen der Peptide bestimmen ihre Lokalisation in der Zelle. Signalpeptide können die synthetisierten Proteine zu den Mitochondrien, Chloroplasten und in den Apoplast steuern. Zur Untersuchung der N-terminalen Peptidsequenzen der 154 Contigs wurden durch die Programme TargetP1.1, SignalP3.0 und iPSORT verwendet. Um eine möglichst genaue Analyse und ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten wurden drei Programme verwendet. Jedes Programm wurde durch einen eigenen Datensatz zur Analyse N-terminaler Signalsequenzen getrimmt. Es können also Abweichungen in den Ergebnissen dieser Programme möglich sein. Mit TargetP1.1 lässt sich die Lokalisation eukaryontischer Proteine bestimmen. Die N-terminalen Sequenzen lassen sich in Signalpeptide der sekretorischen, chloroplastidären und mitochondrialen Lokalisation einteilen. Proteine ohne Signalsequenz bleiben im Cytosol. In TargetP1.1 wird die Lokalisation (Lok.) der Signalsequenz und ihrer Wahrscheinlichkeiten angegeben. Die Zuordnung der Signalpeptide erfolgt in bestimmten Lokalisationskategorien. Die Zuordnungen wurden in 5 Zuverlässigkeitsklassen (RC = Reliability Class) eingeteilt, wobei 1 die höchste und 5 die niedrigste darstellte. Das Programm SignalP3.0 berechnet über Ähnlichkeitswerte N-terminaler Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Signalsequenz und deren Abspaltstelle. Für Organismen der Eukaryonten, Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wurden zwei verschiedene neutrale Netzwerke verwendet. Eines, das das aktuelle Signalpeptid bestimmt und eines, das die Schnittstelle der Signalpeptidase I (SPase I) festlegt. Die Zuordnung in SignalP3.0 wurde als durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (S-score = signal peptide score) angegeben. iPSORT ist ein Programm, das die N-terminalen Peptidsequenzen gegebener Proteinsequenzen in Signalpeptide der sekretorischen, chloroplastidären und mitochondrialen Lokalisation einteilt. Die Zuordnung in iPSORT wurde durch die jeweiligen Lokalisierungen angegeben.

Die Einteilung der N-terminalen Peptidsequenzen der 154 Contigs erfolgte in die Klassen der sekretorischen Signalpeptide (Tab.2), chloroplastidären (Anhang Tab.I), mitochondrialen

(Anhang Tab.II) Signalpeptide oder Peptide ohne Signalsequenz (Anhang Tab.III). Bei einigen Kandidatengenomen erfolgt die Zuordnung der N-terminalen Sequenzen in den einzelnen Programmen nicht stimmig zu den anderen Programmen. Diese wurden als nicht eindeutig in ihrer Zuordnung angegeben (Anhang Tab.IV). Da jedes Programm durch ein eigenständiges Datenset trainiert wurde, kann es zu Unterschieden in der Lokalisationsvorhersage der einzelnen Programme kommen. Die Zuordnungen, die von SignalP3.0 und TargetP1.1 getroffen wurden, stimmten in fast allen Fällen überein. iPSORT wich in manchen Fällen von diesen beiden Programmen ab. In anderen Fällen stimmten die Vorhersagen der drei Programme gar nicht überein, wie im Falle des Gens At1g48530, das durch iPSORT den chloroplastidären, durch TargetP1.1 den mitochondrialen und durch SignalP3.0 den sekretorischen Signalpeptiden zugeordnet wurde. Nur 20 Gene der 154 konnten aufgrund der abweichenden Vorhersagen der einzelnen Programme nicht zugeordnet werden. Je höher die angegeben Wahrscheinlichkeit der Zuordnung ist, desto höher ist auch die Zuverlässigkeitsklasse. Alle untersuchten Gene, deren Wahrscheinlichkeitswerte einen Wert von 85% überschreiten, wurden den Klassen 1 und 2 zugeordnet, die die Klassen der höchsten Zuverlässigkeit darstellen. Eine Ausnahme stellte das Gen At5g18850 dar. Hier lag die von TargetP1.1 ermittelte Zuverlässigkeitsklasse bei 5 (also sehr niedrig), während der durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides von SignalP3.0 bei 86,2% lag. Erklären lässt sich diese Abweichung beiden Programme voneinander, durch die Angabe in SignalP3.0 eines Signalankers, der von TargetP1.1 nicht bestimmt wird.

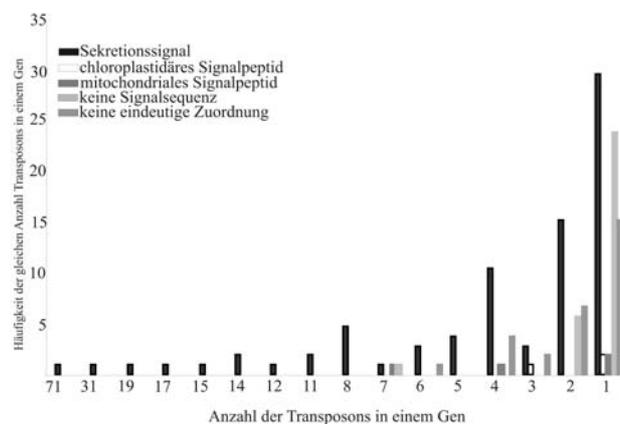
**Tab. 2 Sekretorische N-terminale Signalsequenzen der getaggtten cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der getaggtten Peptide wurden durch SignalP3.0 und TargetP1.1 den sekretorischen Proteinen zugeordnet (meist auch mit iPSORT übereinstimmend). (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score)

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 ØS	Lok.	Anzahl der Transposon-Insertionen
ERSEQN:ZY132850	At1g07960	unknown protein	S	0,006	0,021	0,994	0,051	S	1	0,956	S	4
ERSEQN:ZY133620	At1g09850	papain-like cysteine peptidase XBCP3	S	0,007	0,006	0,985	0,065	S	1	0,914	S	1
ERSEQN:ZY132837	At1g16850	unknown protein	S	0,006	0,015	0,989	0,061	S	1	0,750	S	4
ERSEQN:ZY133631	At1g25275	expressed protein	S	0,011	0,026	0,994	0,015	S	1	0,906	S	4
ERSEQN:ZY133507	At1g28400	unknown protein	S	0,006	0,185	0,947	0,007	S	2	0,882	S	1
ERSEQN:ZY132910	At1g31420	unknown protein	S	0,034	0,024	0,948	0,040	S	1	0,861	S	3
ERSEQN:ZY133639	At1g33590	unknown protein	S	0,017	0,017	0,963	0,047	S	1	0,941	S	1
ERSEQN:ZY133616	At1g44960	unknown protein	S	0,006	0,130	0,465	0,248	S	4	0,824	S	1
ERSEQN:ZY132890	At1g48140	unknown protein	S	0,002	0,060	0,985	0,058	S	1	0,946	S	1
ERSEQN:ZY132874	At1g48440	unknown protein	S	0,004	0,027	0,991	0,177	S	1	0,922	S	1
ERSEQN:ZY132891	At1g48750	putative lipid transfer protein (F1114_8)	S	0,039	0,015	0,951	0,007	S	1	0,968	S	1
ERSEQN:ZY132896	At1g51760	unknown protein	S	0,059	0,025	0,942	0,016	S	1	0,900	S	1
ERSEQN:ZY132863	At1g55210	unknown protein	S	0,012	0,961	0,038	0,012	S	1	0,964	S	11

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 OS	Lok.	Anzahl der Transposon-Insertionen
ERSEQN:ZY132849	At1g55330	arabinogalactan-protein AGP21	S	0,006	0,025	0,995	0,069	S	1	0,925	S	4
ERSEQN:ZY132925	At1g56340	unknown protein	S	0,006	0,011	0,997	0,054	S	1	0,935	S	1
ERSEQN:ZY132821	At1g65490	unknown protein	S	0,023	0,016	0,917	0,019	S	1	0,790	S	2
ERSEQN:ZY132888	At1g71950	unknown protein	S	0,003	0,086	0,983	0,041	S	1	0,849	S	1
ERSEQN:ZY133626	At1g74020	putative strictosidine synthase	S	0,070	0,010	0,985	0,031	S	1	0,951	S	1
ERSEQN:ZY132866	At1g75630	vacuolar ATP synthase, putative	S	0,033	0,033	0,839	0,218	S	2	0,426	S	15
ERSEQN:ZY133615	At1g79940	putative DnaJ protein	S	0,009	0,013	0,696	0,377	S	4	0,625	S	1
ERSEQN:ZY132869	At2g02100	protease inhibitor II	S	0,025	0,013	0,985	0,011	S	1	0,861	S	17
ERSEQN:ZY133479	At2g02120	protease inhibitor II	S	0,012	0,035	0,992	0,008	S	1	0,981	S	1
ERSEQN:ZY132814	At2g19990	pathogenesis-related protein (PR-1)	S	0,026	0,029	0,893	0,163	S	2	0,766	S	2
ERSEQN:ZY132832	At2g21160	Translocon-associated protein, alpha subunit precursor TRAP complex/Signal sequence receptor alpha subunit (SSR-alpha)	S	0,004	0,270	0,929	0,011	S	2	0,934	S	2
ERSEQN:ZY132893	At2g22470	arabinogalactan-protein AGP2	S	0,164	0,018	0,672	0,010	S	3	0,920	S	2
ERSEQN:ZY133628	At2g29960	cyclophilin (ROC11)	S	0,009	0,046	0,981	0,126	S	1	0,888	S	2
ERSEQN:ZY132922	At2g32580	unknown protein	S	0,009	0,115	0,955	0,018	S	1	0,906	S	2
ERSEQN:ZY133643	At2g34585	expressed protein	S	0,087	0,017	0,964	0,076	S	1	0,804	S	1
ERSEQN:ZY132900	At2g36670	putative protease	S	0,010	0,352	0,893	0,004	S	3	0,973	S	4
ERSEQN:ZY132906	At2g37130	putative peroxidase ATP2a	S	0,002	0,032	0,986	0,051	S	1	0,876	S	1
ERSEQN:ZY132862	At2g37195	expressed protein	S	0,002	0,136	0,944	0,077	S	1	0,834	S.a.	8
ERSEQN:ZY132847	At2g38530	putative nonspecific lipid-transfer protein	S	0,005	0,019	0,967	0,039	S	1	0,998	S	5
ERSEQN:ZY133480	At2g38540	putative nonspecific lipid-transfer protein	S	0,005	0,012	0,980	0,028	S	1	0,917	S	8
ERSEQN:ZY132852	At2g40880	cysteine proteinase inhibitor B like, cystatin B	S	0,067	0,088	0,527	0,261	S	4	0,846	S	3
ERSEQN:ZY133503	At2g41290	strictosidine synthase like protein	S	0,036	0,043	0,836	0,185	S	2	0,810	S	1
ERSEQN:ZY132871	At2g43510	putative trypsin inhibitor	S	0,010	0,008	0,997	0,044	S	1	0,866	S	31
ERSEQN:ZY133475	At2g43570	putative endochitinase	S	0,003	0,159	0,953	0,005	S	2	0,854	S	4
ERSEQN:ZY133504	At2g43660	beta-1,3-glucanase like	S	0,043	0,037	0,912	0,013	S	1	0,936	S	4
ERSEQN:ZY133527	At2g47470	putative protein disulfide-isomerase	S	0,004	0,018	0,994	0,057	S	1	0,968	S	19
ERSEQN:ZY133512	At3g02885	GASA5	S	0,005	0,281	0,743	0,001	S	3	0,947	S	2
ERSEQN:ZY133546	At3g02885	GASA5	S	0,005	0,281	0,743	0,001	S	3	0,947	S	2
ERSEQN:ZY132895	At3g05200	RING-H2 zinc finger protein ATL6 (ATL6)	S	0,006	0,009	0,891	0,127	S	2	0,860	S	4
ERSEQN:ZY133638	At3g08610	unknown protein	S	0,046	0,159	0,702	0,207	S	3	0,888	S	1
ERSEQN:ZY132902	At3g12700	unknown protein	S	0,123	0,047	0,676	0,098	S	3	0,909	S	1
ERSEQN:ZY132855	At3g13520	arabinogalactan-protein AGP12	S	0,005	0,017	0,994	0,061	S	1	0,889	S	5
ERSEQN:ZY132858	At3g18280	lipid transfer like protein	S	0,030	0,013	0,925	0,007	S	1	0,971	S	5
ERSEQN:ZY133506	At3g23805	unknown protein	S	0,024	0,077	0,933	0,043	S	1	0,892	S	2
ERSEQN:ZY132881	At3g27400	pectate lyase, putative	S	0,021	0,023	0,973	0,013	S	1	0,848	S	1
ERSEQN:ZY132851	At3g44280	unknown protein	S	0,033	0,027	0,969	0,031	S	1	0,955	S	6
ERSEQN:ZY132833	At3g51730	unknown protein	S	0,018	0,043	0,977	0,070	S	1	0,968	S	2
ERSEQN:ZY132913	At3g52850	Spot 3 protein and vacuolar sorting receptor homolog/AtELP1	S	0,032	0,074	0,929	0,082	S	1	0,963	S	2
ERSEQN:ZY132843	At3g56310	alpha-galactosidase-like protein	S	0,004	0,022	0,997	0,026	S	1	0,844	S	4
ERSEQN:ZY132868	At4g10250	heat shock protein 22,0	S	0,102	0,021	0,915	0,030	S	1	0,833	S	14
ERSEQN:ZY133476	At4g11650	osmotin precursor like protein	S	0,022	0,007	0,988	0,021	S	1	0,966	S	1
ERSEQN:ZY132861	At4g12480	pEARLI 1	S	0,175	0,001	0,773	0,009	S	3	0,839	S	8
ERSEQN:ZY132886	At4g12545	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	S	0,008	0,054	0,809	0,016	S	2	0,946	S	1
ERSEQN:ZY132920	At4g13950	hypothetical protein	S	0,017	0,009	0,968	0,053	S	1	0,959	S	1
ERSEQN:ZY132829	At4g16500	cysteine proteinase inhibitor like protein	S	0,034	0,035	0,929	0,035	S	1	0,957	S	4
ERSEQN:ZY132834	At4g17050	unknown protein	S	0,036	0,022	0,845	0,212	S	2	0,838	S	3
ERSEQN:ZY133651	At4g18280	unknown protein	S	0,076	0,037	0,853	0,057	S	2	0,953	S	2
ERSEQN:ZY132923	At4g19810	putative chitinase	S	0,004	0,012	0,944	0,075	S	1	0,915	S	6
ERSEQN:ZY133636	At4g21960	peroxidase prxr1	S	0,004	0,020	0,970	0,151	S	1	0,953	S	1
ERSEQN:ZY132911	At4g24190	HSP90-like protein	S	0,009	0,172	0,944	0,006	S	2	0,933	S	1
ERSEQN:ZY132919	At4g24780	pectate lyase like protein	S	0,009	0,037	0,978	0,045	S	2	0,889	S	2
ERSEQN:ZY132898	At4g24780	pectate lyase like protein	S	0,009	0,037	0,978	0,045	S	2	0,889	S	2

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 OS	Lok.	Anzahl der Transposon-Insertionen
ERSEQN:ZY132848	At4g27520	early nodulin-like 2 predicted GPI-anchored protein	S	0,006	0,035	0,983	0,018	S	1	0,900	S	7
ERSEQN:ZY132872	At4g31840	Plastocyanin-like domain containing protein, predicted GPI-anchored protein	S	0,055	0,007	0,981	0,025	S	1	0,933	S	71
ERSEQN:ZY133478												
ERSEQN:ZY133519												
ERSEQN:ZY133555												
ERSEQN:ZY133500	At4g34960	cyclophilin (AtCYP21-1)	S	0,001	0,230	0,973	0,018	S	2	0,929	S.a.	2
ERSEQN:ZY132914	At4g38270	unknown protein	S	0,011	0,028	0,972	0,044	S	1	0,906	S	1
ERSEQN:ZY132930	At4g38920	H+-transporting ATPase 16K chain P2, vacuolar	S	0,031	0,044	0,865	0,134	S	2	0,479	S	1
ERSEQN:ZY132860	At4g39090	drought-inducible cysteine proteinase RD19A precursor	S	0,002	0,029	0,098	0,158	S	1	0,874	S	8
ERSEQN:ZY132865	At4g39730	unknown protein	S	0,003	0,042	0,984	0,132	S	1	0,941	S	11
ERSEQN:ZY132878	At5g06480	unknown protein	S	0,003	0,027	0,995	0,240	S	1	0,971	S	1
ERSEQN:ZY132859	At5g07340	calnexin homolog	S	0,004	0,052	0,986	0,056	S	1	0,916	S	8
ERSEQN:ZY132822	At5g17190	unknown protein	S	0,007	0,029	0,905	0,460	S	3	0,763	S	2
ERSEQN:ZY132909	At5g18850	unknown protein	S	0,009	0,494	0,562	0,046	S	5	0,862	S.a.	1
ERSEQN:ZY133534	At5g20230	blue copper binding protein (bcb)	S	0,007	0,016	0,992	0,072	S	1	0,960	S	5
ERSEQN:ZY132845	At5g20500	glutaredoxin	S	0,012	0,011	0,993	0,015	S	1	0,976	S	4
ERSEQN:ZY132815	At5g24770	vegetative storage protein Vsp2	S	0,034	0,015	0,976	0,074	S	1	0,971	S	2
ERSEQN:ZY133653	At5g38630	cytochrome b-561	S	0,002	0,207	0,978	0,017	S	2	0,936	S	1
ERSEQN:ZY132818	At5g44130	predicted GPI-anchored protein	S	0,029	0,056	0,798	0,047	S	2	0,909	S	2
ERSEQN:ZY132854	At5g48580	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like protein	S	0,003	0,062	0,989	0,027	S	1	0,929	S	6
ERSEQN:ZY133640	At5g53650	unknown protein	S	0,008	0,490	0,698	0,015	S	4	0,773	S	1
ERSEQN:ZY133647	At5g58650	unknown protein	S	0,046	0,158	0,929	0,003	S	2	0,959	S	1
ERSEQN:ZY132867	At5g60360	AALP protein	S	0,074	0,013	0,988	0,024	S	1	0,937	S	14
ERSEQN:ZY132811	At5g62350	ripening-related protein-like; contains similarity to pectinesterase	S	0,007	0,010	0,857	0,073	S	2	0,925	S	12
ERSEQN:ZY133509												
ERSEQN:ZY132831	At1g71380	beta-glucanase	C	0,237	0,029	0,635	0,045	S	4	0,851	S	2
ERSEQN:ZY132839	At2g41800	unknown protein	C	0,057	0,014	0,369	0,026	S	4	0,894	S	3
ERSEQN:ZY132826	At1g67785	unknown protein	M	0,028	0,152	0,876	0,052	S	3	0,781	S	2
ERSEQN:ZY132917	At2g40160	unknown protein	M	0,001	0,334	0,926	0,072	S	3	0,668	S.a.	1
ERSEQN:ZY132838	At5g43980	unknown protein	-	0,030	0,007	0,887	0,039	S	1	0,903	S	4

Betrachtet man die Verteilung der in einem Gen vorkommenden Transposons (Abb.9), so zeigt sich, dass die Anzahl der einmaligen Transposon-Insertionen am häufigsten auftrat. Die meisten der einmalig vorkommenden Geninsertionen ließen sich in Peptiden finden, die über sekretorische Signalsequenzen verfügten. Auch zeigte sich anhand der Häufigkeit der in einem Gen vorkommenden Transposons, dass 8 und mehr nur in Peptiden mit sekretorischer Signalsequenz vorkamen. Die höchste Anzahl an Transposon-Insertionen (71) konnten ebenfalls in einem Peptid mit sekretorischer Signalsequenz gefunden werden (Abb.9).



**Abb. 9** Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Sekretionssignale der Transposon-Insertionen pro Gen in der getaggtten cDNA. Die Anzahl der Transposons und Insertionen wurden angegeben.

Um die Selektivität des TAST Systems verifizieren zu können und eine unspezifische Selektion der Kandidatengene, die durch TAST gefunden wurden widerlegen zu können, wurden die Ergebnisse der getaggtten cDNA mit denen einer ungetaggtten Variante verglichen. Dabei wurden 600 nicht-getaggtte cDNA Plasmide durch Selektion auf Kanamycin isoliert und die DNA mit Hilfe des Primer Vec\_for sequenziert. Aus 538 Sequenzen konnten 192 unabhängige Contigs gebildet werden. Auch hier wurden N-terminalen Peptidsequenzen durch TargetP3.0, SignalP1.1 und iPSORT in sekretorische Signalpeptide (Tab.3), chloroplastidäre (Anhang Tab.V), mitochondriale (Anhang Tab.VI) Signalpeptide oder Peptide ohne Signalsequenz eingeteilt (Anhang Tab.VII). Einige Kandidatengene ließen sich auch hier nicht eindeutig zuordnen (Anhang Tab.VIII). Die wenigen sekretorischen Proteine, die in der ungetaggtten cDNA gefunden wurden, können größtenteils den Stress- und Abwehrreaktionen zugeordnet werden, wie z.B. das Gene At1g33590, das auch schon im getaggtten System vorkam. Einige wenige zellwandzugehörige Gene, wie At5g11740, das zu den AGPs gehört, konnten auch in der ungetaggtten cDNA gefunden werden. Den Großteil der ungetaggtten Gene bildeten die Gruppe der Gene, die für Proteine ohne Signalpeptid kodierten. Diese Gruppe bestand fast ausschließlich aus Kandidatengenen der Translation, wie z.B. Initiationsfaktoren (At1g26630) oder der Ribosomenuntereinheiten At1g33120. In der Gruppe der chloroplastidären Signalsequenzen waren Gene des Photosyntheseapparates, wie z.B. Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) (At1g67090) zu finden. In der Gruppe der mitochondrialen Gene waren fast ausschließlich Kandidaten der Ribosomenuntereinheiten vertreten (z.B. At3g22230).

**Tab.3 Die N-terminale Signalsequenzen der ungetaggtten Peptide wurden durch SignalP3.0 und TargetP1.1 den sekretorischen Proteinen zugeordnet** (meist auch mit iPSORT übereinstimmend). (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 ØS	Lok.
AK_Nov1_B10	At1g09870	histidine acid phosphatase family protein	S	0,027	0,043	0,835	0,049	S	2	0,963	S
AK_Nov3_D1	At1g10950	endomembrane protein 70	S	0,032	0,012	0,979	0,034	S	1	0,953	S
AK_Nov1_D5	At1g11910	gene for putative aspartic proteinase	S	0,009	0,072	0,949	0,032	S	1	0,842	S
AK_Nov3_E12	At1g21940	hypothetical protein	S	0,002	0,134	0,969	0,969	S	1	0,686	S
AK_Nov2_C5	At1g33590	disease resistance protein-related / LRR protein-related	S	0,017	0,017	0,963	0,047	S	1	0,941	S
AK_Nov3_C11	At1g44820	aminoacylase, putative / N-acyl-L-amino-acid amidohydrolase	S	0,213	0,011	0,477	0,128	S	4	0,905	S
AK_Nov2_H12	At1g64930	putative cytochrome P450	S	0,059	0,181	0,370	0,026	S	5	0,860	S
AK_Nov3_G2	At1g74010	strictosidine synthase family protein	S	0,073	0,017	0,965	0,057	S	1	0,941	S
AK_Nov1_B9, AK_Nov1_E1	At2g02100	protease inhibitor II	S	0,025	0,013	0,985	0,011	S	1	0,861	S
AK_Nov1_E5	At2g02990	ribonuclease 1 (RNS1)	S	0,011	0,013	0,995	0,031	S	1	0,966	S

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 OS	Lok.
AK_Nov2_A12	At2g03120	signal peptide peptidase family protein	S	0,014	0,221	0,475	0,075	S	4	0,637	S
AK_Nov2_C10	At2g07707	hypothetical protein	S	0,002	0,030	0,970	0,087	S	1	0,737	S.a.
AK_Nov1_F2	At2g43510	putative trypsin inhibitor	S	0,010	0,008	0,997	0,044	S	1	0,866	S
AK_Nov2_G10	At3g01130	expressed protein	S	0,030	0,187	0,473	0,170	S	4	0,481	S
AK_Nov2_C2, AK_Nov3_D8	At3g05880	hydrophobic protein (RC12A) / low temperature and salt responsive protein (LT16A)	S	0,006	0,044	0,994	0,104	S	1	0,739	S.a
AK_Nov3_B9	At3g18280	lipid transfer like protein	S	0,030	0,013	0,952	0,007	S	1	0,971	S
AK_Nov2_F1	At3g22845	emp24/gp25L/p24 protein-related	S	0,003	0,065	0,989	0,038	S	1	0,801	S
AK_Nov3_F3	At3g28740	cytochrome P450 family protein	S	0,013	0,020	0,727	0,022	S	2	0,799	S.a.
AK_Nov2_F11	At3g61820	aspartyl protease family protein	S	0,005	0,046	0,828	0,017	S	2	0,788	S
AK_Nov2_D8	At5g11740	arabinogalactan-protein (AGP15)	S	0,221	0,008	0,979	0,012	S	2	0,899	S
AK_Nov3_A6	At5g19860	expressed protein	S	0,056	0,023	0,923	0,105	S	1	0,930	S
AK_Nov3_A12	At5g25090	plastocyanin-like domain-containing protein	S	0,017	0,021	0,977	0,019	S	1	0,948	S
AK_Nov3_F12	At5g56170	expressed protein	S	0,045	0,028	0,976	0,005	S	1	0,937	S
AK_Nov1_D8	At5g64310	arabinogalactan-protein (AGP1)	S	0,170	0,014	0,553	0,003	S	4	0,961	S
AK_Nov1_G12	At2g27710	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2B)	M	0,113	0,090	0,598	0,126	S	3	0,552	S

Vergleicht man die 154 Gene, die durch das Transposontagging gefundenen wurden, mit den 192 der ungetaggten cDNA so ließen sich folgende Überschneidungen (19 Gene) feststellen (Tab.4).

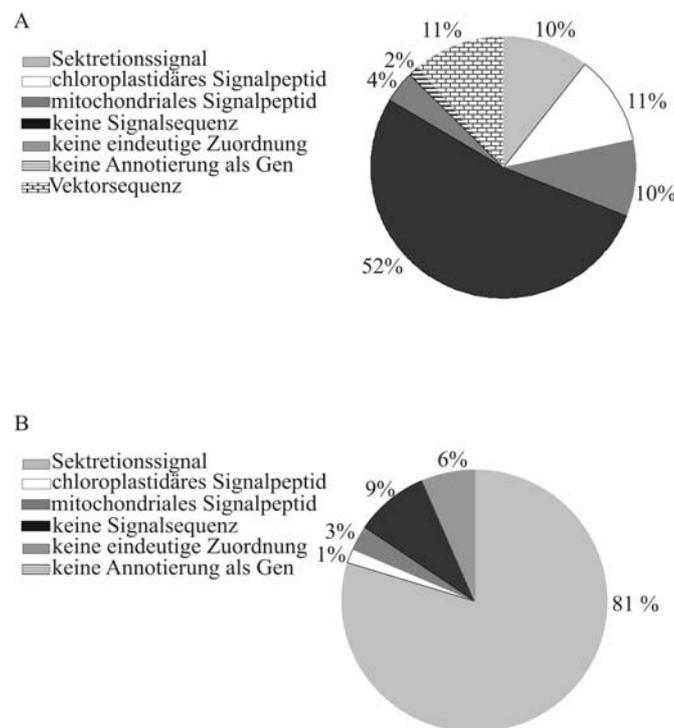
**Tab. 4 Übereinstimmende Gene der getaggten und ungetaggten cDNA.** Gene, die sowohl in der ungetaggten als auch der getaggten cDNA gefunden wurden und die Anzahl der Transposoninsertionen in der getaggten Form (AGI: *Arabidopsis* gene identification).

AGI Code	Anzahl der Transposons im getaggten Gen
At1g26630, At1g33590, At1g35720, At3g52300, At4g11220, At5g53650	1x
At1g08430, At1g71380, At3g12120	2x
At3g13540, At4g15630	4x
At3g18280	5x
At3g44280, At4g19810, At5g48580	6x
At2g38710	7x
At2g02100	17x
At2g43510	31x
At4g31840	71x

Es zeigte sich, dass die Gene mit sekretorischer Signalsequenz, die die größte Anzahl der Transposoninsertionen trugen, auch in der ungetaggten cDNA zu finden waren, wie z.B. At4g31840, das durch 71 Transposons getaggt wurde. Wahrscheinlich waren diese durch eine höhere Expression in der cDNA Bank in größerem Maße vorhanden und wurden so sowohl durch das Tagging, also auch durch die zufällige Sequenzierung erfasst. In der getaggten und ungetaggten cDNA ließen sich Gene der Initiation (At1g26630), aber auch der Stressantwort (At1g33590) und der Zellwandbiosynthese (At1g71380) finden.

Die Analyse der sequenzierten DNA Fragmente ohne Zusammenfügung in ihre Contigs ergab in den Proben der ungetaggten DNA ein 10%iges Vorhandensein an Sekretionssignalen. Chloroplastidäre Signalpeptide waren zu 11% und die mitochondrialen Signalpeptide zu 10%

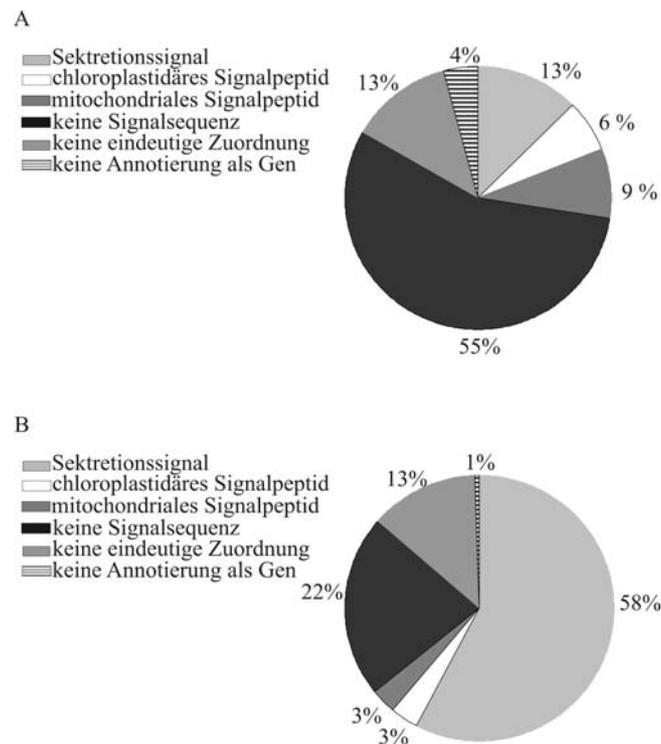
vertreten. Den größten Anteil mit 52% bildeten die Peptide ohne Signalsequenz. Keine eindeutige Zuordnung oder Annotierung als Gen sowie Vektorsequenzen bildeten den Rest (Abb.10A). Im Gegensatz zu den ungetaggtten Sequenzen konnte in den Sequenzen der getaggtten DNA Fragmente eine Anreicherung von 81% der Sekretionssignalen festgestellt werden. Gene, mit vorhergesagten chloroplastidären Signalpeptiden waren zu 1% und mitochondriale Signalpeptide zu 3% vertreten. Sequenzen ohne Signalsequenz waren zu 9% vorhanden. Die restlichen 9% konnten nicht eindeutig durch SignalP3.0 und TargetP1.1 zugeordnet werden (Abb.10B).



**Abb. 10 Analyse der N-terminalen Signalpeptide der aus der Sequenzierung hervorgegangen Sequenzen durch SignalP3.0 und TargetP1.1.** (A) 538 Sequenzen der nicht-getaggtten cDNA, (B) 526 Sequenzen der getaggtten cDNA.

Nach dem Zusammenfügen der 538 ungetaggtten Einzelsequenzen zu 192 Contigs zeigt sich, dass die N-terminalen Signalsequenzen dieser Peptide zu 13% aus sekretorischen, 6% chloroplastidäre, 9% mitochondriale Signalsequenzen bestanden. 55% der Peptide hatten keine Signalsequenz und die restlichen 17% konnten nicht eindeutig zugeordnet werden oder waren nicht als Gen annotiert (Abb.11A). In der getaggtten cDNA konnten aus den 526 Einzelsequenzen 154 Contigs zusammengefasst werden. Es zeigte sich, dass durch die Transposontagging Reaktion die sekretorischen Proteine zu 58% angereichert wurden (58% getaggt vs 13% ungetaggt). Die N-terminalen Signalsequenzen der chloroplastidären und mitochondrialen Proteine waren zu je 3% vertreten. 22% der N-terminalen Sequenzen hatten

keine Signalsequenz (22% getaggt vs. 55% ungetaggt). Die verbleibenden 14% konnten nicht eindeutig Zugeordnet werden oder waren nicht als Gen annotiert (Abb.11B).



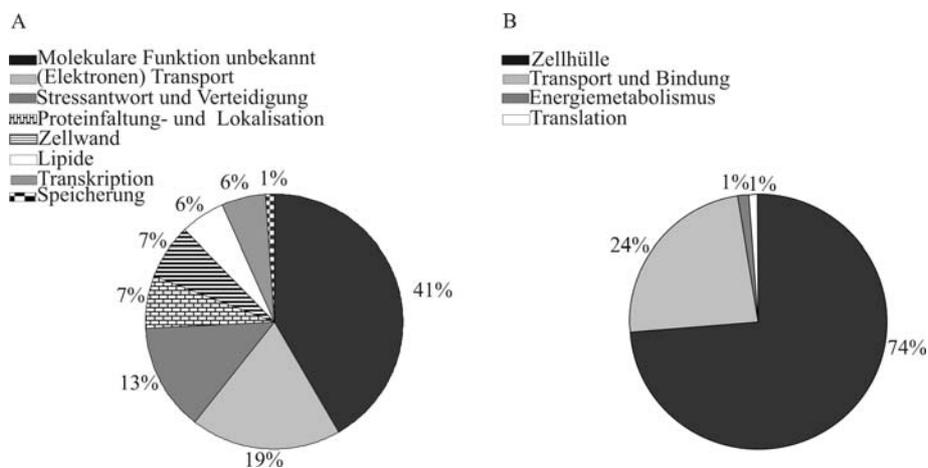
**Abb. 11** Analyse der N-terminalen Signalpeptide der als Contigs zusammengefasst Sequenzen durch SignalP3.0, TargetP1.1. (A) 192 Contigs der nicht-getaggten cDNA, (B) 154 Contigs der getaggten cDNA.

Es zeigte sich deutlich, dass eine Anreicherung an sekretorischen Proteinen mit Hilfe des Transposon-Taggings möglich war.

Die Funktion der 89 sekretorischen Proteine der getaggten cDNA wurde mit Hilfe des Programms ProtFun2.2 und der TAIR Datenbank bestimmt. Um potentielle Sequenzgleichheiten der Signalpeptide zu untersuchen, wurden die Signalpeptide der gefundenen Gene miteinander verglichen (Anhang Tab.IX). Es konnten allerdings keine großen Sequenzgleichheiten festgestellt werden

Eine einfache Funktionsbestimmung der sekretorischen Proteine erfolgte durch ProtFun2.2 (Abb.12B). ProtFun2.2 ordnet der gegebenen Proteinsequenzen eine Funktion zu. Das Programm durchsucht dabei eine große Anzahl an Datenbanken der Proteinzuordnung, um möglichst viele Informationen der post-translationalen Modifikation und Lokalisation zu erhalten, um dem zu untersuchende Protein folgende Funktionen zuordnen zu können: Rolle des Proteins auf zellulärer Ebene, Enzymklasse und Genonthologie (Jensen *et al.*, 2002). Hier zeigte sich, dass 74% der 89 sekretorischen Proteine der getaggten cDNA der Zellhülle, 24% Transport und Bindung und je 1% dem Energiemetabolismus und der Translation zugeordnet werden konnten. TAIR (The Arabidopsis Information Resource) ist eine umfangreiche

Datenbank, die als *Arabidopsis thaliana* Informationsquelle diente und zur Analyse von Proteinen und ihrer Funktionen genutzt wurde. 41% der sekretorischen Proteine hatten eine unbekannte Funktion. 19% konnten dem (Elektronen-) Transport zugeordnet werden. Proteine der Stressantwort und Verteidigung waren zu 13% als drittgrößte Gruppe vertreten. Proteinfaltung und Zellwandproteine waren jeweils zu 7%, Lipide und Transkription zu je 6% und Proteine der Speicherung zu 1% vorhanden (Abb.12A). Beide Programme und die daraus resultierenden Ergebnisse zeigen, dass durch TAST Gene, die für Proteine mit sekretorischer Signalsequenz, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind selektiert werden konnten.



**Abb. 12 Die Funktion der sekretorischen Proteine der getaggtten cDNA.** Funktionsbestimmung (A) durch die TAIR Datenbank, (B) durch das Programm ProtFun2.2.

Betrachtet man die einzelnen Gene, die durch TAST selektiert wurden, so ist die Funktion derer, die über eine sekretorische Signalsequenz verfügten zum größten Teil unbekannt. Neben den Genen unbekannter Funktion ließen sich auch Kandidatengene finden, die für Proteine kodieren, die wie AGPs, Bestandteile der Zellwand sind (z.B. At1g55330, At2g22470 At3g13520) oder wie die  $\beta$ -Glukanase (At1g71380) und Pektatlyase (At4g24780) am Prozess des Zellwandaufbaus beteiligt sind. Den größten Anteil der zellwandspezifischen Gene bildeten die Glykosylhydrolasen (z.B. At1g71380 oder At2g43570). Neben den Genen, der Zellwandsynthese, konnten auch Gene, der Pathogenabwehr (At2g19990) und Stressantwort (wie Chitinasen (At4g19810) oder Hitzeschockproteine (At4g10250)) isoliert werden. Die Gruppe der Peptide, die durch TAST selektiert wurden und über ein chloroplastidäres oder mitochondriales Signalpeptid verfügten, wird von Genen gebildet, die für Proteine unbekannter Funktion kodieren.

Die 7 Gene, die der Gruppe der Zellwand zugeordnet wurde, konnte auch in CAZy, einer Datenbank, die strukturähnliche und Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme beinhaltet, gefunden werden. Die folgenden Gene waren in CAZy vertreten: At1g71380 (in CAZy:

Glycoside Hydrolase Family 9), At2g43570 (in CAZy: Glycoside Hydrolase Family 19), At3g27400 (in CAZy: Polysaccharide Lyase Family 1, pectate lyase (EC 4.2.2.2)), At3g56310 (in CAZy: Glycoside Hydrolase Family 27), At4g19810 (in CAZy: Glycoside Hydrolase Family 18, similar to chitinase/lysozyme GI:467689 from *Nicotiana tabacum*), At4g24780 (in CAZy: Polysaccharide Lyase Family 1, pectate lyase (EC 4.2.2.2)), At4g38270 (in CAZy: Glycosyltransferase Family 8, lipopolysaccharide galactosyltransferase (EC 2.4.1.44)). Diese Kandidatengene könnten für weitere Zellwandspezifische Untersuchungen z.B. an *Arabidopsis* Knockout-Mutanten interessant sein, da sie der CAZy Datenbank gefunden wurden, die Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme enthält. Weitere Kandidaten konnten nicht in CAZy gefunden werden.

### 3.1.2 Expressionsanalyse der durch TAST gefundener Gene

Um die Funktion der durch TAST gefundenen Gene bei der Regeneration der Zellwand abschätzen zu können und eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Anzahl an Transposoninsertionen zu erhalten, wurde die Expression von 72 Kandidatengenen durch die Expressionsanalyse auf einem Macroarray untersucht. Dafür wurden die entsprechenden Kandidatengene der CATMA-Kollektion (Complete *Arabidopsis* Transcriptome MicroArray) entnommen und auf einen Filter gespottet. Ziel war es, alle Gene, deren N-terminale Signalsequenz den sekretorischen Signalpeptiden angehörte, untersuchen zu können. Jedoch waren nicht alle gewählten sekretorischen Gene in der CATMA-Kollektion enthalten. So wurden insgesamt 57 Gene, die für Proteine mit sekretorischem Signalpeptid kodieren gewählt, zwei wurden doppelt gespottet, da sie in unterschiedlichen GSTs (gene sequence tag) in der CATMA-Kollektion vorhanden waren, so dass insgesamt 59 GSTs sekretorischer Proteine auf dem Filter gespottet wurden. Außerdem wurden je 2 Gene, die für Proteine mit chloroplastidären oder mitochondrialen Signalsequenzen kodierten, sowie 7 Gene, die ohne Signalsequenz waren (2 waren erneut doppelt vorhanden, so dass sich somit insgesamt 9 Gene ohne Signalsequenz auf dem Filter befanden) gewählt. Weiterhin wurden 2 Gene, deren Signalsequenzen durch SignalP3.0 und TargetP1.1 unterschiedlich zugeordnet worden war auf den Filter gespottet. Für die Expressionsanalyse wurden RNA Proben der regenerierten Protoplasten der Zeitpunkte 14 h, 26 h, 58 h verwendet. Alle ermittelten Expressionswerte wurden auf die 14 h Werte normalisiert. Die Expression konnte in drei Kategorien unterteilt werden, die der im Verlauf der Regeneration zunehmenden und wieder abnehmenden Expression (Anhang Tab.X), die der zunehmenden Expression (Anhang Tab.XI) und die abnehmenden Expression (Anhang Tab.XII). Es zeigte sich in den meisten Fällen, dass die

Gene, die über die höchste Expression auch über die größte Anzahl an Transposoninsertionen verfügten (At3g13520; 5 Transposon-Insertionen; At3g18280, 5 Transposon-Insertionen; At4g31840, 71 Transposon Insertionen). At3g18280 und At4g31840 konnten auch schon durch Vergleiche zu bereits veröffentlichten Daten gefunden werden (Anhang Tab.XIV) und auch in den Überschneidungen zwischen getaggtter und ungetaggtter cDNA. So konnte die Annahme, dass Gene mit höherer Expression über eine große Anzahl an Transposon-Insertionen verfügten verifiziert werden. Die Gene, deren Expression mittel oder schwach war, trugen meist weniger Transposon-Insertionen.

Fünf von sechs Genen, die durch CAZy als Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme (At1g71380, At2g43570, At3g27400, At3g56310, At4g19810) ermittelt wurden und auf dem Macroarray vertreten waren, zeigten eine ansteigende und wieder abfallende Expression. Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass Gene, die an der Zellwandsynthese beteiligt sein könnten, nur über die Dauer der Zellwandsynthese exprimiert werden. Nur ein durch CAZy gefundenes Gen zeigte eine ansteigende Expression (At4g24780).

Fünf von acht Genen, die der Gruppe der Stress- oder Verteidigungsantwort zugeordnet wurden, zeigten eine ansteigende Expression (At1g09850, At1g74020, At4g21960, At4g16500, At4g39090), während drei ein ansteigendes und wieder abfallendes Expressionsmuster aufweisen (At2g19990, At2g40880, At2g41290). Auch hier zeigte sich eine Bestätigung, dass Gene der Stress- oder Verteidigungsantwort dauerhaft oder in den ersten Stunden der Protoplastierung exprimiert wurden.

Zwei der an der Transkription beteiligten Gene zeigte einen Anstieg (At3g02885, At3g52850), ein Gen Anstieg und Abfall (At1g79940) und zwei Gene Abfall und Anstieg (At2g29960, At4g17050) der Expression. Die Expression der an der Transkription beteiligten Gene ist also variabel.

Einige Gene wurden zweifach auf den Filter gespottet. Es zeigte sich nur in einem Fall, dass die Expression nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Das Gen At3g27400 war sowohl in die Gruppe der ansteigenden Expression als auch in die Gruppe der ansteigenden und abnehmenden Expression vertreten. Alle anderen doppelt gespotteten Gene zeigten ein identisches Expressionsmuster (At1g59740, At3g26950, At4g24190).

### **Qualitätskontrolle der für die Expressionsanalyse verwendeten RNA**

Um ausschließen zu können, dass unterschiedlich Mengen an RNA die Ergebnisse der Expressionsanalyse verfälschten, wurde die Qualität der RNA durch Real-time RT-PCR geprüft. Hierfür wurden 10 verschiedenen Houskeeping-Gene verwenden (Anhang Tab.XIII).

Die RNA-Proben der Zeitpunkte 14 h, 26 h, und 58 h zeigten keine Unterschiede in der Expression der Houskeeping-Gene. Es kann also ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche RNA oder mRNA Mengen vorlagen.

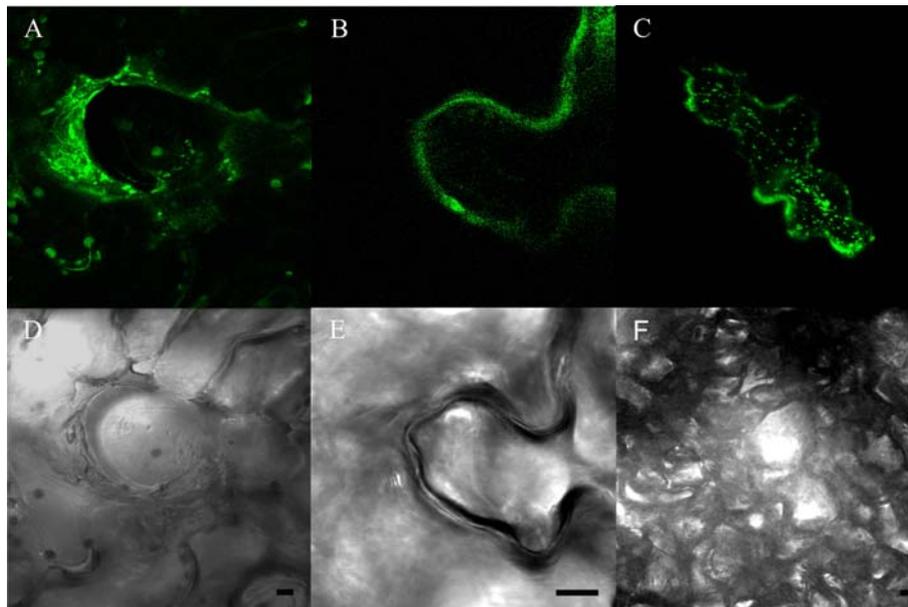
### 3.1.3 Lokalisationsbestimmung durch das Green-Fluorescent-Protein (GFP)

Um die durch SignalP3.0, TargetP1.1 und iPSORT bestimmten Lokalisationen zu bestätigen, und die Selektion apoplastischer Proteine durch TAST verifizieren zu können, wurden insgesamt 7 Kandidatengene aus der Liste der getaggten Gene ausgewählt. Es wurden folgende Gene zur Lokalisationsbestimmung verwendet:

- sekretorische Signalpeptide (At3g13520, At4g19810, At4g24780, At4g31840)
- mitochondriales Signalpeptid (At3g46430)
- chloroplastidäres Signalpeptid (At5g64040)
- ohne Signalsequenz (At3g12120)

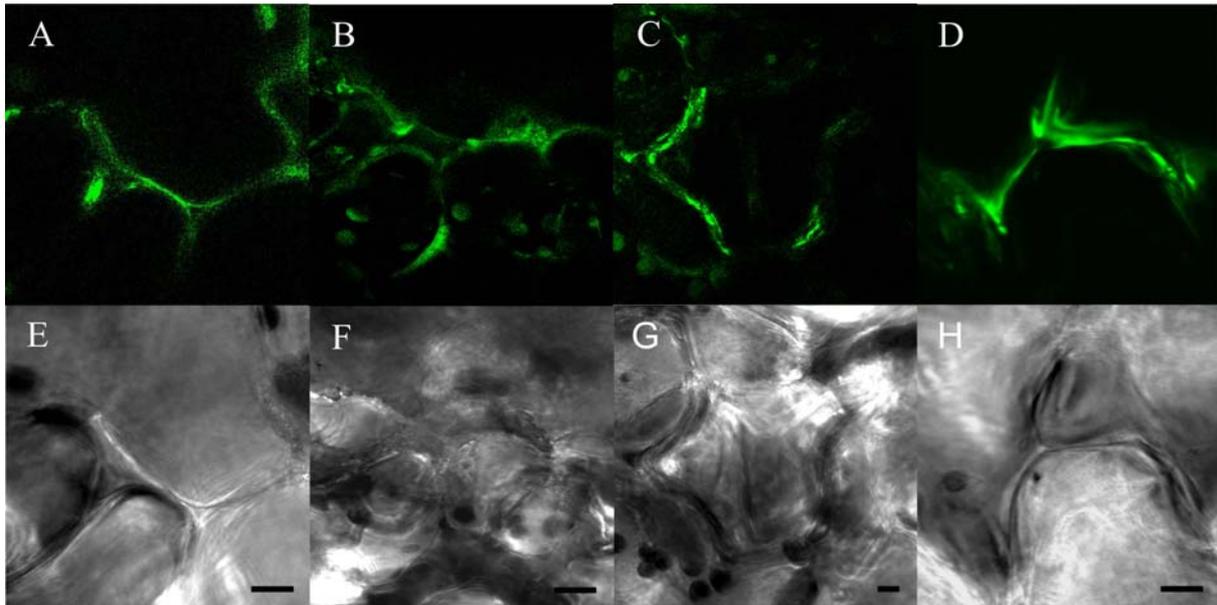
Dabei wurden die Gene, die für Proteine mit sekretorischen Signalpeptiden kodierten, einerseits aus der Gruppe der durch CAZy-Kandidaten und andererseits aus der Gruppe der AGPs ausgewählt. Zur Überprüfung der Lokalisationsvorhersage durch die Programme SignalP3.0, TargetP1.1 und iPSORT wurde das Gen At3g46430 (als mitochondriale Kontrolle) zufällig, das Gen At5g64040 (als chloroplastidäre Kontrolle), da es eine Untereinheit des Photosystems I bildet und das Gen At3g12120 (als Kontrolle ohne Signalsequenz) wiederum zufällig aus der Liste der Kandidaten gewählt. Zur PCR-Amplifikation wurde ungetaggte cDNA und die entsprechenden Forward- und Reverse-Primer verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass bei allen amplifizierten DNA Stücken das jeweilige Stop-Codon fehlte. Die amplifizierte DNA wurde über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pA7-GFP, der das Green-Fluorescent-Protein in C-terminaler Position trägt, kloniert. Die Plasmid-DNA wurde durch Bombardierung in *Arabidopsis* Blätter gebracht. Die Analyse der Blätter erfolgt durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Als Kontrolle der apoplastischen Lokalisation, die eine Zuordnung der zu untersuchenden Kandidaten ermöglichen sollte, diente die ATP-Diphosphorylase (RROP1) aus *Solanum tuberosum* im Vektor pA7-GFP. Als Kontrolle der Plasmamembran wurde ein Ammonium-Transporter der Plasmamembran aus *A.thaliana* (At1g64780) im Vektor pA7-GFP und als mitochondriale Kontrolle pre101 (pre-b: Untereinheit b der mitochondrialen ATPase aus *N. plumbagnifolia* im Vektor pA7-GFP) verwendet. Alle Kontrollen zeigten eindeutig die

vorhergesagte Lokalisation im Apoplasten (Abb.13A), an der Plasmamembran (Abb.13B) oder in den Mitochondrien (Abb.13C).



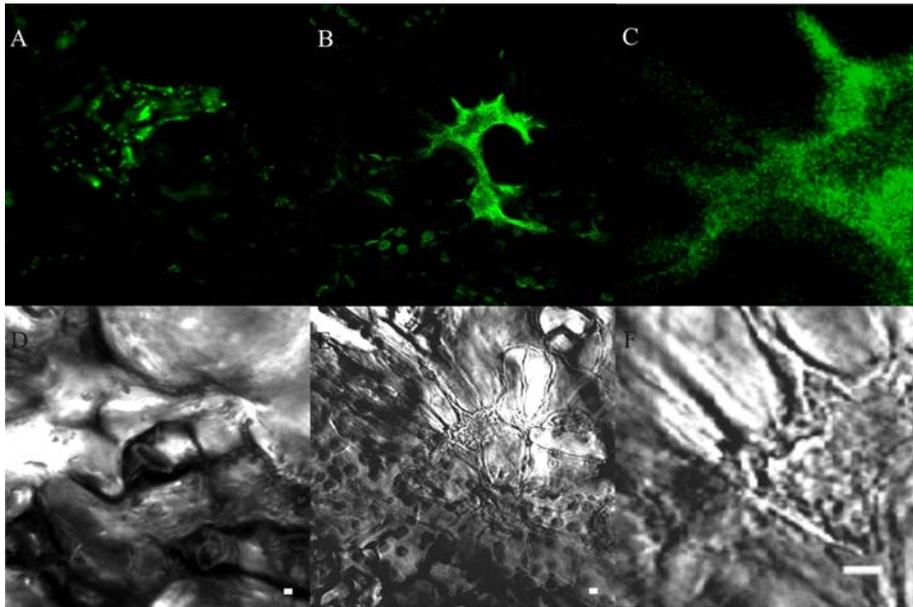
**Abb. 13 Lokalisationsanalyse durch GFP-Fusion (Kontrollen).** (A) Apoplastische Kontrolle: ATP-Diphosphorylase (RROP1) aus *Solanum tuberosum*. (B) Plasmamembran Kontrolle: Ammonium-Transporter der Plasmamembran aus *A.thaliana* (At1g64780). (C) Mitochondriale Kontrolle: pre101 (pre-b: Untereinheit b der mitochondrialen ATPase aus *N. plumbagnifolia*). (D) Durchlicht-Darstellung der apoplastischen Kontrolle. (E) Durchlicht-Darstellung der Plasmamembran Kontrolle, (F) Durchlicht-Darstellung der mitochondrialen Kontrolle. Skala = 8  $\mu$ m.

Die Gene At3g13520 (*A.thaliana*; arabiongalactan protein (AGP12) (Abb.14A), At4g19810 (*A.thaliana*; putative chitinase) (Abb.14B), At4g24780 (*A.thaliana*; putative pectatlyase) (Abb.14C) und At4g31840 (*A.thaliana*; plastocyanin-like domain containing protein) (Abb.14D) ließen sich, im Vergleich zur vorhandenen apoplastischen Kontrolle, eindeutig dem Apoplasten zuordnen. Die erfolgte Selektion durch TAST und die bioinformatische Zuordnung der N-terminalen Signalsequenzen zu den sekretorischen Signalpeptiden ließen sich in allen 4 ausgewählten Kandidatengenen verifizieren.



**Abb. 14 Lokalisationsanalyse durch GFP-Fusion (Sekretionspeptide).** (A) At3g13520 (*A.thaliana*; arabiongalactan protein (AGP12)). (B) At4g19810 (*A.thaliana*; putative chitinase). (C) At4g24780 (*A.thaliana*; putative pectatlyase). (D) At4g31840 (*A.thaliana*; plastocyanin-like domain containing protein). (E) Durchlicht-Darstellung von At3g13520. (F) Durchlicht-Darstellung von At4g19810. (G) Durchlicht-Darstellung von At4g24780. (H) Durchlicht-Darstellung von At4g31840. Skala = 8  $\mu\text{m}$ .

Für das Konstrukt At3g46430 dessen Lokalisation im Mitochondrium vorhergesagt wurde, konnte die Lokalisation im Mitochondrium bestätigt werden (Abb.15A). Eine Abweichung der durch SignalP3.0 und TargetP1.1 vorhergesagten Lokalisation konnte im Konstrukt, das über keine Signalsequenz verfügen sollte festgestellt werden. Hier zeigte sich, das At3g12120 im Apoplasten lokalisiert war (Abb.15B; Abb.15C zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus 15B). Wäre At3g12120 im Cytosol lokalisiert, so müsste der Kern zu sehen sein, hier jedoch nicht zutreffend. Ohne Ergebnis blieb das Konstrukt der chloroplastidären Zuordnung. Hier konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden. Es zeigte sich also, dass die Selektion durch TAST im Falle des Gens At3g12120 richtig war, die Lokalisationsbestimmung durch bioinformatische Analysen der N-terminalen Signalsequenz jedoch falsch vorhergesagt wurde.



**Abb. 15 Lokalisationsanalyse durch GFP-Fusion (Kandidaten anderer Lokalisation).** (A) At3g46430 (*A.thaliana*; unknown protein), (B) At3g12120 (*A.thaliana*; unknown protein), (C) Ausschnitt aus 15B zur vergrößerten Darstellung, (D) Durchlicht-Darstellung von At3g46430, (E) Durchlicht-Darstellung von At3g12120, (F) Durchlicht-Darstellung des Ausschnitts aus 15B. Skala = 8  $\mu\text{m}$ .

## 3.2 Untersuchung einer T-DNA Knock-out Linie mit stark verkürztem Wurzelwachstum

### 3.2.1 Funktionale Analyse des *UGE3*-Gens

#### Isolation einer T-DNA Mutante mit Insertion im *UGE3*-Gen

In einem phänotypischen Screen wurden T-DNA Mutanten anhand ihres Wurzellängenwachstums auf saccharosehaltigem Medium untersucht. Dr. Wolf-Rüdiger Scheible (Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland) konnte eine Mutante mit stark verkürztem Wurzelwachstum isolieren. Dr. Wolf-Rüdiger Scheible konnte durch Plasmidrescue die Insertion der T-DNA im Gen At1g63180 (UDP-glucose epimerase like protein, *UGE3*) ermitteln (unveröffentlichte Daten). *UGE3* gehört in *Arabidopsis thaliana* zur *UGE*-Genfamilie, die aus 5 Genen (*UGE1* bis *UGE5*) besteht. Aufgrund der T-DNA Insertion in einem Gen des Nukleotidzucker-Synthesewegs sollten die Auswirkung der Insertion auf mögliche Änderungen in der Zusammensetzung der Zellwand oder der Zellmetabolite untersucht werden.

#### Die *UGE*-Genfamilie

Zur funktionalen Analyse der *UGE*-Genfamilie bzw. eines Mitglieds dieser Familie, wurde das Expressionsverhalten der einzelnen Mitglieder in unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht. Die Daten der öffentlich zugänglichen Microarray AffimetrixChip Experimente des AtGenexpress Konsortiums (<ftp.arabidopsis.org>) konnten zur Analyse verwendet werden (Anhang Abb.I). Es ließ sich deutlich erkennen, dass die Gene *UGE2* und *UGE4*, nur schwach im Vergleich zu allen anderen Mitgliedern der *UGE*-Genfamilie exprimiert waren. *UGE1* zeigte im Vergleich zu den restlichen Mitgliedern der *UGE*-Familie die höchste Expression (bis zu 5-fach höher als in *UGE3* und *UGE5*). Eine hohe Expression ließ sich im Stamm (erste und zweite Internode) und in den Stamen der Blüte erkennen. Die stärkste Expression des *UGE3*-Gen zeigte sich vor allem in den Stamen der Blüten, in den Pollen und in verschiedenen Entwicklungsstadien der Samen in den Schoten. Für das *UGE5*-Gen war eine hohe Expression in Seneszenzblättern, in den Stamen der Blüten, in den Pollen und in verschiedenen Entwicklungsstadien der Samen in den Schoten erkennbar. Die hohe Expression in den Stamen der Blüten ließen sich in *UGE1*, *UGE3* und *UGE5* erkennen. Die Daten des AtGenexpress konnten anhand von Real-time RT-PCR Experimenten verifiziert werden (Tab.5). Die Expression wurde in Blüten, Wurzeln, Keimlinge und Stämmen untersucht. Die CT-Werte der *UGE*-Genfamilie ließen sich durch die Real-time RT-PCR

Reaktion mit Hilfe der Primern RT1(bis5)\_real\_for/rev ermitteln. Als Standardgen wurde das Gen Aktin2 (At3g18780) verwendet und dessen Expression durch die Primer At3g18780\_for/rev ermittelt. Die sich aus der Real-time RT-PCR ergebenden CT-Werte (threshold cycle) geben an, wie viele Zyklen benötigt wurden, um eine Signaldetektion, die signifikant zum Hintergrund ist, zu erlangen. Je kleiner der CT-Wert ist, desto höher ist die Expression des untersuchten Gens. Alle ermittelten CT-Werte wurden mit Hilfe des Standardgens normalisiert. *UGE1* zeigte in allen Geweben die höchste Expression der *UGE*-Genfamilie. Dabei war die höchste Expression im Stamm erkennbar. *UGE2* zeigte eine allgemein niedrige Expression. *UGE3* zeigte in den Blüten, *UGE4* und *UGE5* in den Wurzeln und Keimlingen die höchste Expression.

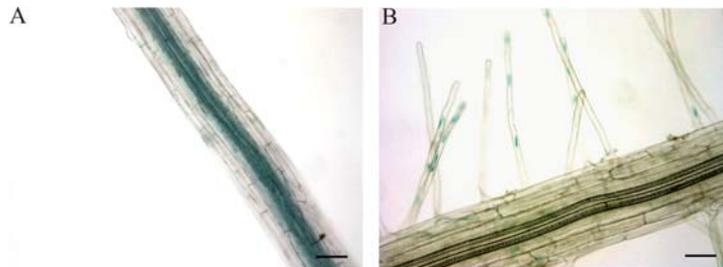
**Tab. 5 Expressionsanalyse durch Real-time RT-PCR der *UGE*-Genfamilie.** Die RNA der verwendeten Proben wurde aus 42 Tage alten Col-0 Blüten und Stämmen (Wachstumsbedingungen: Gewächshaus), sowie 12 Tage alten Col-0 Keimlingen und Wurzeln (Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigkultur, 1% Saccharose, permanentes Licht) isoliert. Alle angegebenen CT-Werte wurden mit Hilfe des Standardgens Aktin2 normalisiert. (CT: threshold cycle).

<i>UGE1</i>	<i>UGE2</i>	<i>UGE3</i>	<i>UGE4</i>	<i>UGE5</i>	
3,02	10,53	7,72	10,24	9,41	Blüte
2,83	9,45	10,26	5,20	6,93	Wurzel
1,16	9,35	10,72	5,85	7,37	Keimling
0,74	12,04	12,49	8,51	10,73	Stamm

### Die Expressionsanalyse des *UGE3* Gens durch Promotor-GUS-Fusion

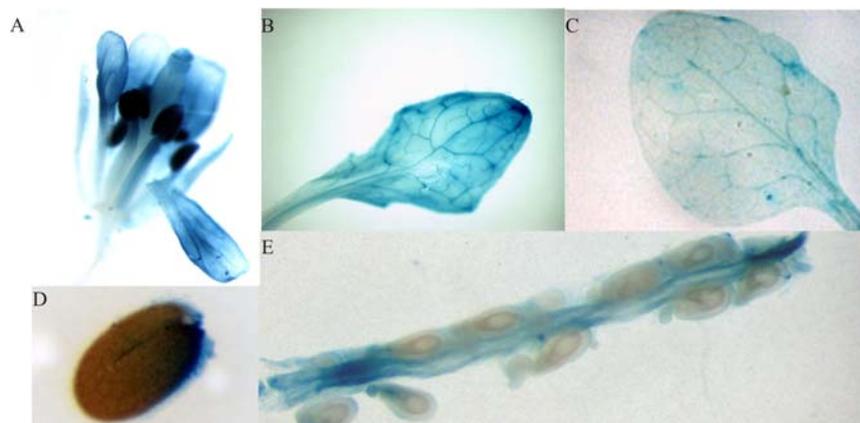
Zur genaueren Analyse der Expression des *UGE3*-Gens in *A. thaliana* wurde ein 2.481 bp großes Fragment, das sich upstream des *UGE3* ATGs befindet und die Promotorregion des *UGE3*-Gens einschließt, isoliert. Zur PCR Amplifikation wurden die Primer UGPR3\_for und UGPR4\_rev und die DNA des BAC F16M19 verwendet. Nach einer Zwischenklonierung im Vektor pCRII-TOPO und Überprüfung der Sequenz durch Sequenzierung, wurde der *UGE3*-Promotor durch die Schnittstellen SmaI, Sall in den Vektor pBI101.1, der das GUS-Gen trägt, kloniert. Das erzielte Vektorkonstrukt wurde durch *Agrobakterien*-Transformation in *A.thaliana* gebracht. Alle Konstrukte wurden vor der Transformation in *A.thaliana* sequenziert. Die Selektion transgener Pflanzen, die aus der *Agrobakterien*-Transformation hervorgingen erfolgte auf Kanamycin. Die Expressionsanalyse des GUS-Gens unter der Kontrolle des *UGE3*-Promotors wurde in verschiedenen Pflanzengeweben und Entwicklungsstadien untersucht. Alle Gewebe wurden für 48h gefärbt. Es zeigte sich deutlich, dass die Expression im Wurzelgewebe, im Vergleich zu anderen Organen gering war, wie auch schon die Expressionsdaten des AtGenexpress und der Real-time Experimente zeigten.

Die höchste Expression in den Wurzeln ließ sich in den Zellen des Zentralzylinders der Hauptwurzeln erkennen (Abb.16A), in allen anderen Bereichen der Wurzeln war die Expression gering. In den Wurzelhaaren der Seitenwurzeln war eine geringe Expression sichtbar (Abb.16B).



**Abb. 16 Expressionsanalyse 8 Tage alter Wurzeln durch *UGE3*-Promotor-GUS-Fusion.** (A) Die Expression des *UGE3*-Gens war in den Wurzeln am schwächsten. Es zeigte sich, dass im Zentralzylinder der Hauptwurzel die höchste Expression des Wurzelgewebes erkennbar war. (B) Die Expression der Seitenwurzel war gering, nur Teile der Wurzelhaare zeigten schwache Expression. Die Färbung erfolgt für 48h. Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala = 200µm.

Die höchste Expression der untersuchten Gewebe ließ sich in den Stamen 32 Tage alter Blüten erkennen (Abb.17A). In Schoten und Samen war die Expression geringer (Abb.17D, E). Mit Zunahme des Blattalters konnte ein Rückgang der Expression in den Blättern festgestellt werden (Abb.17B, C).



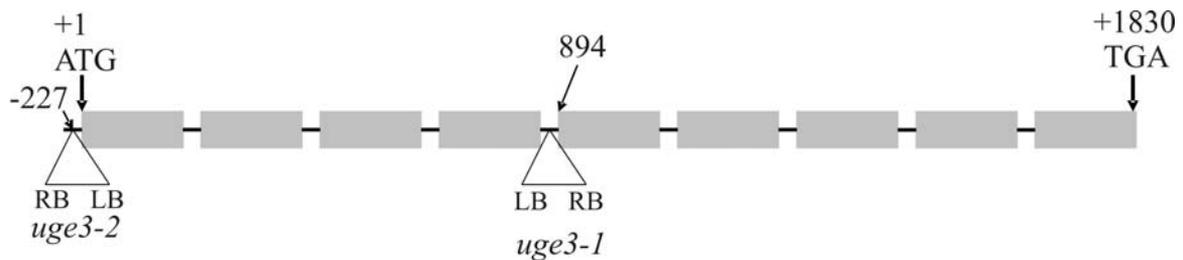
**Abb. 17 GUS-Färbung verschiedener Gewebearten.** (A) 32 Tage alte Blüte, (B) 25 Tage altes Blatt, (C) 32 Tage altes Blatt, (D) Samen, (E) 25 Tage alte Schote. Alle Gewebe wurden für 48h gefärbt. Wachstumsbedingung: Gewächshaus.

Die erzielten Ergebnisse der *UGE3*-Promotor-GUS Analyse bestätigte die Expressionsdaten des AtGenexpress und der Real-time RT-PCR.

### Die *uge3*-KO Mutante

Die aus dem phänotypischen Screen hervorgegangene Mutante mit einer T-DNA Insertion im *UGE3*-Gen, konnte als homozygote Line (#76) von Dr. Wolf-Rüdiger Scheible isoliert

werden (unveröffentlichte Daten). Diese wurde als *uge3-1* bezeichnet. Durch PCR Amplifikation mit den Primern START (genspezifischer Primer der ATG-Region), LB (T-DNA Primer des Leftborders) und STOP (genspezifischer Primer der TGA-Region), RB (T-DNA Primer des Rightborders) und anschließender Sequenzierung wurde die Insertionsstelle der T-DNA im Gen *UGE3* an Position 894 des 4. Introns ermittelt. Das Intron erstreckt sich in *UGE3* von der Position 790 bp bis 894 bp. Durch die Insertion fehlen 33 bp (863-894 bp) des Introns (Abb.18).



**Abb. 18 Die T-DNA Insertionsstellen im *UGE3* Gen.** Das *UGE3* Gen besteht aus 9 Exons (durch graue Kästen dargestellt). Die T-DNA Insertion (durch Verbindungsstriche dargestellt) der *uge3-1* Mutante befand sich am Ende des 4. Introns an der Position 894. Die Mutante *uge3-2* der GABI KAT Kollektion trug einen T-DNA Insertion an der Stelle -277 upstream des ATG (RB: Rightborder-, LB: Leftborder-Bereich der T-DNA).

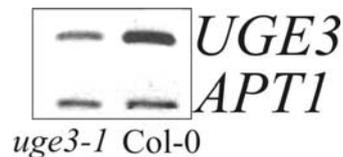
Die T-DNA der *uge3-1* Mutante trug eine Kanamycin-Resistenzkassette. Durch Southern Blot Analyse mit einer Kanamycin-Sonde, die durch die Primer T-DNA\_for und rev von genomischer DNA der *uge3-1* Mutante amplifiziert wurde, konnte eine singuläre Insertion der T-DNA nachgewiesen werden (Abb.19).



**Abb. 19 Southern Blot Analyse von 6 verschiedenen *uge3-1* Pflanzen mit einer Kanamycin Sonde.** Die genomische DNA der untersuchten *uge3-1* Pflanzen wurde mit dem Enzym EcoRI verdaut. Die einfache Insertion der T-DNA ist anhand der einzelnen Bande erkennbar.

Der vollständige Verlust des Transkripts konnte durch RT-PCR nicht bestätigt werden (Abb.20). Zur Analyse des Transkripts wurde RNA aus 4 Wochen alten Pflanzen, die im Gewächshaus wuchsen, isoliert und zur cDNA umgeschrieben. Der Nachweis des *UGE3* Transkripts erfolgt in der RT-PCR Analyse durch die genspezifischen Primer (RT\_new\_3\_for und rev). Durch Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass die

Sequenz des Transkripts der der *UGE3*-Wildtypsequenz entsprach. Das Transkriptlevel des Housekeeping-Gens Adenosylphosphoribosyl-Transferase (*APT1*) wurde durch die Primer RTApt1A und B nachgewiesen. Lediglich eine Abschwächung der Transkriptmenge war zu erkennen. Die eingesetzten RNA-Mengen konnten durch gleiche Transkriptmengen im *APT1* Housekeepinggen nachgewiesen werden.

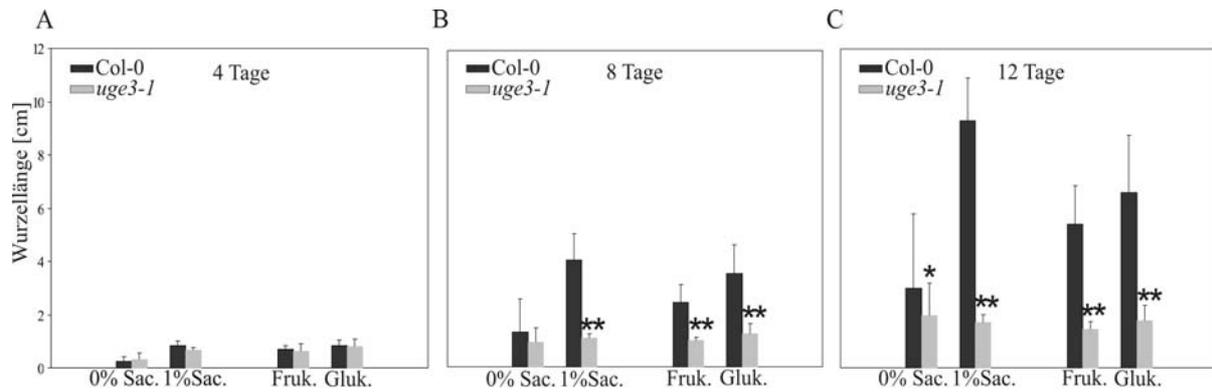


**Abb. 20** RT-PCR zur Untersuchung der Transkriptstärke des *UGE3* und *APT1* Gens in *uge3-1* und Wildtypen Col-0.

### Phänotypische Bestimmung der *uge3* Mutante

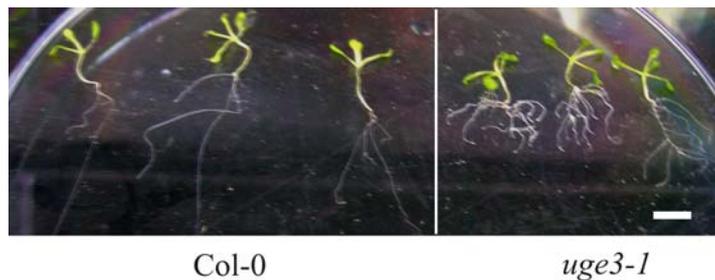
Die *uge3-1* Mutante wurde aufgrund ihres verkürzten Wurzelwachstums auf saccharosehaltigem Medium isoliert. Samen der *uge3-1* Mutante wurden zur Bestimmung der Wurzellängen auf MS-Festmedium (0,5% Gelrite), dem als Zuckerquelle 1% Saccharose zugesetzt wurde, ausgelegt. Die Wurzellängen wurden nach 4, 8 und 12 Tagen gemessen und mit denen des Wildtypen Col-0 verglichen. *uge3-1* zeigte nach 4 Tagen eine signifikante Verkürzung der Wurzel um durchschnittlich 23%, nach 8 Tagen um 73% und nach 12 Tagen um 82%. Die Wurzellängen von *uge3-1* und Col-0 zeigten auf Medium ohne Zuckerquelle keine signifikanten Unterschiede nach 4 und 8 Tagen, nach 12 Tagen konnte aufgrund der schlechten Keimung ohne Zuckerquelle eine durchschnittliche Verkürzung der *uge3-1* Wurzel um 34% festgestellt werden (Abb.21).

Da Saccharose ein Dimer aus den Molekülen  $\alpha$ -D-Glucose und  $\beta$ -D-Fruktose ist, wurden neben den Wachstumsexperimenten auf Saccharose auch die Wurzellängen auf MS-Festmedium (0,5% Gelrite) mit 1% Fruktose und 1% Glukose ermittelt. Es zeigte sich in beiden Experimenten eine signifikante Verkürzung der Wurzellängen in *uge3-1* nach 4 Tagen um 5% (Fruk.) bzw. 6% (Gluk.), nach 8 Tagen um 59% (Fruk.) bzw. 64% (Gluk.) und nach 12 Tagen um je 73% (Abb.21). Das Wurzelwachstum blieb ohne Zuckerquelle gleich.



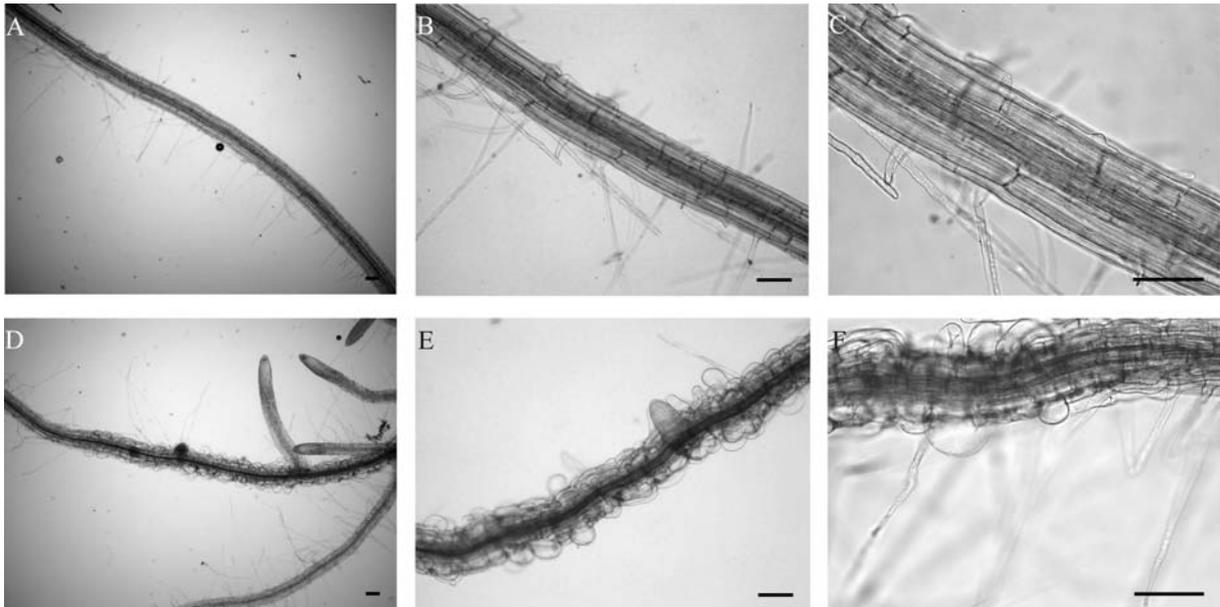
**Abb. 21 Wurzellängenanalyse der *uge3-1* Mutante im Vergleich zum Wildtypen Col-0 auf Fruktose Glukose und Saccharose.** (A) 4 Tage, (B) 8 Tage, (C) 12 Tage Wurzelwachstum nach Aussaat. Als Zuckerquelle dienten 0% Saccharose (0% Sac.) oder 1% Saccharose (1% Sac.), 1% Fruktose (Fruk.) und 1% Glukose (Gluk.). Wachstumsbedingung: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), permanentes Licht. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

Im direkten visuellen Vergleich der *uge3-1* Mutante mit dem Wildtypen Col-0 zeigte sich neben der starken Verkürzung der Wurzel auch eine deutliche Zunahme an gebildeten Seitenwurzeln der 8 Tage alten *uge3-1* Mutante (Abb.22).



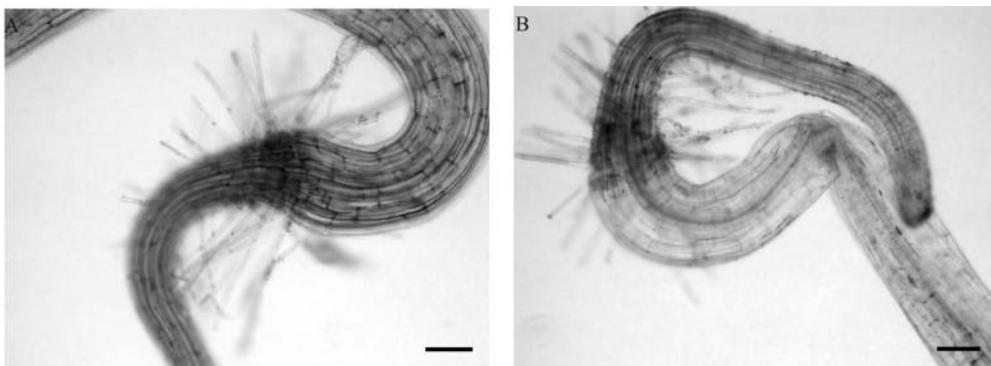
**Abb. 22 Phänotypische Bestimmung 8 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Wurzeln bei einem Wachstum in 1% Saccharose.** (Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, Skala = 5 mm).

Die genauere Analyse der *uge3-1* Wurzeln erfolgte durch mikroskopische Untersuchungen der Wurzelzellen. Es zeigte sich, dass *uge3-1* eine starke Deformation der Hauptwurzel im Vergleich zum Wildtypen Col-0 (Abb.23A-C) erkennen ließ. In *uge3-1* waren die Nicht-Wurzelhaarbildenden Epidermiszellen vergrößert und kugelförmige (Abb.23D-F). Die Nebenwurzeln bildeten normale Epidermiszellen (Abb.23D-F). Die Wurzelhaarzellen ließen keinen Unterschied zum Wildtypen Col-0 erkennen.



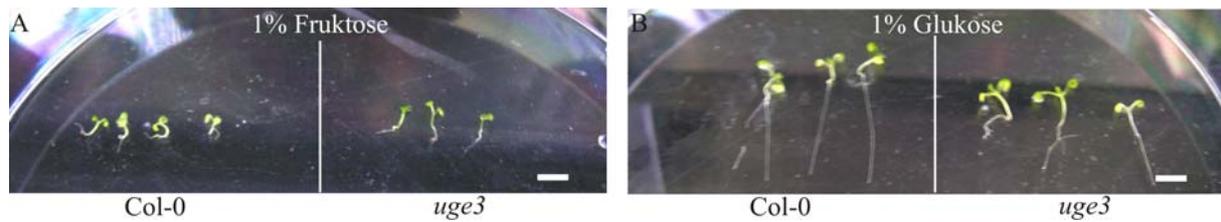
**Abb. 23** Mikroskopische Analyse 8 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Wurzeln bei einem Wachstum in 1% Saccharose. A-C: Col-0, D-F: *uge3-1* (Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu$ m).

Im Gegensatz dazu zeigten die Wurzeln des Wildtypen Col-0 und der Mutante *uge3-1*, bei einem Wachstum in MS-Flüssigmedium ohne Saccharose einen identischen Wurzelphänotypen (Abb.24).



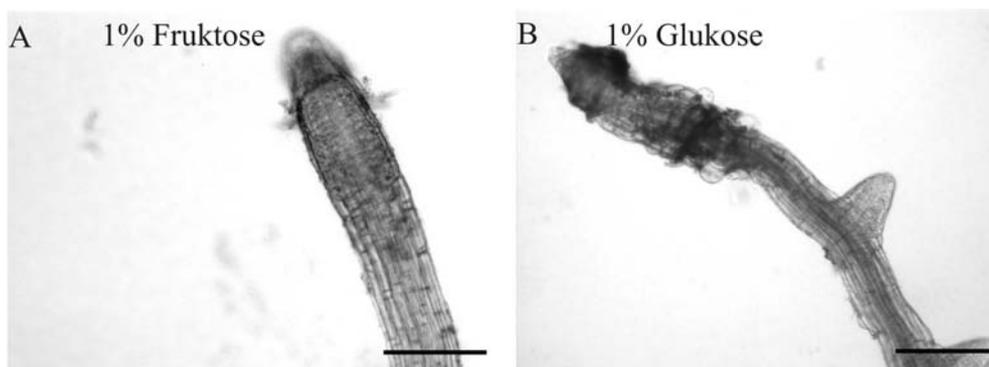
**Abb. 24** Mikroskopische Analyse 8 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Wurzeln bei einem Wachstum in 0% Saccharose. (A) Col-0, (B) *uge3-1* (Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu$ m).

Da *uge3-1* nicht nur auf Saccharose, sondern auch auf Glukose und Fruktose ein signifikant verkürztes Wurzelwachstum aufwies, wurden auch die Wurzelzellen der in Glukose und Fruktose gewachsenen Pflanzen untersucht. *uge3-1* Mutante und Wildtypen Col-0 wuchsen im MS-Flüssigmedium mit 1% Fruktose nur in geringem Maße (Abb.25A), während das Wachstum in 1% Glukose eine Verkürzung der Wurzel von *uge3-1* zeigte, jedoch keine so ausgeprägte Seitenwurzelbildung wie in saccharosehaltigem Medium (Abb.25B).



**Abb. 25** Phänotypische Bestimmung 8 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Wurzeln bei einem Wachstum in Fruktose und Glukose. Als Zuckerquelle dienten (A) 1% Fruktose, (B) 1% Glukose, Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, Skala = 5 mm.

Die mikroskopische Analyse der Wurzeln zeigte, dass bei einem Wachstum in Fruktose die Wurzelzellen der *uge3-1* denen des Wildtyps glichen (Abb.26A), während die Wurzeln, die in Glukose wuchsen erneut kugelförmigen Epidermiszellen bildeten (Abb.26B). Es kann also gefolgert werden, dass sowohl Glukose, als auch Fruktose zu einer Verkürzung des Wurzelwachstums führen, während nur Glukose die Bildung kugelförmiger Epidermiszellen in der Hauptwurzel hervorruft.

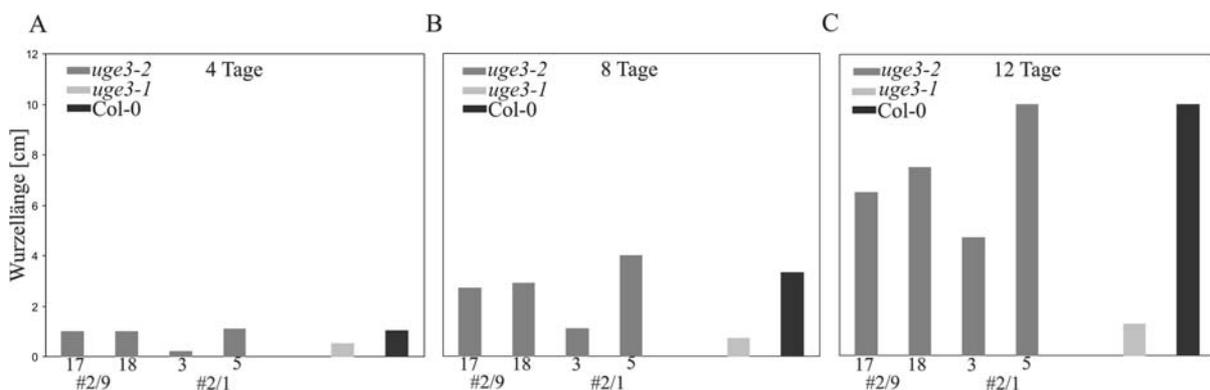


**Abb. 26** Mikroskopische Analyse 8 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Wurzeln bei einem Wachstum in Fruktose und Glukose. Als Zuckerquelle dienten (A) 1% Fruktose und (B) 1% Glukose. Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu$ m.

Homozygote Pflanzen einer weiteren *uge3* T-DNA Line der GABI-KAT Kollektion (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-KAT/>) konnte durch PCR Analyse unter der Verwendung der genspezifischen Primer Screen3Prom\_for und Screen3Prom\_rev, sowie des Leftborder-Primers 5 isoliert werden. Die Insertion der T-DNA befand sich upstream des ATG des *UGE3* Gens in Position -277 (Abb.18). Die Anzahl der T-DNA Insertion wurde anhand des Chi<sup>2</sup>-Testes geprüft. Der Chi<sup>2</sup>-Test untersucht die Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit. 966 Nachkommen der heterozygoten Linie *uge3-2#2* der F1-Generation, wurden auf MS-Festmedium durch das Antibiotikum Sulfadiazin (50  $\mu$ g/ml) für 11 Tage bei permanentem Licht gezogen. Das Verhältnis der abgestorbenen Pflanzen zu denen, die eine Resistenz aufwiesen wurde bestimmt. Das erwartete Spaltungsverhältnis überlebender zu tote Pflanzen würde einem 3:1 Verhältnis entsprechen. Im Falle der

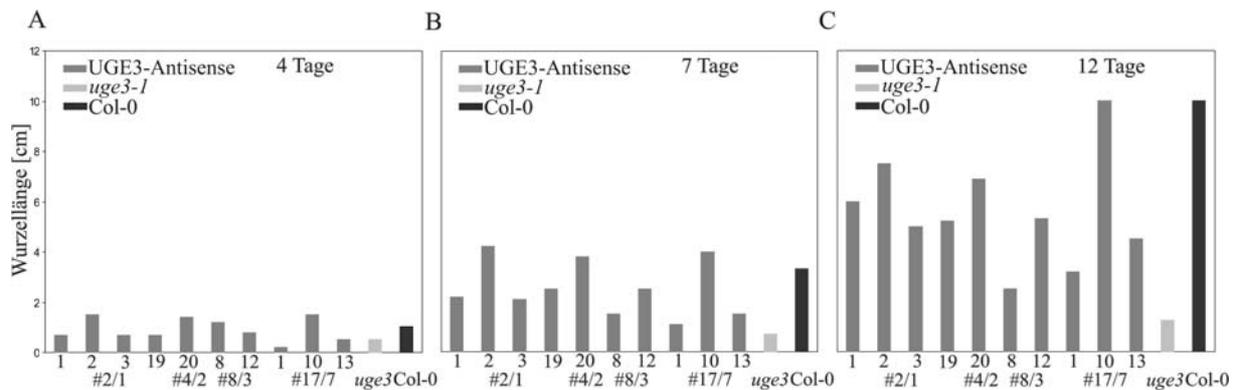
untersuchten 966 Pflanzen, würde sich daraus erwartetes Verhältnis von 725,5: 241,5 ergeben. Tatsächlich wurde ein Verhältnis von 805: 161 gezählt (Anhang Tab.XV). Es ergab sich ein  $\chi^2 = 35,77$ . Bei der Annahme, dass es sich bei *uge3-2#2* um T-DNA Mutante mit nur einer Insertion handelte, erhielt man einen Freiheitsgrad  $k-1 = 1$ . Daraus ergab sich ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ , also ist  $\chi^2 = 35,77 > \chi^2_{(k-1)(1-\alpha)} = \chi^2_{(1)(0,95)} = 3,84$ . Da  $35,77 > 3,84$  ist, trifft die Nullhypothese nicht zu, d.h. die reale Verteilung entspricht nicht dem Erwartungswert. Daraus lässt sich folgern, dass wahrscheinlich mehr als eine T-DNA Insertion in *uge3-2#2* vorhanden ist.

Für die Mutante *uge3-2* erfolgten die gleichen Wachstumsexperimente auf MS-Festmedium (0,5% Gelrite, 1% Saccharose) wie zuvor für die Mutante *uge3-1*. Auch hier wurden die Wurzellängen nach 4, 8 und 12 Tagen gemessen. Die aus dem PCR Screen hervorgegangenen Linien homozygoten Linien *uge3-2#2/1* und *#2/9* der F2-Generation wurden in ihrer F3-Generation mit dem Wildtypen Col-0 und der Mutante *uge3-1* verglichen. Für die Linie *#2/9,17* und *#2/9,18* ergab sich kein signifikanten Unterschiede im Wurzelwachstum zu Col-0 (Abb.27). Für die Linie *#2/1, 3* ergab sich ein 5% signifikanter Unterschied zum Wildtypen Col-0, aber auch ein 1%iger Unterschied zur Mutante *uge3-1*. Die Wurzeln dieser Pflanze wiesen also ein verkürztes Wachstum zum Wildtypen Col-0 auf, aber gleichzeitig ein signifikant längeres zu *uge3-1*. *#2/1,5* zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied zu Col-0. Möglicherweise führte die Insertion im Promotor des *UGE3* Gens nicht zu einem völligen Verlustes der *UGE3* Funktion. Eine genaue Überprüfung der Transkriptmengen in *uge3-2* hätte erfolgen müssen, wie auch eine Überprüfung der T-DNA Insertionen durch Southern Blot. Beide Experimente wurden aber aufgrund der fehlenden phänotypischen Übereinstimmung zu *uge3-1* nicht durchgeführt.



**Abb. 27** Wurzellängenanalyse der homozygoten F3 Generation der *uge3-2* Mutante im Vergleich zur Mutante *uge3-1* und zum Wildtypen Col-0 bei einem Wachstum auf 1% Saccharose. (A) 4 Tage, (B) 8 Tage, (C) 12 Tage Wurzelwachstum nach Aussaat. Wachstumsbedingung: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), 1% Saccharose, permanentes Licht.

Weiterhin wurde ein 2.080 bp großes Fragment des *UGE3*-Gens, das ORF, 5'UTR und 3'UTR beinhaltet, in Antisense Orientierung durch die Primer Antis-03\_for und Antis-03\_rev per PCR-Amplifikation unter Verwendung der DNA des BAC F16M19 isoliert und amplifiziert. Nach einer Zwischenklonierung in dem Vektor pCRII-TOPO und Überprüfung der Sequenz durch Sequenzierung, wurde der *UGE3*-Antisense Konstrukt durch die Schnittstellen SmaI, SalI in den Vektor pBinAR kloniert. Das erzielte Vektorkonstrukt wurde durch *Agrobakterien*-Transformation in *A.thaliana* gebracht. Die Isolation transgener Pflanzen nach der *Agrobakterien*-Transformation erfolgte auf Kanamycin. Vier Linien der F2-Generation (#2/1, #4/2, #8/3, #17/7) wurden zur Analyse der Wurzellänge in ihrer F3-Generation gewählt und mit dem Wildtypen Col-0 und der Mutante *uge3-1* verglichen. Es zeigten sich jedoch keine so starke Reduktion im Wurzelwachstum in den *UGE3*-Antisense Linien wie in *uge3-1* (Abb.28).



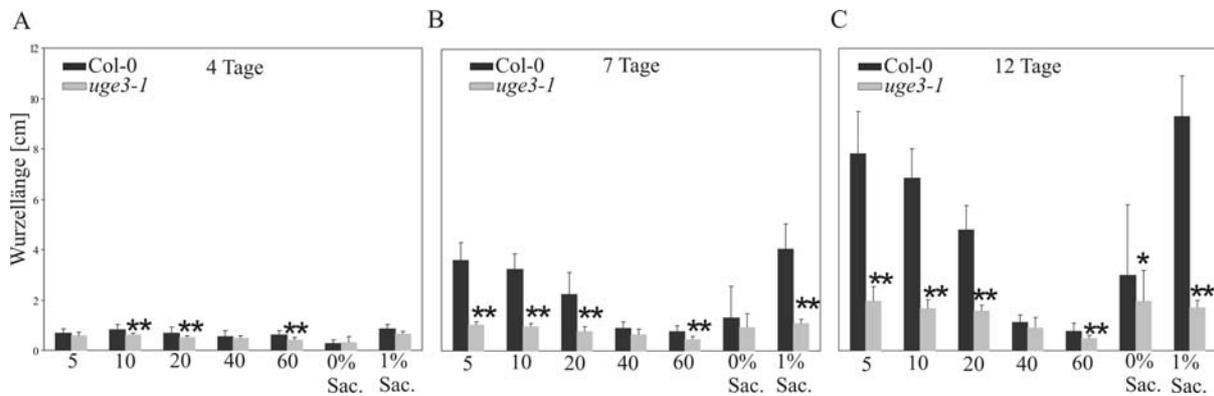
**Abb. 28** Wurzellängenanalyse der *UGE3*-Antisense Linien der F3 Generation im Vergleich zur *uge3-1* Mutante und zum Wildtypen Col-0 bei einem Wachstum auf 1% Saccharose. (A) 4 Tage, (B) 7 Tage, (C) 12 Tage Wurzelwachstum nach Aussaat. Wachstumsbedingung: MS- Festmedium (0,5% Gelrite), 1% Saccharose, permanentes Licht.

Alle untersuchten Pflanzen wurden nur phänotypisch untersucht. Um eine Reduktion des Transkripts nachweisen zu können, wäre der eine Analyse durch RT-PCR oder Northern Blot benötigt worden. Da jedoch auch die Pflanzen der *UGE3*-Antisense-Linien phänotypisch nicht denen der *uge3-1* Mutante entsprachen, wurden auch diese nicht näher untersucht.

### Die chemische Komplementation der *uge3-1* Mutante

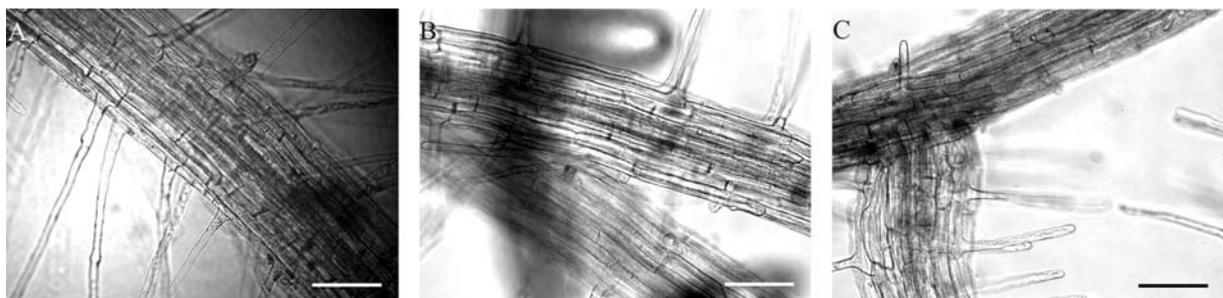
Da UDP-Glukose nicht nur durch die UGE-Epimerasereaktion zu UDP-Galaktose katalysiert wird, sondern UDP-Galaktose auch durch die Aufnahmen freier Galaktose gebildet werden kann, wurden zur Komplementation des *uge3-1* Phänotyps dem Wachstumsmedium verschiedene Konzentrationen an D-Galaktose zugesetzt. Als Kontrolle diente 0% Saccharose und 1% Saccharose. Die *uge3-1* Wurzellängen wurden nach 4, 7 und 12 Tagen gemessen und

mit denen des Wildtypen Col-0 verglichen. Zu keinem Zeitpunkt und mit keiner der gewählten Galaktosekonzentrationen war es möglich die Verkürzung der Wurzel in *uge3-1* zu komplementieren (Abb.29). Bei höheren Galaktosekonzentrationen wirkte Galaktose auf den auf alle untersuchten Pflanzen toxisch.



**Abb. 29 Komplementationsanalyse durch D-Galaktose der *uge3-1* Mutante im Vergleich zum Wildtypen Col-0 bei einem Wachstum auf MS-Festmedium (Gelrite).** (A) 4 Tage, (B) 7 Tage, (C) 12 Tage Wurzelwachstum nach Aussaat. Als Zuckerquelle diente 1% Saccharose, zur Komplementation wurden 5–60 mM D-Galaktose (5-60 Sac.) dem Medium beigesetzt. Als Kontrolle dienten 0% (0% Sac.) und 1% Saccharose (1% Sac.). Wachstumsbedingung: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), permanentes Licht. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

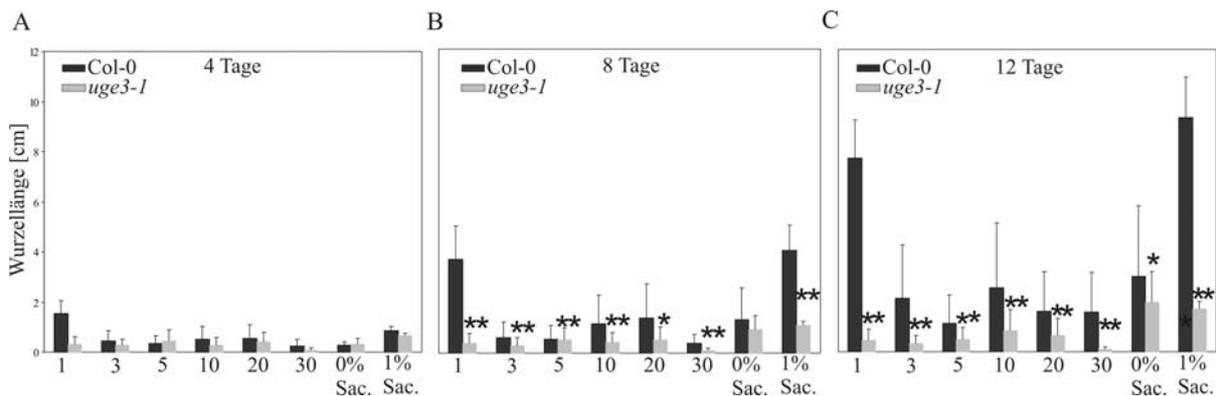
Die mikroskopische Analyse, der *uge3-1* Wurzeln im MS-Flüssigmedium, dem 1% Saccharose als Zuckerquelle und 40 mM D-Galaktose zur Komplementation beigesetzt wurden, ergab eine vollständige Komplementation des kugelförmigen Epidermiszellen-Phänotyps. Die Epidermiszellen der *uge3-1* Mutante glichen denen des Wildtypen (Abb.30).



**Abb. 30 Mikroskopische Analyse 8 Tage alter *uge3-1* und Col-0 Wurzeln nach Wachstum in 1% Saccharose und 40mM Galaktose.** (A) Col-0, (B) und (C) *uge3-1*. Als Zuckerquelle dienten 1% Saccharose, zur Komplementation wurden 40 mM D-Galaktose beigesetzt. Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu\text{m}$ .

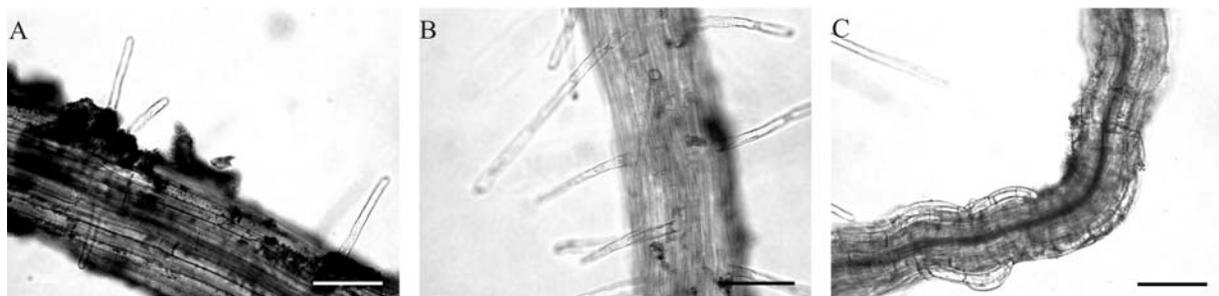
Prof. Wolf-Dieter Reiter (University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA) konnte in noch nicht veröffentlichten Expressionsexperimenten von *UGE3* in *Pichia pastoris* zeigen, dass *UGE3* nicht nur die Epimerasereaktion von UDP-D-Glukose in UDP-D-Galaktose katalysiert, sondern auch die Epimerasereaktion UDP-D-Xylose zu UDP-L-Arabinose katalysieren kann. Daher könnte es sein, dass der Phänotyp durch ein Fehlen dieser Reaktion

hervorgerufen werden könnte. Auch hier ist es möglich, durch die Zugabe von externer L-Arabinose eine Aufnahme in *Arabidopsis* zu erzielen. Zur Komplementationsanalyse wurden Samen der *uge3-1* Mutante zur Bestimmung der Wurzellängen auf MS-Festmedium (0,5% Gelrite), dem als Zuckerquelle 1% Saccharose und zur Komplementation 1-30 mM L-Arabinose zugegeben wurden, ausgelegt. Die *uge3-1* Wurzellängen wurden auch hier nach 4, 8 und 12 Tagen gemessen und mit denen des Wildtypen Col-0 verglichen. Zu keinem Zeitpunkt und mit keiner der gewählten Arabinosekonzentrationen war es möglich die Verkürzung der Wurzel in *uge3-1* zu komplementieren (Abb.31).



**Abb. 31 Komplementationsanalyse durch L-Arabinose der *uge3-1* Mutante im Vergleich zum Wildtypen Col-0.** (A) 4 Tage, (B) 8 Tage, (C) 12 Tage Wurzelwachstum nach Aussaat. Als Zuckerquelle diente 1% Saccharose, zur Komplementation wurden dem Medium 1–30 mM L-Arabinose (1-30) beigesetzt. Als Kontrolle dienten 0% (0% Sac.) und 1% Saccharose (1% Sac.). Wachstumsbedingung: MS-Festmedium, permanentes Licht. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

Die mikroskopische Analyse, der *uge3-1* Wurzeln im MS-Flüssigmedium, dem 1% Saccharose als Zuckerquelle und 5 mM L-Arabinose zur Komplementation beigesetzt wurden, ergab eine Komplementation des kugelförmigen Epidermiszellen-Phänotyps (Abb.32). Es ließ sich durch die Zugabe externer Arabinose wie bei Galaktose nur die Form der Epidermiszellen komplementieren.

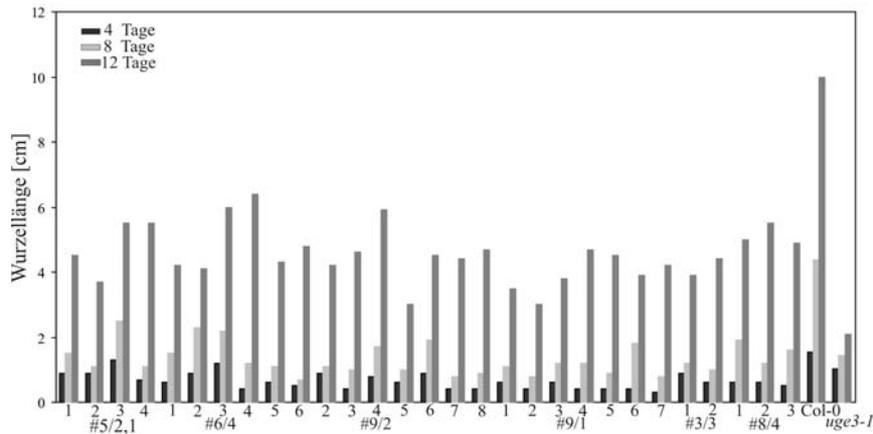


**Abb. 32 Mikroskopische Analyse 8 Tage alter *uge3-1* Wurzeln nach Wachstum in 1% Saccharose und 5 mM Arabinose.** (A) Col-0, (B) und (C) *uge3-1*. Als Zuckerquelle dienten 1% Saccharose, zur Komplementation wurden 5 mM L-Arabinose beigesetzt. Skala = 200  $\mu$ m.

Wie in der Literatur bekannte, kann Mangel an Phosphat zu einer Verkürzung des Wurzelwachstums führen (Varadarajan *et al.*, 2002; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Durch die externe Zugabe von Phosphat sollte getestet werden, ob Phosphat zur Komplementation des Wurzelphänotyps in *uge3-1* führen würde. *uge3-1* wurde in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  für 8 Tage in MS-Flüssigmedium, dem als Zuckerquelle 1% Saccharose zugesetzt wurde inkubiert. Es zeigt sich keine Komplementation der Wurzellänge und auch die kugelartige Form der Epidermiszellen konnte nicht vollständig komplementiert werden (Anhang Abb.II).

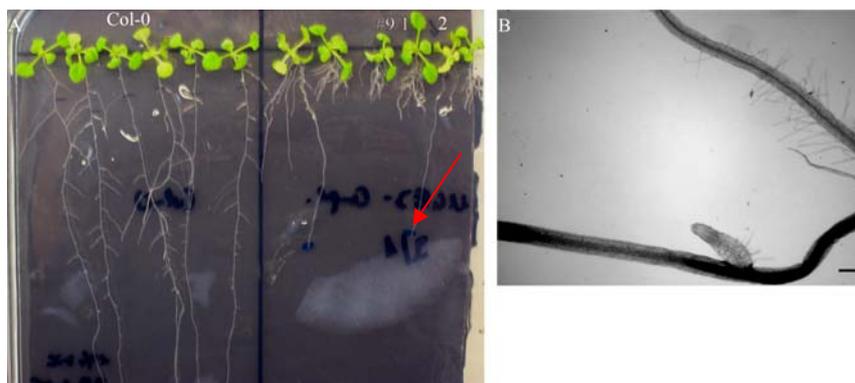
### **Die genetische Komplementation der *uge3-1* Mutante**

Zur genetischen Komplementation der *uge3-1* Mutante wurde ein 4.419 bp großes genomisches Fragment kloniert. Diese setzte sich aus drei Komponenten zusammen, dem 2.450 bp großen Promotor Fragment, das sich upstream des ATG des *UGE3*-Gens befindet, dem 1.826 bp großen ORF des *UGE3*-Gens und einer 143 bp großen Region, die sich downstream des Stop-Codons befindet. Die PCR-Amplifikation erfolgte in zwei Fragmenten unter Verwendung der DNA des BAC F16M19. Für die Amplifikation des Fragments 1 wurden die Primer UGCOM-1\_for und UGCOM-2\_rev, für Fragment 2 die Primer UGCOM-3\_for und UGCOM-4\_rev verwendet. Beide Fragmente wurden im Vektor pCRII-TOPO zwischenkloniert. Beide Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft. Fragment 1 wurde mit KpnI, BglII, Fragment 2 mit BglII, XhoI aus dem Vektor pCRII-TOPO geschnitten. Fragment 1 und 2 wurden zusammen in den Vektor pBluescript II KS(+) durch die Restriktionsseiten KpnI und XhoI ligiert. Das komplette Fragment 1 und 2 wurde mit SallI und KpnI aus dem Vektor pBluescript II KS(+) geschnitten und in Vektor pBinAR-Hyg mit Hilfe eines Linkers (linker-1\_for und linker-2\_rev) durch die Schnittstellen SallI und EcoRI ligiert. Aus dem Vektor pBinAR-Hyg wurde zuvor der 35S-Promotor durch den Verdau mit EcoRI und SallI entfernt. Das erzielte Vektorkonstrukt wurde durch Agrobakterien-Transformation in die *uge3-1* Mutante gebracht. Alle Konstrukte wurden vor der Transformation in *A.thaliana* sequenziert. Transgene Pflanzen wurden durch Selektion auf Kanamycin (T-DNA der *uge3-1* Mutante) und Hygromycin (durch pBinAR-Hyg) isoliert. Für 6 Linen (5/2, 9/2, 9/1, 3/3, 8/4) der F2 Generation wurden die Wurzellängen in der F3-Generation nach 4, 8 und 12 Tagen bestimmt. Die Komplementation der Wurzellängen erfolgte zu ca. 50% (Abb.33). Alle untersuchten Wurzeln entsprachen nicht der Länge des Wildtypen Col-0.



**Abb. 33** Wurzellängenanalyse von 6 Linien der komplementierten *UGE3:uge3-1* Mutante im Vergleich zum Wildtypen Col-0 und der *uge3-1* Mutante auf 1% Saccharose. Das Wurzelwachstum wurde nach 4, 8 und 12 Tagen gemessen. Wachstumsbedingung: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), 1% Saccharose, permanentes Licht.

Als Beispiel der teilkomplementierten *UGE3:uge3-1* Mutante diene die Linie #9/1,2. Im Wurzellängenwachstum erreicht sie ca. 50% der Länge des Wildtyps Col-0 (Abb.34A). Die mikroskopische Analyse der Wurzeln der Linie #9/1,2 ergab eine vollständige Komplementierung des deformierten Epidermiszellen-Phänotyps (Abb.34B). Ein Nachweis der vollständigen Komplementation des *uge3-1* Gendefekts, hätte durch Northern Blot Analyse bestätigt werden müssen. Da es jedoch nicht zu einer vollständigen Komplementation des Phänotyps der *uge3-1* Mutante kam, wurde die Komplementation nicht weiter untersucht.



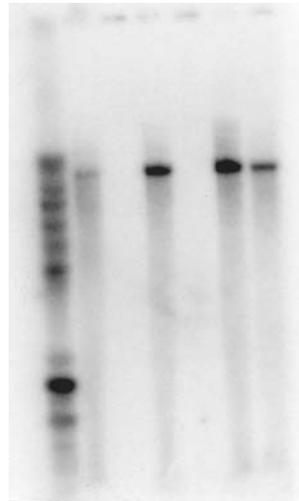
**Abb. 34** Phänotypische Analyse 12 Tage alter Wurzeln der teilkomplementierten *UGE3:uge3-1* Pflanzen im Vergleich zum Wildtypen Col-0. (A) Die Linie #9/1(1-6) wurde mit dem Wildtypen Col-0 auf MS-Festmedium (0,5% Gelrite, 1% Saccharose) bei permanentem Licht gezogen. (B) Mikroskopische Analyse der Wurzel der Pflanze #9/2,2 (Skala= 400µm).

Es lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass chemische und genetische Komplementation nur zu einer Teilkomplementation des Wurzelphänotyps führen. Es konnte weder eine zweite T-DNA Insertionslinie noch Antisense-Linie in *UGE3* gefunden werden, die dem Phänotyp der *uge3-1* Linie entsprach.

### 3.2.2 *UGE4*, ein weiteres Mitglied der *UGE*-Genfamilie

Zur weiteren Analyse der *UGE*-Genfamilie wurden *UGE4* aufgrund des schon in der Literatur bekannten, auffallenden ähnlichen Phänotyps zu *uge3-1* gewählt (Seifert *et al.*, 2002). G.J. Seifert und Kollegen zeigten, dass *uge4* über eine verkürztes Wurzelwachstum verfügte und gleichzeitig die Epidermiszellen aller Wurzeln kugelförmig waren.

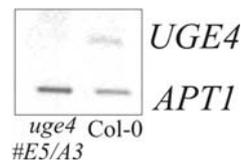
Durch PCR Amplifikation der genspezifischen Primer 10 und 11 und des LB-Primer 5 konnte eine homozygote Line der F2-Generatation aus der GABI-KAT Kollektion mit T-DNA Insertion im Gen *UGE4* isoliert werden (*uge4#E5/A3*). Eine einfache Insertion der T-DNA wurde anhand der Southern-Blot Analyse (Abb.35) nachgewiesen. Zur Amplifikation der verwendeten Sonde wurden die Primer Sul\_for und rev, sowie genomische DNA der Mutante *uge4#E5/A3* verwendet.



**Abb. 35 Southern Blot Analyse der Mutante *uge4 #E5/A3*.** Die Southern Blot Analyse erfolgt mit Hilfe einer Sulfadiazin-Sonde. Die genomische DNA der *uge4#E5/A3* Pflanzen wurde mit HindIII verdaut. Die einfache Insertion der T-DNA ist anhand der einzelnen Bande erkennbar.

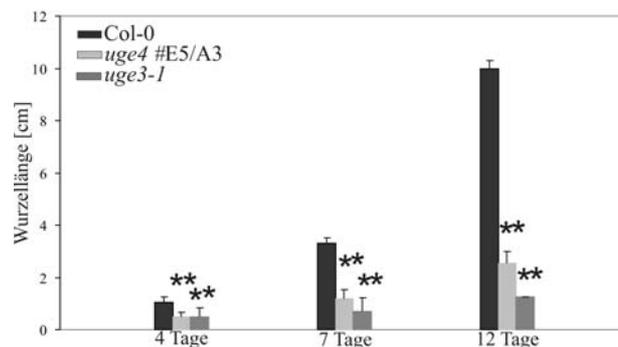
Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von nur einer T-DNA Insertion lieferte das Ergebnis des  $\chi^2$ -Testes. 1316 Nachkommen der heterozygoten Linie *uge4#E5* der F1-Generatation wurden auf MS-Festmedium durch das Antibiotikum Sulfadiazin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) für 11 Tage bei permanentem Licht gezogen. Das Verhältnis von abgestorbenen zu Sulfadiazin-resistenten Pflanzen wurde bestimmt. Dabei wurde ein Spaltungsverhältnis von 3:1 (überlebende: tote Pflanzen) erwartet. Bei 1316 Pflanzen würde sich ein erwartete Spaltungsverhältnis von 987: 329 ergeben. Tatsächlich wurde ein Verhältnis von 976: 340 bestimmt (Anhang Tab.XVI). Es ergab sich ein  $\chi^2 = 0,49$ . Bei der Annahme, dass es sich bei den *uge4* (Line #E5) um T-DNA Mutanten mit nur einer Insertion handelte, erhielt man einen Freiheitsgrad  $k-1 = 1$ . Daraus ergab sich ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ , also ist  $\chi^2 = 0,49 < \chi^2_{(k-1)(1-\alpha)} = \chi^2_{(1)(0,95)} = 3,84$ . Da  $3,84 > 0,49$  ist, trifft die Nullhypothese zu,

d.h. die reale Verteilung entspricht dem Erwartungswert. Daraus lässt sich folgern, dass nur eine T-DNA Insertion vorhanden ist. Der vollständige Verlust des Transkripts des *UGE4*-Gens in *uge4#E5/A3* konnte durch RT-PCR bestätigt (Abb.36). Zur Analyse des Transkripts wurde RNA aus 4 Wochen alten Pflanzen aus dem Gewächshaus isoliert und zur cDNA umgeschrieben. Der Nachweis des *UGE4* Transkripts erfolgt in der RT-PCR Analyse durch die *UGE4* genspezifischen Primer 10 und 11. Das Transkriptlevel des Housekeeping-Gens Adenosylphosphoribosyl-Transferase wurde durch die Primer RTApt1A und B nachgewiesen. Der vollständige Knockout konnte durch die Abwesenheit des *UGE4* Transkripts in *uge4* (Line #E5/A3) und Vorhandensein im Wildtypen Col-0 nachgewiesen werden. Die eingesetzten RNA-Mengen konnten durch gleiche Transkriptmengen im *APT1* Standardgens nachgewiesen werden.



**Abb. 36** RT-PCR des Gens *UGE4* in *uge4 #E5/A3* (Transkript abwesend) und Col-0 (volles Transkript). Als Standardgen wurde *APT1* verwendet.

*uge4* zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten auf 1% Saccharose wie *uge3-1* (Seifert *et al.*, 2002). *uge4#E5/A3* wurde für 12 Tage auf MS-Festmedium gezogen und die Wurzellängen mit denen der *uge3-1* Mutante verglichen. *uge4#E5/A3* zeigte nach 4 Tage 64%, nach 8 Tagen 55% und nach 12 Tagen 68% (68% vs 82% *uge3-1*) verkürzte Wurzeln im Vergleich zu Col-0 (Abb.37). *uge4#E5/A3* zeigt also einen nicht ganz so drastischen Phänotyp wie *uge3-1* hinsichtlich der gemessenen Wurzellängen.



**Abb. 37** Wurzellängenanalyse der *uge4#E5/A3* Mutante, im Vergleich zur *uge3-1* Mutante und zum Wildtypen Col-0 bei einem Wachstum auf 1% Saccharose. Wachstumsbedingungen: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), 1% Saccharose, permanentes Licht. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

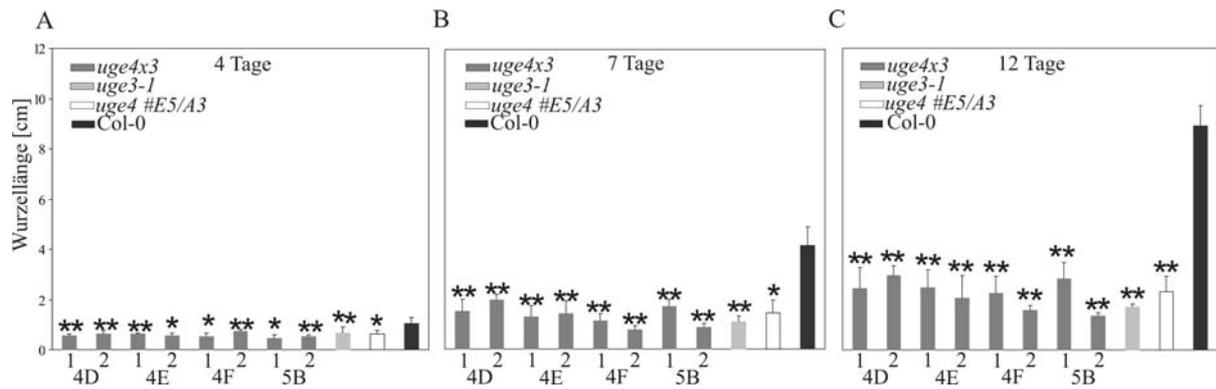
Die mikroskopische Untersuchung der Wurzeln der Linie *uge4#E5/A3* ergab eine starke kugelförmige Bildung der Wurzelhaarzellen (nicht wie in *uge3-1* der Nicht-Wurzelhaarzellen) (Abb.38).



**Abb. 38** Mikroskopische Analyse 8 Tage alter *uge4#E5/A3* Wurzeln nach Wachstum in 1% Saccharose. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu\text{m}$ .

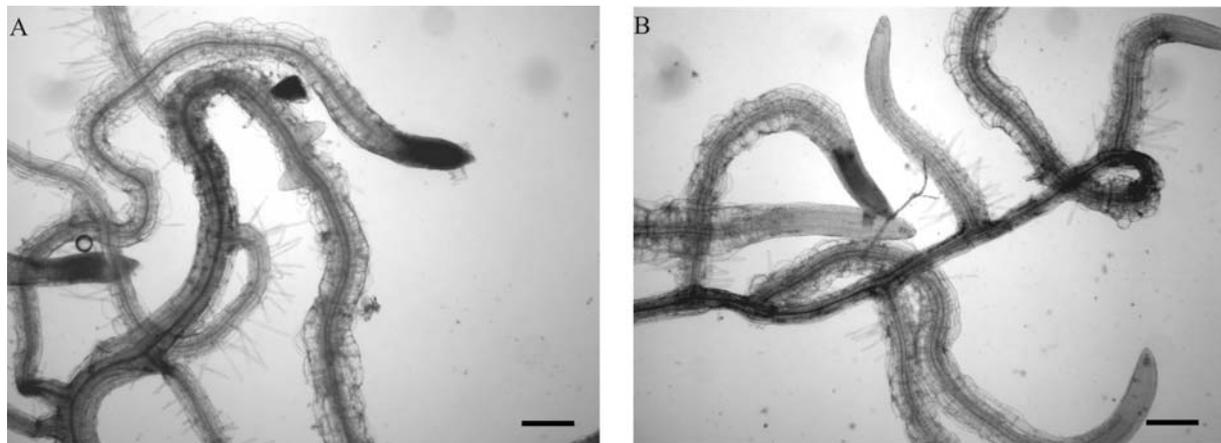
### 3.2.3 Kreuzung der Mutanten *uge4* und *uge3*

Die Linien *uge3-1* und *uge4#E5/A3* wurden aufgrund ihres ähnlichen Phänotyps miteinander gekreuzt, um mögliche Verstärkungen der Phänotypen in der Doppelmutante untersuchen zu können. Durch einen PCR-Screen mit den Primern START, STOP (*UGE3* genspezifische Primer) und LB (*UGE3* T-DNA Primer), sowie 10 und 11 (*UGE4* genspezifische Primer) und 5 (*UGE4* T-DNA Primer) wurde die Linie *uge4x3,8/2* der F1 Generation isoliert. Diese trug eine heterozygote T-DNA Insertion in den Genen *UGE3* und *UGE4*. Aus dieser Linie wurden in der nachfolgenden F2-Generation die homozygote Linien 8/2#2B, 5B, 4D, 4E und 4F isoliert. In der F3-Generation dieser Linien wurden die Wurzellängen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Wurzeln der F3-Generation der gekreuzten Linien durchschnittlich länger als die der elterlichen Linie *uge3-1* (als väterliche Linie) und kürzer als *uge4#E5/A3* (als mütterliche Linie) waren (Abb.39), während die Wurzellängen der F3-Generation im einzelnen betrachtet meist länger als beide elterlichen waren.



**Abb. 39** Wurzellängenanalyse homozygoter Linien der Kreuzung *uge4x3#8/2* in der F3-Generation im Vergleich zu den elterlichen Linien *uge3-1* und *uge4#E5/A3*, sowie dem Wildtyp Col-0 bei Wachstum auf 1% Saccharose. (A) 4 Tage, (B) 7 Tage, (C) 12 Tage Wurzelwachstum nach Aussaat. Wachstumsbedingungen: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), 1% Saccharose, permanentes Licht. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

Die mikroskopische Analyse der Wurzeln der gekreuzten Linien zeigte, dass nicht nur die Epidermiszellen der Hauptwurzel (wie in *uge3-1*), sondern auch die Epidermiszellen der Nebenwurzeln einen kugelförmigen Phänotyp aufwiesen. Der *uge3-1* Phänotyp wurde also hinsichtlich der Anzahl der kugelförmigen Epidermiszellen verstärkt, die nicht nur in der Hauptwurzel zu finden waren. Betrachtete man die Wurzelhaarzellen der Doppelmutante, so ließ sich keine Änderung zum Wildtypen Col-0 erkennen. Der Phänotyp der *uge4#E5/A3* Mutante wurde also in Bezug auf die Wurzelhaarzellen unterdrückt oder möglicherweise komplementiert (Abb.40).



**Abb. 40** Mikroskopische Analyse 8 Tage alter *uge4x3* Wurzeln der F3-Generation in 1% Saccharose. (A) *uge4x3* Line 8/2#2B8, (B) *uge4x3* Line 8/2#4E2. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu\text{m}$ .

Um einen Aufschluss über das Kopplungsverhalten zwischen Genotyp und Phänotyp der gekreuzten *uge4x3* Linien zu erhalten, wurde eine Segregationsanalyse der F2 Generation der heterozygoten Linie *uge4x3#8/2* durchgeführt. 100 Nachkommen der Linie *uge4x3#8/2* wurden in ihrer Wurzellänge bestimmt. Zur phänotypischen Analyse wurden alle

Wurzellängen mit den Längen des Wildtypen, Mutanten der *uge3-1* und *uge4#E5/A3*, sowie der Doppelmutante *uge4x3#8/2,4E* verglichen. Es ergab sich ein phänotypisches Verteilungsverhältnis von 59: 16: 8: 14 (WT: *uge3-1*: *uge4*: Doppelmutante), wobei 3 Pflanzen nicht keimten (Tab.6). Bei 100 Pflanzen hätte sich ein Spaltungsverhältnis von 56,25: 18,75: 18,75: 6,25 ergeben müssen.

**Tab. 6 Anzahl der Pflanzen, die phänotypisch der Wurzellänge des WT, der Mutanten *uge3-1* und *uge4#E5/A3* oder der Doppelmutante *uge4x3#8/2,4E* entsprachen (O).** Anzahl der Pflanzen mit erwarteter Wurzellänge entsprechend der des WT, der Mutanten *uge3-1* und *uge4#E5/A3* oder der Doppelmutante *uge4x3#8/2,4* (E). Wachstum auf 1% Saccharose (O: observed; E: expected).

Tatsächlicher Phänotyp (O)	Erwarteter Phänotyp (E)	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
14	6,25	7,75	60,06	9,61
16	18,75	-2,75	7,5625	0,403
8	18,75	-10,75	115,56	6,16
59	56,25	2,75	7,56	0,134

Daraus ergibt sich ein  $\chi^2 = 9,61 + 0,403 + 6,16 + 0,134 = 16,487$ . Bei der Annahme, dass es sich bei den *uge3-1* und *uge4#E5/A3* um T-DNA Mutanten mit nur einer Insertion handelte, erhielt man einen Freiheitsgrad  $k-1 = 3$ . Daraus ergab sich ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ , also ist  $\chi^2 = 16,487 > \chi^2_{(k-1)(1-\alpha)} = \chi^2_{(3)(0,95)} = 7,82$ . Da  $16,487 > 7,82$  trifft die Nullhypothese nicht zu, d.h. die reale Verteilung entspricht nicht dem Erwartungswert. Dies bedeutet, dass andere Faktoren als die T-DNA Insertionen in *UGE3* und *UGE4* zum Phänotyp der Doppelmutante beitragen.

Neben der phänotypischen Analyse der Doppelmutante wurde mit der DNA der zuvor untersuchten Pflanzen ein PCR-Screen mit Hilfe der Primer START, STOP (*UGE3* genspezifische Primer) und LB (*UGE3* T-DNA Primer), sowie 10 und 11 (*UGE4* genspezifische Primer) und 5 (*UGE4* T-DNA Primer) durchgeführt. Nach Analyse der DNA zeigte sich ein Verteilungsverhältnis von 51: 38: 7: 0: 0 (heterozygote Pflanzen: *uge3-1*: *uge4*: WT: Doppelmutante), wobei neben den nichtgekeimten Pflanzen in einer Probe kein PCR-Ergebnis erzielt wurde (Tab.7). Bei 100 Pflanzen hätte sich ein Spaltungsverhältnis von 50: 18,75: 18,75: 6,25 : 6,25 ergeben müssen Als heterozygoten wurde Pflanzen mit nur einer T-DNA Insertion in *UGE3* und/ oder *UGE4* bezeichnet.

**Tab. 7** Anzahl der Pflanzen, die genotypisch dem WT, den heterozygoten Pflanzen, den Mutanten *uge3-1* und *uge4#E5/A3* oder der Doppelmutante *uge4x3#8/2,4E* entsprachen (O). Anzahl der Pflanzen mit erwartetem Genotyp entsprechend dem des WT, den heterozygoten Pflanzen, den Mutanten *uge3-1* und *uge4#E5/A3* oder der Doppelmutante *uge4x3#8/2,4* (E) (O: observed; E: expected).

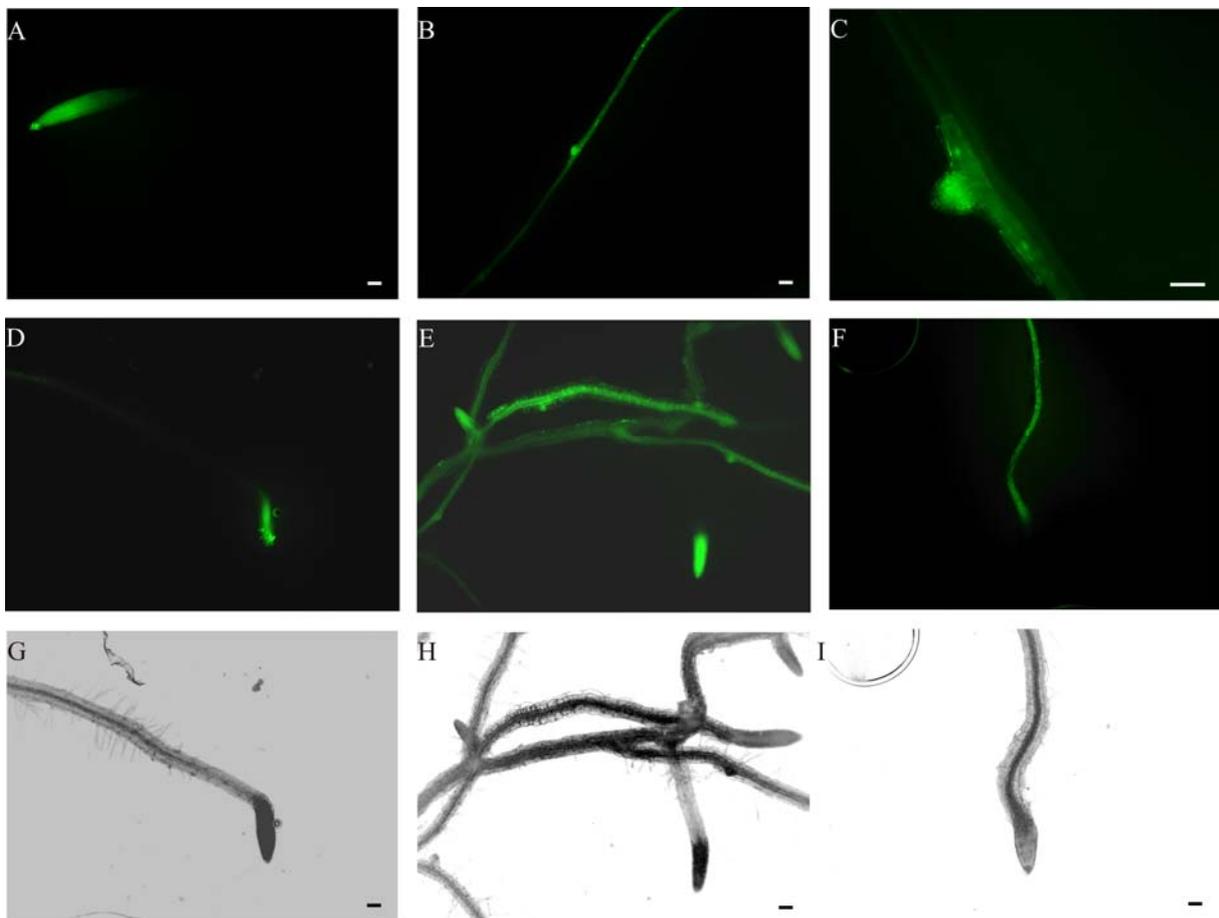
Tatsächlicher Genotyp (O)	Erwarteter Genotyp (E)	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
0	6,25	-6,25	39,06	6,25
0	6,25	-6,25	39,06	6,25
38	18,75	19,25	370,56	19,76
7	18,75	-11,75	138,06	7,36
51	50	1	1	0,02

Daraus ergab sich ein  $\chi^2 = 6,25 + 6,25 + 19,76 + 7,36 + 0,02 = 39,64$ . Bei gleichem Freiheitsgrad  $k-1 = 3$  ergab sich ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,95$ , also ist  $\chi^2 = 39,64 > \chi^2_{(k-1)(1-\alpha)} = \chi^2_{(3)(0,95)} = 7,82$ . Da  $39,64 > 7,82$  trifft auch hier die Nullhypothese nicht zu. Betrachtet man Genotyp und Phänotyp zusammen (Anhang Tab.XVII), so zeigte sich, dass insgesamt 59 Pflanzen phänotypisch dem Wildtypen entsprachen. 27 dieser Pflanzen trugen eine heterozygote T-DNA Insertion in *UGE3* und in *UGE4*. 1 Pflanze trug das *UGE3*-Wildtypgen und eine heterozygote T-DNA Insertion in *UGE4*. 7 Pflanzen trugen eine homozygote T-DNA Insertion in *UGE3* und eine heterozygote in *UGE4*. Die restlichen 24 hingegen zeigten in *UGE3* eine homozygote T-DNA Insertion und in *UGE4* keine T-DNA Insertion. Das verkürzte Wurzelwachstum der *uge3-1* Mutante wurde also nicht durch die T-DNA Insertion im *UGE3*-Gen hervorgerufen. Auch zeigte sich bei den Pflanzen, die einen der *uge3-1* Mutante entsprechenden Phänotyp aufwiesen (insgesamt 16), dass 8 dieser Pflanzen im PCR-Screen eine heterozygote Insertion in *UGE3* und *UGE4*, sowie 2 Pflanzen eine heterozygote Insertion in *UGE4* und keine in *UGE3* trugen. Nur 6 Pflanzen zeigten die erwartete homozygote T-DNA Insertion in *UGE3* und heterozygote in *UGE4*. Die phänotypische Bestimmung der Doppelmutanten erwies sich jedoch als schwierig, da die Wurzellängen denen der *uge4#E5/A3* Mutante ähnelten und könnte so zu falschen Zuordnungen im phänotypischen Screen geführt haben, könnten aber auch ein weiterer Beweis einer weiteren unabhängigen Mutation sein, da eine phänotypische Identifikation der Doppelmutante möglich war, während der genotypische Beweis nicht erbracht werden konnte.

### 3.2.4 Analyse der Wurzelzellen

#### Untersuchung der Wurzelspitzen

Um eine Erklärung für das verkürzte Wurzelwachstum und die kugelartige Bildung der Epidermiszellen in *uge3-1* zu erhalten, wurden die Wurzelzellen 8 Tage alter *uge3-1* Pflanzen in Fluoreszindiacetat (FDA) inkubiert. Durch FDA lassen sich Schäden der Plasmamembranen und tote Zellen nachweisen. FDA kann in die Zelle eindringen und wird dort zu freiem Fluoreszin und Fluoreszinacetat hydrolysiert. Das in der Zelle befindliche Fluoreszin kann nicht mehr über die Membran aus der Zelle gelangen. Ist die Zelle intakt, so bleibt das Fluoreszin in der Zelle. Intakte Zelle können anhand der Fluoreszenz nachgewiesen werden, wohingegen beschädigte oder tote Zelle keine Fluoreszenz aufweisen (Abb.41).



**Abb. 41 Inkubation 8 Tage alter Wurzeln in Fluoreszindiacetat (FDA).** (A) Col-0 Wurzelspitze, (B) weiterer Verlauf der Col-0 Wurzel oberhalb der Wurzelspitze, (C) Bildung einer Seitenwurzel in Col-0, (D) *uge3-1* Seitenwurzel, (E) *uge3-1* Haupt- und Seitenwurzel, (F) *uge3-1* Hauptwurzel mit kugelförmigen Epidermiszellen, G-I: Direktdarstellung der Bilder D-F. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala = 200  $\mu$ m.

In den Wurzeln der Col-0 Pflanzen ließen sich anhand einer starken Fluoreszenz intakte Zelle in den Wurzelspitzen (Abb.41A) und durch schwächere Fluoreszenz im weiteren Verlauf der Wurzel feststellen (Abb.41B und Abb.41C). Ein gleiches Fluoreszenz-Muster war in den

Seitenwurzeln der *uge3-1* Mutante sichtbar, die über einen wildtypartigen Phänotyp verfügten (Abb.41D). Die deformierten, kugelförmigen Wurzelzellen der Hauptwurzeln der *uge3-1* Mutante ließen im Vergleich zu den Seitenwurzeln keine Fluoreszenz in den Wurzelspitzen erkennen (Abb.41E, Abb.41F). Die Wurzelspitzen der Hauptwurzel der *uge3-1* Mutante bestehen also aus totem oder zumindest permeablem Gewebe. Eine Entwicklung der Hauptwurzel wie im Wildtypen scheint also aufgrund der toten Wurzelspitze nicht möglich und würde das verkürzte Wurzelwachstum erklären.

### 3.2.5 Analyse der Zellwand

Aufgrund des starken Phänotyps der *uge3-1* Mutante wurden verschiedene Bestandteile der Zellwand von Sprossen und Wurzeln analysiert, um eine mögliche Veränderung der Zellwand-Komponenten feststellen zu können. Neben der Markierung der Zellwandzucker durch Antikörper, wurde der Gehalt an kristalliner Zellulose und Pektinen durch kolorimetrische Analysen untersucht. Die Analyse der Monosaccharide der Zellwand erfolgte durch die Auftrennung in der Gas-Chromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie (GC-MS). Die Xyloglukane, als Bestandteil der Hemizellulosen wurden per Massenspektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF)) untersucht.

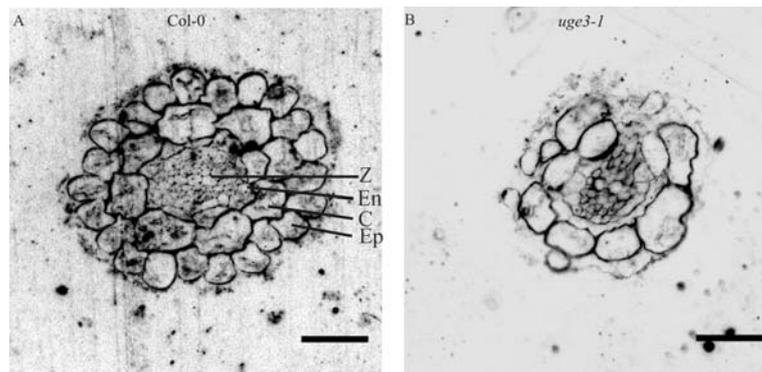
#### Antikörperlabeling

Um einen genaueren Einblick in den Aufbau der Zellwände der *uge3-1* Wurzeln zu erhalten, wurden 1  $\mu\text{m}$  dünne Wurzelschnitte angefertigt. Die Querschnitte der *uge3-1* Mutante beschränken sich nur auf die Regionen der kugelförmigen Wurzelzellen (Abb.42). Alle Wurzelschnitte wurden aus 8 Tage alten Wurzeln angefertigt, die in MS-Flüssigkultur bei permanentem Licht wuchsen.



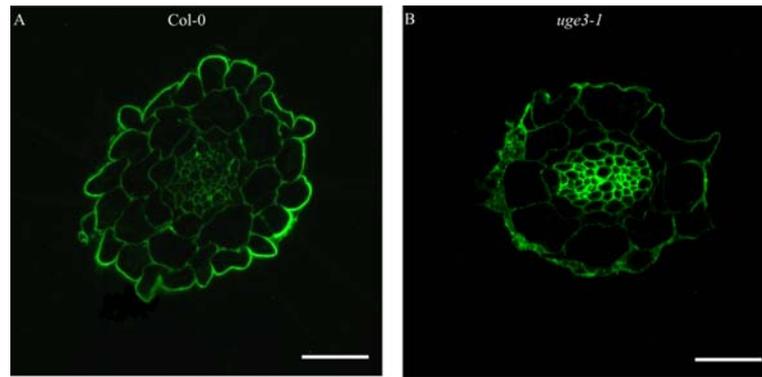
**Abb. 42** Darstellung des Wurzelbereichs 8 Tage alter *uge3-1* Wurzeln für die Anfertigung der Wurzelquerschnitte. Aus dem unterem Teil der Hauptwurzel der *uge3-1* Mutante, der die kugelförmigen Epidermiszellen trägt, wurden die Wurzelquerschnitte der Dünnschnitte angefertigt. Der rot markierte Bereich stellt den Bereich dar, aus dem die Wurzelschnitte hergestellt wurde, entsprechende Bereiche in gleicher Entfernung zur Wurzelspitze wurden im Wildtypen gewählt. Skala = 1mm.

Im Querschnitt des Wildtypen Col-0 ließen sich der Zentralzylinder, Endodermis, Cortex, Epidermis eindeutig erkennen (Abb.43A). Im Querschnitt der *uge3-1* Wurzel konnte diese geordnete strukturelle Form der Wurzelzellanordnung nicht nachgewiesen werden. Hier ließen sich der Zentralzylinder und die Endodermis eindeutig und Cortex sowie Epidermis nur in ungeordneter Form erkennen (Abb.43B). Es ist allerdings möglich ist, dass die äußerste Zellschicht der *uge3-1* Wurzeln bei der Fixierung zerstört wurde.



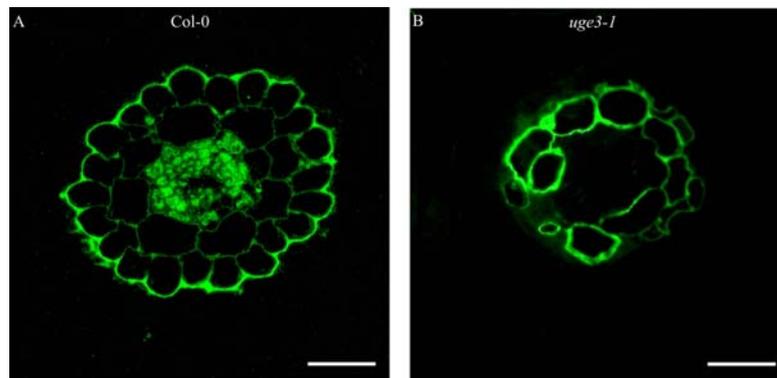
**Abb. 43** Abbildung der Wurzelquerschnitte 8 Tage alter Wurzeln im Durchlicht. (A) Col-0, (B) *uge3-1* (Z: Zentralzylinder, En: Endodermis, C: Cortex, Ep: Epidermis, Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala= 200  $\mu$ m).

CCRC-M1 ist ein Antikörper, der an  $\alpha$ -L-fukosyliertes Xyloglukan der Zellwand bindet. Der Querschnitt der Wildtypwurzel Col-0 zeigte ein Binden des Antikörpers an allen Kompartimenten und ein besonders starkes Binden an den Zellwänden der Epidermis (Abb.44A). In *uge3-1* erfolgte eine verstärkte Bindung des Antikörpers an den Zellwänden des Zentralzylinders. An alle weiteren Zellwände des *uge3-1* Wurzelquerschnitts konnte der Antikörper ebenfalls binden, im Vergleich zum Zentralzylinder jedoch in geringerem Maße (Abb.44B). Im Bereich der kugelförmigen Wurzelzellen der *uge3-1* konnte eine Zunahme an  $\alpha$ -L-fukosyliertem Xyloglukan im Bereich des Zentralzylinders festgestellt werden, während es in den Zellen der Epidermis zu einer Abnahme kam.



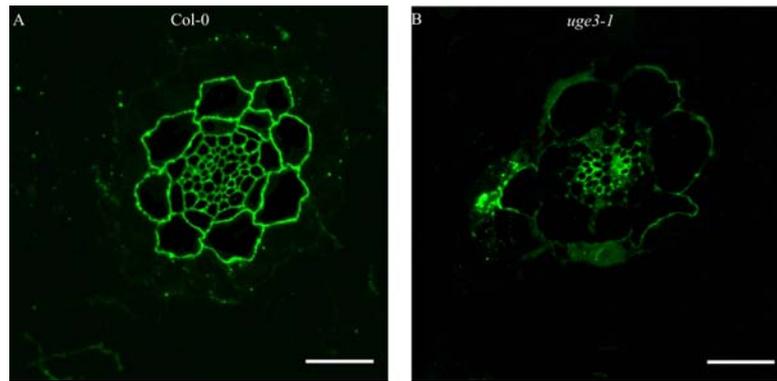
**Abb. 44** Markierung von  $\alpha$ -L-fukosyliertem Xyloglukan im Wurzelquerschnitt 8 Tage alter Wurzeln durch den Antikörper CCRC-M1. (A) Col-0, (B) *uge3-1*. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala= 200 $\mu$ m.

CCRC-M2 ist ein Antikörper, der an  $\alpha$ -L-fukosyliertes Rhamnogalakturonan I der Zellwand bindet. Im Wurzelquerschnitt des Wildtypen Col-0 konnte der Antikörper CCRC-M2 an die Zellwände alle Zelltypen binden. Eine starke Bindung erfolgte an den Zellen der Epidermis (Abb.45A). Im Vergleich zum Wildtypen, zeigt sich in der *uge3-1* Mutante eine verstärkte Bindung des Antikörpers CCRC-M2 an der Cortex der Wurzel. Die Bindungsstärke war in der *uge3-1* Mutante sehr viel höher als im Wildtypen (Abb.45B).



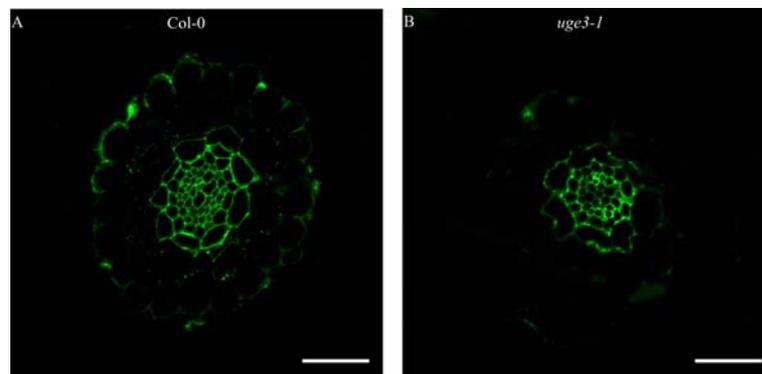
**Abb. 45** Markierung von  $\alpha$ -L-fukosyliertem Rhamnogalakturonan I im Wurzelquerschnitt 8 Tage alter Wurzeln durch den Antikörper CCRC-M2. (A) Col-0, (B) *uge3-1*. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala= 200 $\mu$ m.

LM5 ist ein Antikörper, der an  $\beta$ -D-galaktosylierte Oligomere der Zellwand bindet. In der Zellwand des Wildtypen Col-0 konnte LM5 an die Zellwände des Zentralzylinders, der Endodermis und der Cortex, nicht an die Zellwände der Epidermis binden (Abb.46A). In den Wurzeln der *uge3-1* Mutante konnte LM5 an die Zellwände des Zentralzylinders in hohem Maße und an alle weiteren Zellwänden nur in geringem Maße binden. Zusätzlich lässt sich ein weiteres Binden von LM5 an die äußeren Epidermiszellen der *uge3-1* Wurzeln erkennen (Abb.46B). In *uge3-1* kam es also zu einer Abnahme an  $\beta$ -1,4 verknüpften unsubstituierten Galaktanen.



**Abb. 46** Markierung von  $\beta$ -D-galaktosylierten Oligomeren im Wurzelquerschnitt 8 Tage alter Wurzeln durch den Antikörper LM5. (A) Col-0, (B) *uge3-1*. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala= 200 $\mu$ m.

LM6 ist ein Antikörper, der an  $\alpha$ -1,5-L-Arabinose Oligomere der Zellwand bindet. In der Zellwand des Wildtypen Col-0 bindet er stark an die Zellen des Zentralzylinder und der Endodermis und schwach an die Zellen der Epidermis (Abb.47A). In der Zellwand der *uge3-1* eine starke Bindung des Antikörpers entsprechend dem Wildtypen an die Zellen des Zentralzylinder und der Endodermis und eine schwach Bindung an die Zellen der Epidermis erkennen (Abb.47B). Es kam in der Epidermis *uge3-1* Wurzeln in geringem Maße zu einer Abnahme an  $\alpha$ -1,5-L-Arabinan.



**Abb. 47** Markierung von  $\alpha$ -1,5-L-Arabinose Oligomeren in Wurzelquerschnitten 8 Tage alter Wurzeln durch den Antikörper LM6. (A) Col-0, (B) *uge3-1*. Wachstumsbedingungen: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala= 200 $\mu$ m.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Wurzel im Bereich der kugelförmigen Epidermiszellen der *uge3-1* Mutante große Unterschiede im Aufbau der Zellwand im Vergleich zum Wildtypen aufwies. *UGE3* ist essentiell für die Bildung der fukosylierten Xyloglukan in Epidermis-, Cortex-, und Endodermiszellen. Bei einer Reduktion an Galaktose in der Wurzelzelle, kann die endständige Fukose nicht mehr über ein Galaktose- und Xylosemolekül an Glukose-Rückgrat des Xyloglukans gebunden werden. In *uge3-1* zeigte sich, dass die Abnahme der fukosylierten Xyloglukane in den Zellen der Epidermis, Cortex,

und Endodermis zu einer Zunahme fukosylierter Xyloglukane im Zentralzylinder führte. Ein ähnliche Kompensation ließ sich in *uge3-1* erkennen, in deren Wurzeln  $\alpha$ -L-fukosyliertem Rhamnogalakturonan I in den Epidermiszellen abnahm, während der Anteil in der Cortex zunahm. *UGE3* ist für die Bildung der Galaktoseseitenketten von RGI der Epidermis, aber auch der Cortex und Endodermis verantwortlich. In *uge3-1* zeigte sich außerdem eine geringe Abnahme der  $\alpha$ -1,5-L-Arabinose des RGI in den Epidermiszellen der Wurzel.

### Untersuchung des kristallinen Zellulose der Zellwand

Die Zellwand von Sprossen und Wurzeln wurde auf den Gehalt kristalliner Zellulose untersucht. In den Zellwänden der Sprosse und Wurzeln ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp Col-0 und der Mutante *uge3-1* feststellen (Tab.8).

**Tab. 8 Zellulosegehalt 12 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Keimlinge.** Wachstumsbedingungen Spross: MS-Festmedium (1,2% Agar), 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht. Wachstumsbedingungen Wurzel: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Der Zellulosegehalt wurde in  $\mu\text{g}$  Zellulose/ mg Zellwand angegeben.

	Col-0	<i>uge3-1</i>
Spross, 1% Saccharose	126,432 $\pm$ 8,215	132,459 $\pm$ 7,243
Spross, 0% Saccharose	83,539 $\pm$ 15,489	78,43 $\pm$ 10,345
Wurzel, 1% Saccharose	181,003 $\pm$ 10,277	162,643 $\pm$ 10,063

### Die Pektine der Zellwand

Neben der kristallinen Zellulose wurde der Uronsäuregehalt (Pektin) von Keimlingen untersucht. Die Zellwand von Sprossen und Wurzeln wurde zur Analyse der Pektine untersucht. In den Zellwänden der Sprosse und Wurzeln ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp Col-0 und der Mutante *uge3-1* feststellen (Tab.9).

**Tab. 9 Pektingehalt 12 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Keimlinge.** Wachstumsbedingungen Spross: MS-Festmedium (1,2% Agar), 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht. Wachstumsbedingungen Wurzel: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Der Pektingehalt wurde in  $\mu\text{mol}$  Uronsäure/ mg Zellwand angegeben.

	Col-0	<i>uge3-1</i>
Spross, 1% Saccharose	1,805 $\pm$ 0,347	1,589 $\pm$ 0,377
Spross, 0% Saccharose	1,596 $\pm$ 0,318	1,378 $\pm$ 0,345
Wurzel, 1% Saccharose	1,526 $\pm$ 0,567	1,231 $\pm$ 0,245

### Die Monosaccharidanalyse der Zellwände

Zur Analyse der Zellwandzusammensetzung von Keimlingen, wurden ihre Monosaccharide durch GC-MS aufgetrennt und bestimmt. Dabei wurden die Zellwände der Sprosse und

Wurzeln untersucht. In der Zusammensetzung der Sprosse zeigte sich keine signifikante Änderung der Zellwandzusammensetzung, auch im Gehalt der Galaktose nicht. Die Monosaccharidanalyse der Wurzeln ergab eine signifikante 6%ige Abnahme an Xylose in der *uge3-1* Wurzel im Vergleich zum Wildtypen Col-0 (Tab.10). Auch in der Wurzel konnte keine signifikante Änderung des Galaktosegehalts festgestellt werden. Da für die Monosaccharid-Analyse jedoch Zellwandmaterial der gesamten Sprosse und Wurzeln eingesetzt wurden, wären geringe gewebespezifische Unterschiede nicht detektierbar und durch auftretende Verdünnungseffekte nicht messbar gewesen. Die Unterschiede der Antikörpermarkierung konnten in der Monosaccharidanalyse nicht bestätigt werden. Die Antikörpermarkierung erfolgte sehr gezielt nur in den Geweben der kugelförmigen Epidermiszellen, war also gewebespezifisch und sehr präzise.

**Tab. 10 Monosaccharidanalyse durch GC-MS 12 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Keimlinge.** Wachstumsbedingungen Spross: MS-Festmedium (1,2% Agar), 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht. Wachstumsbedingungen Wurzel: MS- Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Alle Monosaccharide wurden in Mol% angegeben. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \* gekennzeichnet. (Gal: Galaktose, Man: Mannose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Fuk: Fukose, Rha: Rhamnose, Glu: Glukose, UA: Uronsäure, Sac.: Saccharose)

	Spross				Wurzel	
	Col-0 1% Sac.	<i>uge3-1</i> 1% Sac.	Col-0 0% Sac.	<i>uge3-1</i> 0% Sac.	Col-0 1% Sac.	<i>uge3-1</i> 1% Sac.
Gal	23,03 ± 1,38	24,24 ± 1,55	27,11 ± 4,74	21,74 ± 1,19	7,82 ± 0,52	8,09 ± 0,43
Man	5,07 ± 0,50	5,00 ± 0,49	5,07 ± 1,29	3,79 ± 0,70	2,71 ± 0,40	2,43 ± 0,21
Xyl	10,38 ± 0,73	10,71 ± 0,82	11,95 ± 2,76	8,59 ± 2,73	32,29 ± 1,81	30,34 ± 1,38*
Ara	10,49 ± 1,51	10,98 ± 0,82	11,27 ± 2,82	10,17 ± 0,29	27,28 ± 0,93	27,44 ± 0,97
Fuk	2,10 ± 0,95	2,05 ± 0,29	2,21 ± 0,87	1,70 ± 0,12	17,14 ± 1,53	17,84 ± 2,04
Rha	5,87 ± 3,13	7,39 ± 1,24	9,84 ± 2,57	6,70 ± 2,26	6,35 ± 2,98	6,63 ± 3,24
Glu	14,94 ± 4,03	16,15 ± 3,05	7,41 ± 2,48	4,34 ± 0,95	1,93 ± 0,23	2,09 ± 0,23
UA	28,13 ± 5,10	23,49 ± 5,00	25,13 ± 17,21	42,98 ± 7,24	4,48 ± 1,32	5,14 ± 1,41

### Die Xyloglukane der Zellwand

Die Analyse der Xyloglukane von Keimlingen erfolgte durch MALDI-TOF. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Xyloglukane in den Sprossen von Col-0 und *uge3-1* festgestellt werden. In den Wurzeln der *uge3-1* kam es zu einer 40%igen Zunahme des Fragmentes 791 (m/z) und 35%igen des Fragmentes 953 (m/z) (Tab.11, genaue Beschreibung der Fragmente Anhang Abb.III). Allerdings war das Hintergrundrauschen in diesem Bereich sehr hoch, so dass die Reproduzierbarkeit der Detektion der kleinen Xyloglukanfragmente nicht gewährleistet ist. Alle Ionensignale (Masse/Ladung) wurden durch die Integration der

relativen Häufigkeiten der Signale errechnet und in relativen Mengen der Ionen angegeben. Alle Ionensignale repräsentieren bekannte Oligosaccharide.

**Tab. 11 Xylogluksan-Analyse durch MALDI-TOF 12 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Keimlinge.** Wachstumsbedingungen Spross: MS-Festmedium (1,2% Agar), 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht. Wachstumsbedingungen Wurzel: MS- Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Alle Ionensignale (Masse/Ladung) wurden durch die Integration der relativen Häufigkeiten der Signale errechnet und in relativen Mengen der Ionen angegeben. (Alle Ionensignale repräsentieren bekannte Oligosaccharide. Die genaue Beschreibung dieser Fragmente siehe Anhang Abb.III, Ac: Summe aller acetylierten Xylogluksan-Fragmente, F: Summe aller fukosylierten Xylogluksan-Fragmente, L: Summe aller galaktosylierten Xylogluksan-Fragmente). Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \* gekennzeichnet.

	Spross				Wurzel	
	Col-0 1% Sac.	<i>uge3-1</i> 1% Sac.	Col-0 0% Sac.	<i>uge3-1</i> 0% Sac.	Col-0 1% Sac.	<i>uge3-1</i> 1% Sac.
791 XXG	0,106 ± 0,02	0,115 ± 0,03	0,152 ± 0,05	0,104 ± 0,03	0,074 ± 0,02	0,104 ± 0,01*
953 GXXG	0,078 ± 0,03	0,094 ± 0,02	0,091 ± 0,02	0,072 ± 0,01	0,065 ± 0,02	0,088 ± 0,02*
1085 XXXG	0,228 ± 0,05	0,187 ± 0,04	0,192 ± 0,06	0,237 ± 0,01	0,234 ± 0,04	0,223 ± 0,02
1247 XXLG	0,100 ± 0,02	0,125 ± 0,03	0,125 ± 0,01	0,125 ± 0,01	0,105 ± 0,01	0,108 ± 0,01
1289 XXLG+Ac	0,076 ± 0,03	0,092 ± 0,02	0,072 ± 0,03	0,046 ± 0,02	0,071 ± 0,02	0,070 ± 0,01
1393 XXFG	0,115 ± 0,03	0,109 ± 0,02	0,096 ± 0,02	0,117 ± 0,02	0,212 ± 0,03	0,190 ± 0,03
1435 XXFG+Ac	0,121 ± 0,03	0,109 ± 0,02	0,113 ± 0,02	0,140 ± 0,02	0,102 ± 0,05	0,100 ± 0,02
1555 XLFG	0,092 ± 0,01	0,083 ± 0,02	0,069 ± 0,02	0,064 ± 0,02	0,092 ± 0,03	0,078 ± 0,01
1597 XLFG+Ac	0,084 ± 0,01	0,085 ± 0,01	0,089 ± 0,01	0,096 ± 0,03	0,045 ± 0,01	0,038 ± 0,01
All Ac	0,281 ± 0,03	0,286 ± 0,02	0,274 ± 0,03	0,282 ± 0,03	0,218 ± 0,07	0,208 ± 0,01
All F	0,412 ± 0,05	0,386 ± 0,04	0,368 ± 0,02	0,416 ± 0,04	0,451 ± 0,04	0,407 ± 0,04
All L	0,588 ± 0,04	0,603 ± 0,05	0,565 ± 0,01	0,587 ± 0,03	0,627 ± 0,04	0,585 ± 0,04

Die durch die Markierung von Antikörpern gefundenen Unterschiede im Aufbau der Zellwand der *uge3-1* Wurzel konnten durch die Messung einzelner Komponenten nicht bestätigt werden. Für alle Analysen wurde jedoch Zellwandmaterial der gesamten Sprosse und Wurzeln verwendet. Geringe Änderungen in der Zusammensetzung der Zellwand wären also durch diese Analysen nicht zu erkennen.

### 3.2.6 Untersuchung der Zellmetabolite und Zellkompartimente

Da Galaktose nicht nur Bestandteil der Zellwand ist, wurden neben der Zellwand auch die Metabolite der Zelle und einzelne Zellkompartimente und Speicherstoffe untersucht.

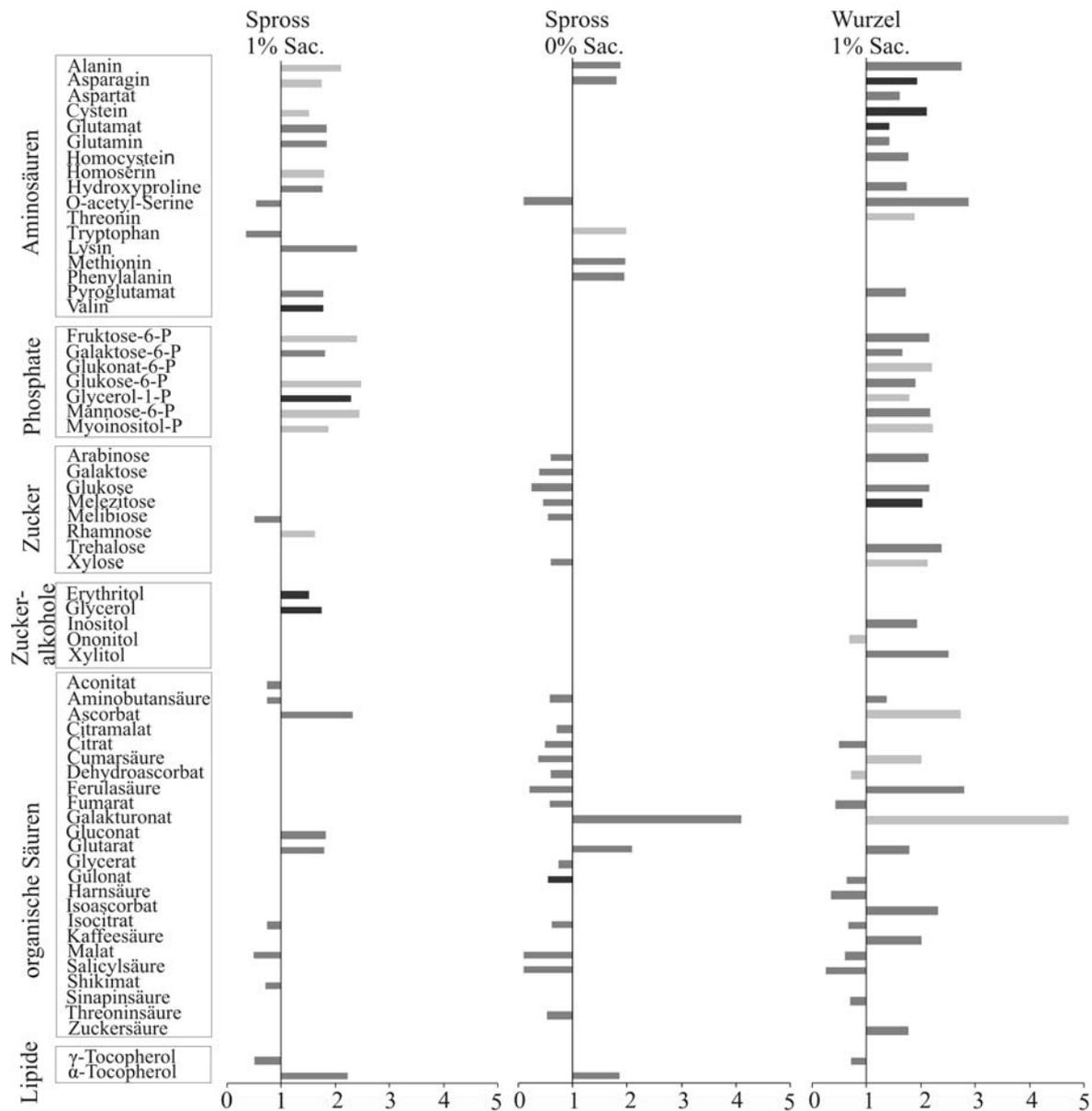
#### Untersuchung der Metabolite durch GC-MS

Neben der Analyse der Zusammensetzung der Zellwand, konnte die Untersuchung der Zellmetabolite genauere Einblicke in die Zellen der *uge3-1* Mutante und des Wildtypen Col-0 gewähren. Zur Analyse der Metabolite wurden Spross und Wurzelgewebe untersucht.

Ziel war es, polare und lipide Metabolite aus der Zelle zu lösen, in zwei Phasen aufzutrennen und für die GC-MS-Messung aufzubereiten.

Es zeigten sich die meisten Änderungen in den Wurzeln der untersuchten Pflanzen. Sprosse, die ohne Zuckerquelle wuchsen (0% Saccharose) zeigten dagegen wenig Unterschiede im Vergleich von Col-0 und *uge3-1*. In den Sprossen der *uge3-1* Mutante zeigte sich bei einem Wachstum auf 1% Saccharose eine Zunahme der Aminosäuren Alanin, Asparagin, Cystein, Homoserin, Valin; der Phosphatzucker Fruktose-6 Phosphat, Glukose-6 Phosphat, Glycerol-1-Phosphat, Mannose-6 Phosphat, Myoinositol-Phosphat; der Zucker Rhamnose und der Zuckeralkohole Erythritol, Glycerol. In den Sprossen der *uge3-1* Mutante zeigte sich bei einem Wachstum auf 0% Saccharose eine Zunahme der Aminosäure Tryptophan und eine Abnahme der organischen Säure Gulonat.

In den Wurzeln der *uge3-1* Mutante zeigte sich bei einem Wachstum in 1% Saccharose eine Zunahme an den Aminosäuren Alanin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Homocystein, Hydroxyprolin, O-Acetyl-Serine, Threonin, Pyroglutamat; der Phosphatzucke Fruktose-6-P, Galaktose-6-P, Glukose-6-P, Mannose-6-P, Myoinositol-P; der Zucker Arabinose, Glukose, Melezitose, Trehalose, Xylose und der organischen Säuren Aminobutansäure, Galakturonat, Glutarat, Kaffeesäure, sowie eine Abnahme an Citrat, Fumarat. Hierbei war der Anstieg an Galakturonat in den Wurzeln der *uge3-1* die größte Zunahme (Abb.48). Alle Zahlenwerte und Angaben zum T-Test sind im Anhang zu finden (Anhang Tab.XVIII).

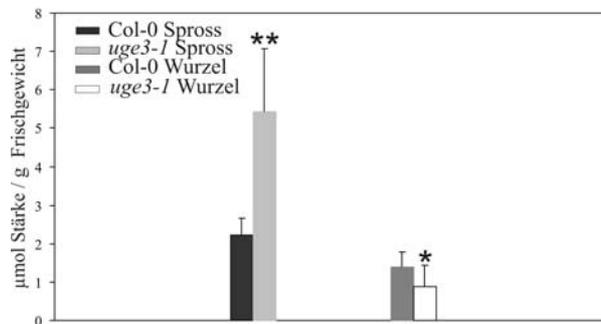


**Abb. 48 Metaboliten-Analyse 12 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Sprosse und Wurzeln.** Wachstumsbedingungen Spross: MS-Festmedium (1,2% Agar), 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht. Wachstumsbedingungen Wurzel: MS- Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Alle Werte wurden auf die Werte des Wildtypen Col-0 normalisiert (1 = Col-0). Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch helles Grau, alle Werte  $p < 0,01$  durch Schwarz gekennzeichnet.

### Untersuchung der Kompartimente der Zelle

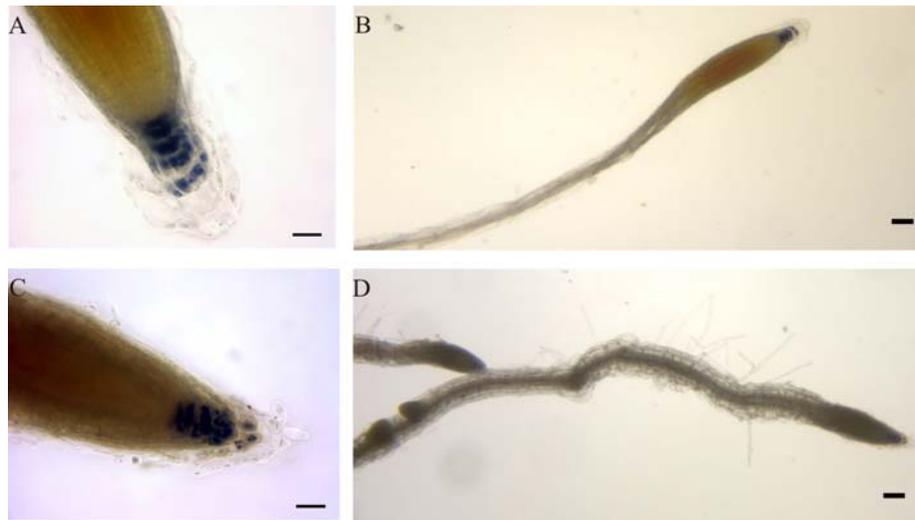
In der Untersuchung der Metabolite in *uge3-1* konnte ein Anstieg der Trehalose in den Wurzeln der Mutante gemessen werden. Trehalose ist ein Disaccharid, das den Metabolismus und die Entwicklung der Pflanze beeinflusst und zum Schutz auf Stressreaktionen dient. Müller *et al.* (2001) stellte fest, dass eine Unterdrückung des Enzyms Trehalase (hydrolysiert Trehalose) durch Valin in *Arabidopsis* zu einer Anhäufung von Trehalose führt. Außerdem

konnte Winger *et al.* (2000) zeigen, dass Trehalose einer unterdrückten Wurzelelongation und Akkumulation von Stärke in den Blättern führte. Daraufhin wurden in *uge3-1* und Col-0 die Konzentration an Stärke in Blättern und Wurzeln untersucht, die unter gleichen Wachstumsbedingungen wuchsen, wie die Pflanzen, die für die Metabolitenanalyse verwendet wurden. Eine Messung des Stärkegehalts dieser Pflanzen zeigte, dass die *uge3-1* Wurzeln über 36% weniger Stärke und die *uge3-1* Sprosse über 144% mehr Stärke verfügten als der Wildtyp Col-0 (Abb.49). Es konnte also gezeigt werden, dass ein erhöhter Trehalose- und Valingehalt in den Wurzeln, sowie eine Anhäufung an Stärke in den Blättern und gleichzeitige Reduktion von Stärke in den Wurzeln der *uge3-1* Mutante bei einem Wachstum auf 1% Saccharose im permanenten Licht zu messen war.



**Abb. 49 Bestimmung des Stärkegehalts 12 Tage Col-0 und *uge3-1* Sprosse und Wurzeln.** Wachstumsbedingungen: MS- Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Die Ernte erfolgte mittags. Der Stärkegehalt wurde in µmol Stärke/ g Frischgewicht angegeben. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

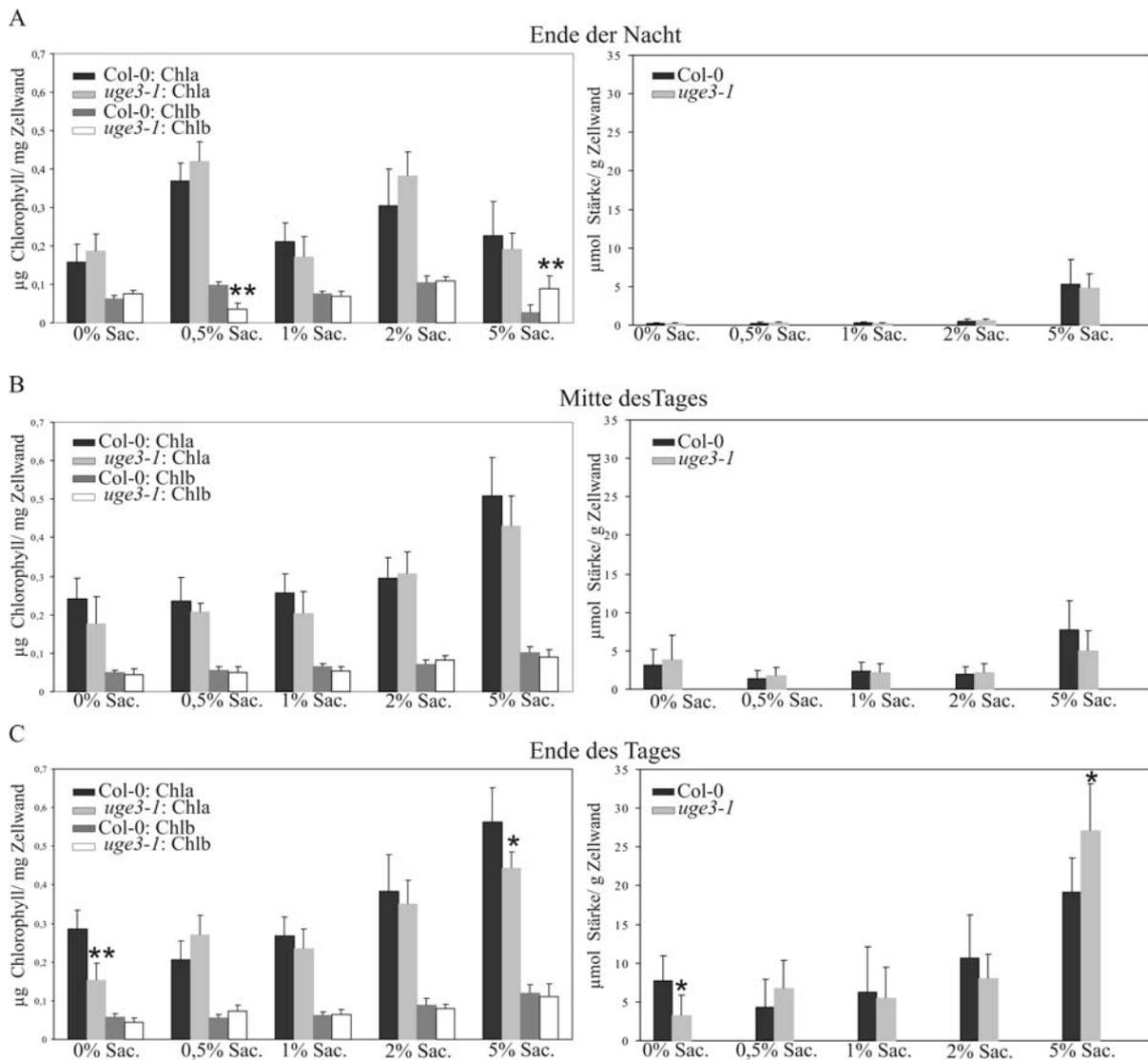
Gespeicherte Stärke ist durch Jod-Jodkalium (Lugolsches Reagenz) leicht nachweisbar. Der Komplex Stärke-Jod ist blau gefärbt. Zur Analyse der Stärke in Wurzeln wurden *uge3-1* und Col-0 Wurzeln mit Hilfe der Lugolschen Lösung gefärbt. Es zeigte sich, dass die Wurzelspitzen der *uge3-1* über weniger gespeicherte Stärke verfügten, als der Wildtyp (Abb.50).



**Abb. 50 Mikroskopische Analyse 8 Tage alte Wurzeln nach der Färbung in Lugolscher Lösung.** (A), (B) Col-0, (C), (D) *uge3-1*. Wachstumsbedingungen: MS- Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht, Skala= 200 $\mu$ m.

Der Ort der Bildung der Assimilationsstärke während der Photosynthese sind die Chloroplasten. Die Chloroplasten höherer Pflanzen enthalten ein einzigartiges Membransystem, die Thylakoide, welche die Chlorophyll-Protein-Komplexe der Photosynthese beherbergen. Stärke wird in den Chloroplasten gebildet und gespeichert.

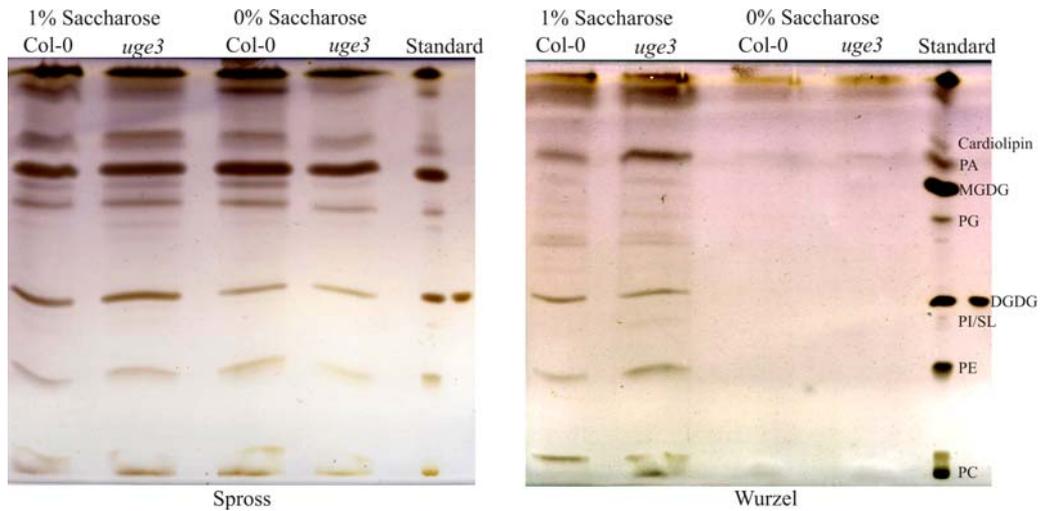
Chlorophyll und Stärke wurden aus Blättern der *uge3-1* Mutante extrahiert und mit denen des Wildtypen Col-0 verglichen. Die Spross und Wurzelproben wurden zu drei Zeitpunkten geerntet (7.30 Uhr; 13.00 Uhr; 19.00 Uhr), wobei das Licht in der Lichtkammer von 6.00 – 20.00 Uhr eingeschaltet war. Als Zuckerquelle dienten den untersuchten Pflanzen Saccharosegehalte von 0-5%. In den Blättern der *uge3-1* zeigte sich am Ende der Nacht eine 64% Reduktion an Chlorophyll b auf 0,5%iger Saccharose, während der Gehalt an Chlorophyll b auf 5%iger Saccharose um 229% im Vergleich zu Wildtypen stieg (Abb.51A). Die Stärkegehalte aller Proben, die am Ende der Nacht geerntet wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb.51A). Auch die Proben der mittags geernteten Pflanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Chlorophylle a und b sowie der Stärke (Abb.51B). Am Ende des Tages konnte eine 47%ige Reduktion im Chlorophyll b und 58%ige Reduktion der Stärke in *uge3-1* auf 0,5%iger Saccharose, sowie eine 21% Reduktion im Chlorophyll b und 41% Anstieg der Stärke in *uge3-1* auf 5%iger Saccharose gemessen werden (Abb.51C). Es zeigte sich also, dass *uge3-1* bei einem Wachstum auf erhöhter Saccharosekonzentration mehr Stärke anhäuften als der Wildtyp Col-0, wohingegen *uge3-1* ohne externe Zuckerquelle nicht in der Lage war, gleiche Mengen an Stärke zu bilden, wie Col-0. Der Tag/Nachtrhythmus des Stärkeauf- und Abbaus entsprach in der *uge3-1* Mutante dem des Wildtypen Col-0.



**Abb. 51 Chlorophyll- und Stärkegehalt 5 Wochen alten *Col-0* und *uge3-1* Blätter.** Die Ernte der Proben erfolgte: (A) Ernte um 7.30 Uhr morgens, (B) Ernte um 13.00 Uhr mittags, (C) Ernte um 19.00 Uhr abends. Wachstumsbedingungen: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), 0%-5% Saccharose, 14 h Lichtrhythmus (6.00 – 20.00 Uhr). Der Chlorophyllgehalt wurde in  $\mu\text{g}$  Chlorophyll/ mg Zellwand, der Stärkegehalt in  $\mu\text{mol}$  Stärke/ g Zellwand angegeben. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

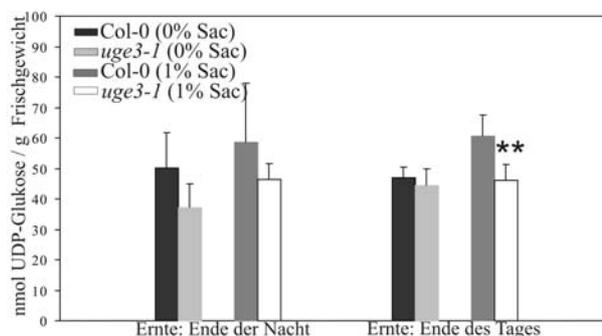
Der Hauptanteil der Thylakoide der Chloroplasten besteht vor allem aus Thylakoidlipiden wie den Galaktolipiden. Hier sind ein oder zwei Galaktose-Zucker an Diacylglycerol gebunden. Weiterhin sind Galaktolipide bei Phosphatmangel für das Wachstum notwendig, weil sie Phospholipide in den Membranen ersetzen, um Phosphat für andere zelluläre Prozesse bereitzustellen. Die Lipide von *uge3-1* und *Col-0* wurden extrahiert und durch Dünnschicht-Chromatographie (DC) getrennt. Es ließen sich in den Geweben der Sprosse und Wurzeln, sowie in den Geweben, die auf unterschiedlichen Zuckermengen wuchsen, keine signifikanten Unterschiede zwischen der *uge3-1* Mutante und dem Wildtypen *Col-0* erkennen (Abb.52). Da die Sprosse auf MS-Festmedium gezogen wurden, welches Agar enthielt, könnte dieser schon komplementierend auf die Pflanzen der *uge3-1* gewirkt haben. So könnten geringe

Unterschiede in den Galaktolipiden nicht sichtbar sein. Eine Wiederholung des Experimentes wurde jedoch ausgeschlossen, da auch die Wurzel der in Flüssigmedium gewachsenen Pflanzen keine signifikanten Unterschiede zeigten.



**Abb. 52 Lipidanalyse 12 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Pflanzen.** Wachstumsbedingungen Spross: MS-Festmedium (1,2% Agar), 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht. Wachstumsbedingungen Wurzel: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht. Als Standard dienen: Cardiolipin, PA: Phosphatidsäure, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PI: Phosphatidylinositol, SL: Sulfolipid, DGDG: Digalaktosyldiacylglycerol, PG: Phosphatidylglycerol, MGDG: Monogalaktosyldiacylglycerol.

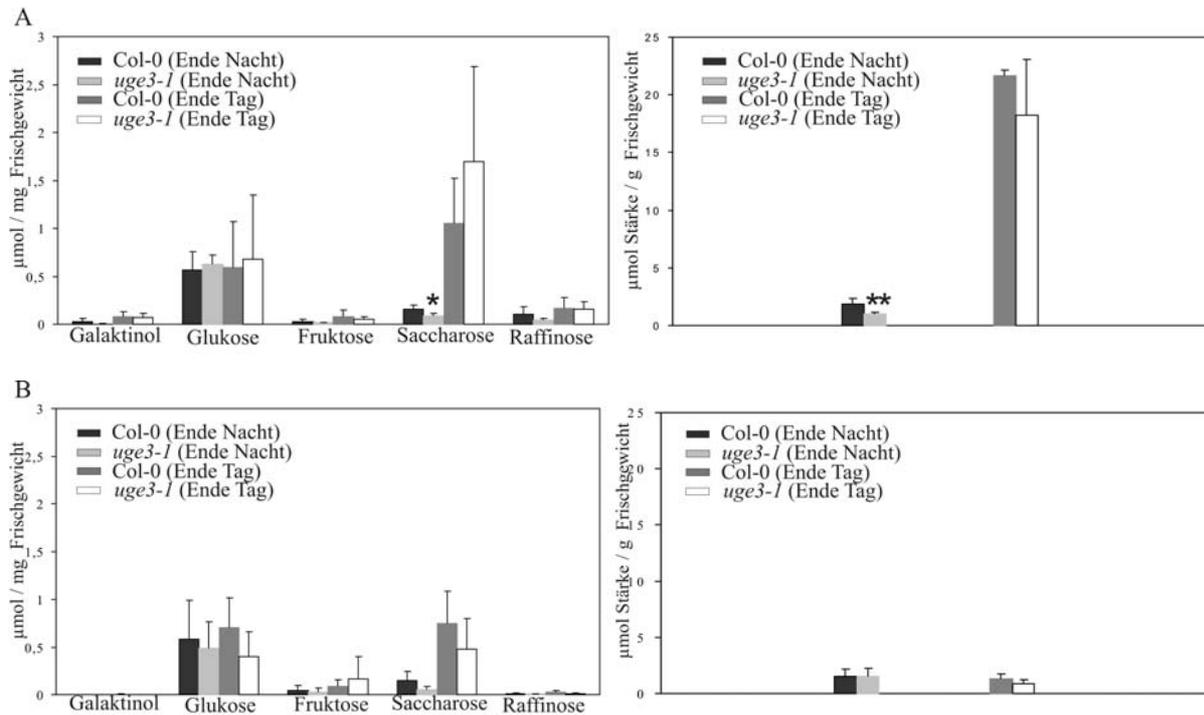
Da sowohl UDP-Galaktose als auch Stärke aus UDP-Glukose gebildet werden kann, wurde der Gehalt an UDP-Glukose in Blätter der *uge3-1* und Col-0 ermittelt. Die Proben wurden am Ende der Nacht (13.00 Uhr, in Dunkelheit) und am Ende des Tages (17.30 Uhr) geerntet, wobei das Licht in der Kammer von 7.00 Uhr- 19.00 Uhr angeschaltet war. Als Zuckerquelle dienten 0% oder 1% Saccharose. Es zeigten sich eine Reduktion um 24% an UDP-Glukose in den Pflanzen der *uge3-1* Mutante bei einem Wachstum auf 1% Saccharose am Ende des Tages (Abb.53).



**Abb. 53 UDP-Glukose Bestimmung 20 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Pflanzen (Blatt).** Die Pflanzen wurden in MS-Festmedium (0,5% Gelrite) in einem 12 h Tag/Nachtrhythmus (7.00 Uhr- 19.00 Uhr) gezogen. Als Zuckerquelle diente 0% oder 1% Saccharose. Die Ernte erfolgte: Ende der Nacht: 13.00 Uhr in Dunkelheit, Ernte Ende des Tage: 17.30 Uhr. Alle Werte  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

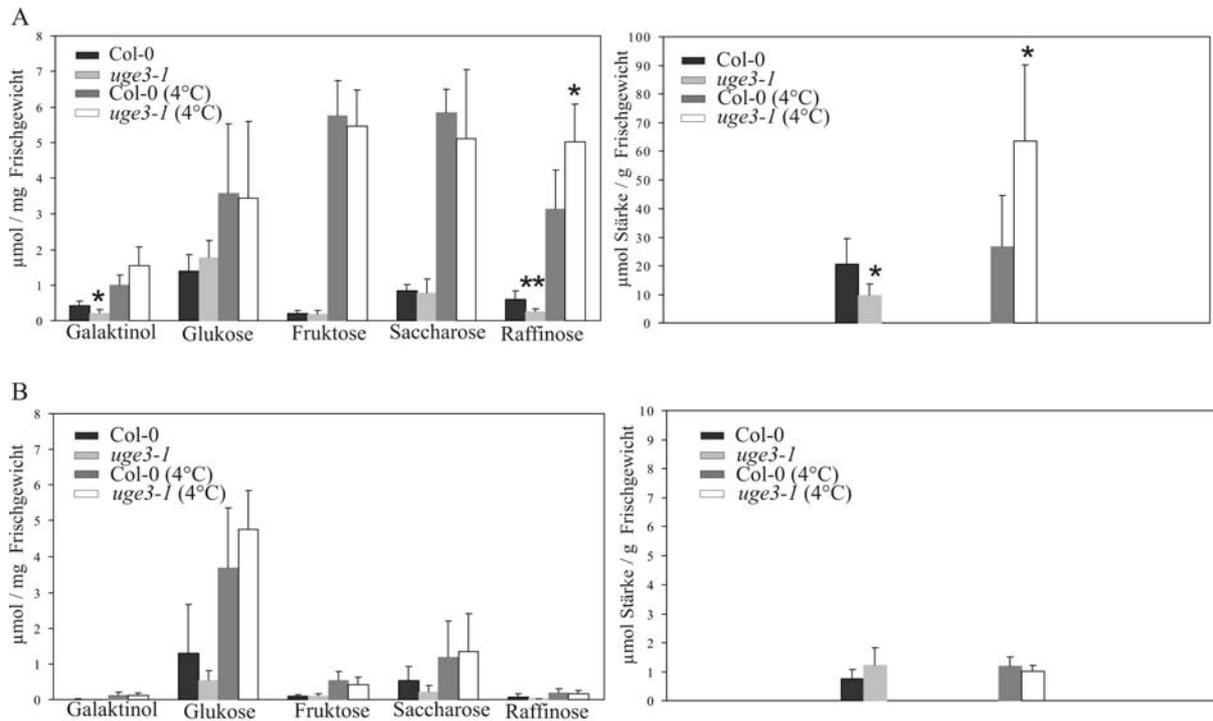
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *uge3-1* bei einem Wachstum auf höheren Zuckerkonzentrationen mehr Stärke als der Wildtyp Col-0, bei einem Wachstum auf geringeren Zuckergehalten dagegen weniger Stärke synthetisiert. UDP-Glukose wird unabhängig vom Lichteinfluss (Tag oder Nacht) in *uge3-1* in geringerem Maße gebildet und somit wahrscheinlich nicht für die unterschiedlichen Stärkekonzentrationen verantwortlich ist. Raffinose ist ein wasserlösliches Galaktosyl-Saccharose Oligosaccharid und dient als Speicher- und Transportkohlenhydrate im Pflanzenreich. Raffinose wird vermehrt bei Stress, induziert durch Wassermangel, Hitze oder Kälte, in der Zelle synthetisiert. Die Akkumulation von Raffinose und bei der Adaptation an Kälte (Zuther *et al.*, 2004) und Trockenheit (Taji *et al.*, 2002) ist bei vielen Pflanzenarten bekannt und dokumentiert. Ein größerer Anteil an Raffinose führt dementsprechend zu einer verbesserten Toleranz gegen Trocken- und Kältestress der Pflanze. Die Biosynthese der Raffinose beginnt mit der Übertragung eines Galaktosemoleküls von Galaktinol auf Saccharose und wird durch das Enzym Raffinosesynthase katalysiert. Als Produkt entsteht dabei das Trisaccharid Raffinose. Der Galaktose-Donor Galaktinol wird mit Hilfe der Galaktinolsynthase aus UDP-Galaktose und Myoinositol gebildet.

Zur Analyse des Gehalts an Raffinose und Galaktinol, sowie Fruktose, Glukose und Saccharose wurden Blätter und Wurzeln von *uge3-1* mit denen des Wildtypen Col-0 untersucht. Die Gewebeproben wurden am Ende der Nacht (10.00 Uhr) und am Ende des Tages (15.30 Uhr) geerntet, wobei das Licht im Gewächshaus von 6.00 Uhr- 22.00 Uhr eingeschaltet war. Es zeigt sich, dass die Saccharosekonzentration am Ende der Nacht in *uge3-1* um 46%, die Stärke um 21% im Vergleich zum Wildtypen Col-0 (Abb.54A) reduziert war. Neben den Blattproben wurden von denselben Pflanzen Wurzelproben analysiert. Diese zeigten weder am Ende der Nacht noch am Ende des Tages signifikante Änderungen. Die gemessenen Werte waren allerdings sehr niedrig (Abb.54B). Auch hier zeigte sich eine Reduktion an Stärke bei einem Wachstum ohne externe Zuckerquelle, die dem Wildtyp entsprechend im Tag/Nachtrhythmus auf- und abgebaut wurde.



**Abb. 54 Bestimmung des Galaktinol-, Glukose- Fruktose-, Saccharose- und Raffinosegehalts, sowie des Stärkegehalts 42 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Pflanzen (Blatt und Wurzel).** A: Blatt, B: Wurzel. Wachstumsbedingungen: Gewächshaus. Die Ernte erfolgte um: 10.00 Uhr morgens (Ende der Nacht) in Dunkelheit und 15.30 Uhr (Ende des Tages). Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.

Um einen Unterschied der Kälteakklimatisation und der verbundenen Bildung an Raffinose in Blätter- und Wurzelproben von *uge3-1* mit dem Wildtypen Col-0 feststellen zu können, wurden Proben mit und ohne Kälteinduktion verglichen. Es zeigte sich in den Proben der *uge3-1* Blätter eine Reduktion an Galaktinol um 53% und an Raffinose um 60% bei einem normalen Wachstum im Gewächshaus. Die Stärkekonzentration dieser Pflanzen war um 54% geringer als im Wildtypen. Nach dem Transfer der Pflanzen in 4°C konnte in *uge3-1* ein Anstieg an Raffinose um 60% und an Stärke um 137% gemessen werden (Abb.55A). In den Wurzelproben dieser Pflanzen konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden (Abb.55B).



**Abb. 55 Bestimmung des Galaktinol-, Glukose- Fruktose-, Saccharose- und Raffinosegehalts, sowie des Stärkegehalts 42 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Pflanzen (Blatt und Wurzel). A: Blatt, B: Wurzel. Wachstumsbedingungen: Gewächshaus. Nach einem 42-tägigen Wachstum wuchsen die Pflanzen für weitere 14 Tage bei 4°C. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*,  $p < 0,01$  wurden durch \*\* gekennzeichnet.**

Es zeigte sich, dass *uge3-1* bei normalen Wachstumsbedingungen im Gewächshaus über geringere Saccharose und auch Stärkegehalte in den Geweben der Blätter verfügte, die am Ende der Nacht geerntet wurden. Hingegen zeigen die Pflanzen, die zur späteren Kälteinduktion verwendet wurden eine Reduktion an Galaktinol und Raffinose, die durch einen Mangel an Galaktose in den Pflanzen zu erklären ist, sowie erneut eine Reduktion an Stärke. Nach der Kälteinduktion zeigen diese einen Anstieg an Raffinose und Stärke.

Genauere Untersuchungen galaktosehaltigen Komponenten der *uge3-1* Mutante hätten zeigen können, ob der Anstieg der Raffinose durch Kälteinduktion beispielsweise zu einer Reduktion an Galaktose der Zellwand geführt hätte. Eine Bestimmung des Expressionsverhaltens aller *UGE*-Gene in der kälteinduzierten *uge3-1* Mutante hätte möglicherweise eine verstärkte Expression anderer *UGE*-Isoformen gezeigt. Die Expressionsdaten der AtGenexpress Datenbank zeigen eine erhöhte Expression für das Gen *UGE2* und *UGE5* durch Kälteinduktion (Anhang Abb. IV). Möglicherweise führt die T-DNA Insertion in *UGE3* zu einer verstärkten Expression von *UGE2* oder *UGE5* bei Kälteinduktion und so zu einer erhöhten Bildung von Raffinose.

## **4. Diskussion**

Die Einzelheiten der Synthese der pflanzlichen Zellwand sind weitgehend unbekannt. Es wurden zwei experimentelle Ansätze zur Klärung der Abläufe bei der Zellwandsynthese gewählt. Zum einen erfolgte eine Identifikation apoplastischer Proteine, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind; zum anderen wurde eine Mutante mit T-DNA Insertion am Gen des Nukleotidzucker-Synthesewegs in Hinblick auf die Frage untersucht, welche Auswirkungen diese Insertion auf die Zusammensetzung der Zellwand und anderer Zellkompartimente hat.

### **4.1 TAST**

#### **4.1.1 Isolation apoplastischer Proteine und Selektivität des TAST-Systems**

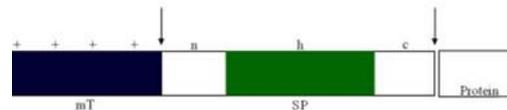
Polysaccharide, die aus einzelnen Nukleotidzuckern zusammengesetzt sind, werden nach ihrer Synthese in den Apoplasten geschleust, und ermöglichen so ihren Einbau in die Zellwand. Auch Proteine können in den Apoplasten sekretiert werden, um dort unterschiedlichste Aufgaben zu übernehmen. So sind Proteine z.B. an der Regulation des Zellwachstums beteiligt (Sakurai, 1998). In Hinblick auf die Zellwand wirken sie bei der Zellwandsynthese und -degeneration, sowie bei der Orientierung und Verknüpfung der einzelnen Zellwandbestandteile mit. Der Apoplast bietet Schutz gegen Pathogene und schädliche Umwelteinflüsse, wie Ozon. Hier findet der Transport von Wasser, Ionen und Zuckermolekülen, sowie Hormonen, Oligosacchariden und Proteinen statt (Sakurai, 1998).

Ziel der Arbeit war es, Proteine, die in den Apoplasten sekretiert werden und an der Zellwandsynthese beteiligt sind zu identifizieren. Als Modellsystem der Zellwandsynthese könnten z.B. die Wachstumszonen von Keimlingen dienen, denn während der Zellteilung erfolgt hier eine Neubildung der Zellwand. Die exakte Ernte dieser im Ausmaße kleinen Region wäre jedoch sehr schwierig und könnte leicht zur Kontamination

durch benachbarte Kompartimente führen. Daher wurden als alternatives Modellsystem regenerierende Protoplasten einer *Arabidopsis* Zellsuspension gewählt. Während des Prozesses der Regeneration bilden Protoplasten eine vollständig neue Zellwand (Kwon *et al.*, 2005). Zellsuspensionen bieten den Vorteil der großen Biomassebildung und Homogenität des biologischen Materials. Zur Identifikation apoplastischer Proteine, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind, wurde das Transposon-Assisted-Signal Trapping (TAST) verwendet. TAST beruht auf der transposonbasierten Erkennung N-terminaler Sequenzen, die für die Sekretion in den Apoplasten verantwortlich sind. TAST bietet im Hinblick der Selektionsform und Analyse die Möglichkeit des kontaminationsfreien Arbeitens, da keine Extraktion apoplastischer Proteine erforderlich ist. Vielmehr erfolgt die Selektion apoplastischer Proteine durch TAST aufgrund einer translationalen Fusion des Reportergens  $\beta$ -Lactamase, dem das Sekretionssignal entfernt wurde, mit einem Gen, das eine Signalsequenz trägt. Springt das auf dem Transposon lokalisierte Reportergen in ein Gen, das für ein Protein mit N-terminalem Sekretionssignal kodiert, so kann die  $\beta$ -Lactamase nach erfolgter Translation aktiv werden, indem sie sekretiert wird. Sie ist nun in der Lage, den  $\beta$ -Lactamring des Antibiotikums Ampicillin zu spalten und der Wirtszelle die benötigte Ampicillinresistenz zu verleihen. Die Analyse der selektierten apoplastischen Kandidaten erfolgte über eine einfache DNA-Isolierung aus den überlebenden Wirtszellen nach Ampicillinselektion und anschließender Sequenzierung, sowie bioinformatischen Untersuchungen der Sequenzen. TAST bietet also im Vergleich zur klassischen Proteomics Analyse durch 2D-Elektrophorese und MS oder MALDI-TOF, eine vergleichsweise einfache Selektion der Kandidatengene. Aufwendige Proteinaufreinigungen und Proteinanalysen entfallen.

Die Funktionalität und Möglichkeit der Selektion des TAST Systems konnten trotz des Einsatzes einer eukaryontischen cDNA aus Protoplasten einer *Arabidopsis* Zellsuspension in einem prokaryontischen Selektionssystem (*E.coli*) durch eine Anreicherung apoplastischer Proteine bewiesen werden. Die Sekretionssignale der Pro- und Eukaryonten unterscheiden sich nur geringfügig und sind in gleicher Art und Weise aufgebaut (von Heijne, 1990a,b; Rapoport, 1992; Rusch und Kendall, 1995; Schatz und Dobberstein, 1996) (Abb.19). Die c-Region des Signalpeptides wird in Eukaryonten aus ca. 5 und in Prokaryonten aus ca. 6 Aminosäuren gebildet. Die Schnittstelle der Signalpeptidase schließt direkt an die c-Region an. Strukturell gesehen ist diese Region sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten in der Aminosäurezusammensetzung inhomogen. Die c-Region legt in Pro- und Eukaryonten die Position der Spaltstelle der Signalpeptidase fest. Die n-Region ist bei Pro- und Eukaryonten sowohl in ihrer Länge als auch ihrer Sequenzabfolge völlig unterschiedlich. Sie erstreckt sich

in Eukaryonten meist über 7 und in Prokaryonten über 8 Aminosäuren. Die h-Region dagegen setzt sich in Prokaryonten aus 7- 14 Aminosäuren, in Eukaryonten aus 6– 13 zusammen. Sie ist wahrscheinlich für die Bindung des SRP verantwortlich, der die cytosolische Translation der Proteine, die für Export bestimmt sind, stoppt. Außerdem besteht die n-Region aus einer (Eukaryonten) oder zwei (Prokaryonten) positiv geladene Aminosäuren, die wahrscheinlich für die Anheftung an das Docking Protein verantwortlich sind (von Heijne, 1990a,b). Mitochondriale Signalpeptide sind in ähnlicher Art und Weise aufgebaut, sie verfügen neben dem Sekretionssignal über ein positiv geladenes mitochondriales Matrixpeptid und zwei Schnittstellen der Signalpeptidase, die vor und nach der Signalsequenz liegen (Abb.56). Die chloroplastidären Peptide setzen sich aus einem ungeladenen Amionende, einer positiv geladenen mittleren Domäne und einem Carboxyende zusammen, das eine  $\beta$ -Strang-Konformation einnimmt.



**Abb. 56 Signalsequenz eines mitochondrialen Membranproteins.** Nachfolgend einer Domäne, die die Matrix Lokalisation bestimmt (mT: matrix-targeting), schließt sich die Domäne des Signalpeptides (SP) an, die durch die n-, h-, und c-Region gekennzeichnet ist. Die Schnittstellen der Signalpeptidase sind durch Pfeile markiert (von Heijne, 1990a).

#### 4.1.2 Kandidatengene und ihre Lokalisation

Das Ziel der Anreicherung apoplastischer Proteine durch TAST konnte erreicht werden. Nach bioinformatischen Analysen zeigte sich, dass 80% der 600 sequenzierten Gene für Proteine mit Sekretionssignal kodieren. Nach dem Zusammenfügen aller Sequenzen in die entsprechenden Contigs trugen 60% aller Contigs ein Sekretionssignalpeptid. Die restlichen isolierten Gene kodierten für Gene mit chloroplastidären und mitochondrialen Signalpeptiden, sowie für Gene die für cytosolische Proteine kodierten oder deren Signalsequenzen durch die unterschiedlichen Programme nicht übereinstimmend zugeordnet werden konnten. Da die bioinformatischen Programme, die verwendet wurden durch unterschiedliche Datensätze trainiert wurden, können unterschiedliche Zuordnungen vorkommen. Eine Überprüfung der wirklichen Lokalisation müsste anhand von GFP-Lokalisationsanalysen nachgewiesen werden, um eine eventuelle falsche bioinformatische Zuordnung ausschließen und den Nachweis der richtigen Selektion durch TAST erbringen zu können.

Ein Großteil dieser sekretorischen Proteine regenerierter Protoplasten hatte eine unbekannte Funktion. Hydrolasen, wie z.B. die Glykosylhydrolasen (At1g71380, At2g43570, At3g27400, At3g56310, At4g19810, At4g24780 At4g38270) konnten als größte Gruppe der

Zellwandspezifischen Gene identifiziert werden. Hydrolasen spielen bei der Verknüpfung glykosidischer Bindungen während der Entwicklung der Zellwand eine Rolle. Auch Gene der Pathogenabwehr und Stressreaktion wie Chitinasen (At4g19810) oder Hitzeschockproteine (At4g10250) ließen sich durch TAST selektieren.

Vergleiche der durch TAST gefundenen Gene zu schon bekannten veröffentlichten Proteomicsanalysen apoplastischer Proteine in Zellkulturen oder Keimlingen (Anhang Tab.XIV) zeigten sich z.B. Übereinstimmungen in Genen der Stressreaktion (At1g33590, ein Gen unbekannter Funktion, das in TAIR der Abwehr von Krankheiten zugeordnet wurde) (Borderies *et al.*, 2003, Kwon *et al.*, 2005), aber auch zu zellwandspezifische Genen, wie At1g71380 ( $\beta$ -Glukanase) oder At4g24780 (Pektatlyase) (Borderies *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2005). Kandidatengene der Klasse der AGPs (z.B. At2g22470, At3g13520, At1g55330), die einen Großteil der Zellwandproteine bilden, konnten übereinstimmend durch TAST und in Veröffentlichungen der posttranslationalen Modifikation von Borner *et al.* (2003) gefunden werden. Auch Gene, die bereits durch Veröffentlichungen der Genexpressionsanalyse bekannt waren, konnten übereinstimmend mit TAST gefunden werden (z.B. At4g24780) (Che *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2002; Menges *et al.*, 2003).

Die Lokalisation aller 4 gewählten Beispieltene, die durch SignalP3.0 und TargetP1.1 dem Apoplasten zugeordnet wurden, konnte durch die Fusion mit dem Reporter gen GFP verifiziert werden. Nur wenige Gene, die für Proteine mit chloroplastidärer oder mitochondrialer Signalsequenz kodierten, konnten in den 600 sequenzierten Genen gefunden werden. Ein Gen, das durch SignalP3.0 und TargetP1.1 dem Mitochondrium zugeordnet wurde, wurde zur Lokalisationsbestimmung durch GFP gewählt. Die Lokalisation im Mitochondrium konnte nachgewiesen werden. Ein geringer Anteil fehlerhaft selektierter Gene durch TAST ist also möglich. Auch Kandidaten, die über keine Signalsequenz verfügten, traten in der Selektion durch TAST auf. Anhand eines Beispieltene dieser Kategorie konnte die Lokalisation durch die Fusion mit dem Reporter gen GFP nachgewiesen werden. Die Vorhersage einer cytosolischen Lokalisation, die aus der bioinformatischen Analyse der Programme SignalP3.0 und TargetP1.1 hervorging, ließ sich nicht bestätigen. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass das gewählte Gen im Apoplasten und nicht wie vorhergesagt im Cytosol lokalisiert war. So konnte die cytosolische Lokalisationsvorhersage der verwendeten Programme widerlegt werden. Es wäre also nötig, alle durch TAST gefundenen Gene, deren Lokalisation abweichend der apoplastischen anhand der bioinformatischen Analysen vorhergesagt wurde, hinsichtlich ihrer tatsächlichen Lokalisationen in der Zelle zu überprüfen. Obwohl alle Programme, die die Lokalisation eines Proteins in einer Zelle bestimmen, ein wichtiges

Hilfsmittel für die Zuordnung darstellen, sollten sie nur als Vorhersage und möglicher Anhaltspunkt zur Lokalisationsbestimmung gesehen und auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Deutlich lässt sich eine Korrelation zwischen Expression und Anzahl der Transposon-Insertionen in einem Gen ablesen. Hier zeigte sich, dass Gene mit erhöhter Expression auch mehr Transposon-Insertionen trugen als solche, die nur niedrig exprimiert waren. Es ließ sich also schlussfolgern, dass Gene, die mehrfach von einem Transposon getaggt wurden, auch in einem deutlich höheren Maße in der cDNA Bank vertreten waren. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass Gene, die über eine hohe Anzahl Transposon-Insertionen verfügten, auch in der ungetaggtten cDNA gefunden wurden. Das Gen At4g31840, das 71 Transposon-Insertionen in der getaggtten cDNA trug, kann als Beispiel gewählt werden. At4g31840 zeigte nach 58 h der Protoplastenregeneration die höchste Expression aller untersuchten Gene und wurde auch in der ungetaggtten cDNA gefunden. Die mehrfache Insertion der Transposons in einem Gen kann jedoch nur als möglicher Hinweis einer höheren Expression betrachtet werden und liefert keine genaue Aussage über die wirkliche Expression.

### **4.1.3 TAST als Selektionssystem und mögliche Anwendungen in der Zukunft**

Ursprünglich wurde das Transposon tagging durch die Firma Finnzymes Oy, Espoo, Finnland zur Sequenzierung unbekannter Gene entwickelt. Durch die auf dem Transposon vorhandenen Primersequenzen ist eine Sequenzierung getaggtter unbekannter Gene leicht möglich. Auch mit dem SigA2 Transposon wäre eine solche Verwendung in noch nicht bekannten Genomen möglich und könnte für die Aufklärung unbekannter Sequenzen dienen. Die Weiterentwicklung des Transposon taggings durch Becker *et al.* (2004) ermöglichte die Selektion bakterieller Sekretionsproteine. TAST wurde bisher nicht für die Analyse pflanzlicher Sekretionsproteine genutzt. Anhand der erzielten Ergebnisse, die aus dem Tagging der pflanzlichen cDNA hervorgingen konnte gezeigt werden, dass TAST zur Identifikation pflanzlicher Sekretionsproteine verwendet werden kann. TAST bietet also eine einfache Möglichkeit der Selektion und Analyse apoplastischer Proteine aus Pro- und Eukaryonten. Es muss jedoch bedacht werden, dass bei der Selektion apoplastischer Proteine durch TAST bei einer Verknüpfung des prokaryontischen Selektionssystems mit einer eukaryontischen cDNA auch geringe fehlerhafte Selektionen nicht-apoplastischer Proteine auftreten können. Die Sekretionssignale in Pro- und Eukaryonten sind zwar sehr ähnlichen,

aber nicht völlig gleichen. Die durch TAST gefundenen Kandidatengene könnten in Zukunft in ihrer Funktion in der pflanzlichen Zellwand, z.B. durch die Verwendung von Knockout Mutanten in *Arabidopsis* untersucht werden.

Anwendungen des TAST Systems wurden erst kürzlich veröffentlicht. Mygind *et al.* (2005) verwendeten TAST zur Selektion sekretierter Proteine einer cDNA, die aus RNA des Pilzes *Pseudopeziza nigrella* hergestellt wurde. Plectasin, ein Defensin, konnte erstmals aus sekretierten Proteinen dieses Pilzes isoliert werden. Defensine kommen in Pflanzen und Tieren vor und dienen der Abwehr von Mikroben. Plectasin zeigte eine extrem niedrige Toxizität und hohe Wirksamkeit wie Penicillin oder Vacomycin gegen Bauchfell- und Lungenentzündung (Mygind *et al.*, 2005).

## 4.2 Die *uge3-1* Mutante

### 4.2.1 Der *uge3-1* Phänotyp im Vergleich zu anderen Mutanten der *UGE*-Genfamilie

Die Funktion einzelner Gene, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, kann durch das Ausschalten des zu untersuchenden Gens in Knockout Mutanten untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine *Arabidopsis* T-DNA Mutante untersucht, deren Gen nicht durch die Selektion mit Hilfe des TAST-Systems gefunden wurde, sondern in einem phänotypischen Screen anhand ihres Wurzellängenwachstums auf saccharosehaltigem Medium von Dr. Wolf-Rüdiger Scheible (Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland) isoliert wurde. Diese T-DNA Mutante wies ein stark verkürztes Wurzelwachstum auf. Durch Plasmidrescue wurde die Insertion der T-DNA im Gen At1g63180 (UDP-glucose epimerase like protein, *UGE3*) festgestellt. *UGE3* ist ein Gen der *UGE*-Genfamilie, die aus 5 Mitgliedern besteht. Die *UGE*-Genfamilie ist Teil des Nukleotidzucker-Synthesewegs. Aufgrund dieser T-DNA Insertion in einem Gen des Nukleotidzucker-Synthesewegs sollte die Mutante untersucht werden. Der Phänotyp der *uge3-1* Mutante weist große Ähnlichkeiten zu *uge4*, einer schon bekannten Mutante der *UGE*-Genfamilie auf. T.I. Baskin und Kollegen isolierten die Mutante *reb1* (*root epidermal bulger1*), deren epidermale Wurzelzellen kugelförmige waren (Baskin *et al.*, 1992b). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *reb1* Wurzeln im Vergleich zu Wildtypewurzeln 30% weniger AGPs aufwiesen (Ding und Zhou, 1997). Es wurde vermutet, dass AGPs für die Zellexpansion in Pflanzen verantwortlich sind. Seifert *et al.* (2002) konnte zeigen, dass *REB1* allelisch zu *RHD1* (*Root Hair Deficient1*), einem der Gene, der UDP-D-Glukose 4-Epimerase

Familie, nämlich *UGE4*, ist. Wurzeln einer Wildtyppflanze, die mit Yariv-Reagenz behandelt wurden, zeigten den gleichen Phänotyp wie die Wurzeln der *uge4* Mutante. Yariv bindet an die Arabinogalaktan Proteine (AGP) der Wurzel und führt so zu einem verkürzten Wurzelwachstum, sowie einer Bildung kugelförmiger, epidermaler Wurzelzellen (McCartney *et al.*, 2003). Die *uge4* Mutante zeigte bei einem Wachstum auf 1% Saccharose ein um 60-70% verkürztes Wurzelwachstum und die Bildung kugelförmiger, epidermaler Wurzelzellen. Dieser Phänotyp ähnelt dem der *uge3-1* Mutante sehr. *uge3-1* wies im Gegensatz zu *uge4* ein noch stärker verkürztes Wurzelwachstum auf. Der Phänotyp der *uge4* Mutante konnte durch 5 mM Galaktose im Wachstumsmedium komplementiert werden und führte zu einem dem Wildtypen entsprechenden Wurzellängenwachstum. Die Form der Epidermiszelle und die Länge der *uge4* Wurzeln entsprachen nach der Komplementation auf Galaktose der des Wildtypen. In *uge3-1* war bei einer Zugabe von 40 mM Galaktose zum Wachstumsmedium nur eine Komplementation der kugelförmigen Epidermiszellen, jedoch nicht der Wurzellänge möglich. Auch durch die genetische Komplementation der *uge3-1* Mutante konnte nur eine Teilkomplementation erzielt werden.

Ein vollständiger Verlust des *UGE3* Transkripts und damit der Beweis des Knockout des *UGE3*-Gens in *uge3-1* konnte nicht nachgewiesen werden, sondern lediglich eine Abschwächung des *UGE3*-Transkripts in *uge3-1* konnte gezeigt werden. Es zeigte sich, dass möglicherweise nicht die T-DNA Insertion in *UGE3* für den Phänotyp der *uge3-1* Mutante verantwortlich war, sondern eine zweite Mutation im Genom den Phänotyp der *uge3-1* Mutante hervorrief. Auch die Ergebnisse der chemischen Komplementation lassen vermuten, dass nicht nur die T-DNA Insertion im *UGE3*-Gen für die starke Verkürzung der Wurzellänge der *uge3-1* Mutante verantwortlich ist. Unterstützt wird diese These durch ebenfalls nicht vollständige genetische Komplementation der Wurzellänge. Die phänotypische Teilkomplementation hätte jedoch auch durch Artefakte hervorgerufen werden können. Diese Artefakte könnten bei der Transformation und Insertion der T-DNA (die das *UGE3*-Gen trug) in *uge3-1* entstanden sein.

Durch die Ergebnisse der Segregationsanalyse der gekreuzten Linien der *uge4x3* konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den untersuchten Mutanten der *uge4x3* Linien um Doppelmutanten handelte. Vielmehr konnte bewiesen werden, dass neben den T-DNA Insertion in *UGE3* und *UGE4* noch eine weitere Mutation in einem noch unbekanntem Gen vorhanden sein muss. Rückkreuzungen mit einer *Arabidopsis* Wildtypelinie und anschließendes Mapping des unbekanntem Gens könnten klären, welche Mutation den Phänotyp der *uge3-1* Mutante hervorruft. Der Phänotyp der *uge3-1* Mutante wurde also nicht

durch die T-DNA Insertion in *UGE3* hervorgerufen, sondern durch eine weitere Mutation im Genom. Durch die Insertion und anschließende Mobilisierung der T-DNA an einer Stelle außerhalb des *UGE3* Gens könnte es zu einer Deletion oder zu Footprints der T-DNA und somit zu einer Mutation in einem zweiten Gen in der *uge3-1* Mutante gekommen sein.

#### **4.2.2 Die Analyse der galaktosehaltigen Verbindungen in den Mutanten der *UGE*-Genfamilie**

Untersuchungen der Galaktolipide zeigten sowohl in *uge4* als auch in *uge3-1* keine Veränderung zum Wildtypen. Weder *UGE3* (oder das noch unbekannte Gen in *uge3-1*) noch *UGE4* sind also an der Bildung der Galaktolipide beteiligt. Die Zusammensetzung der Monosaccharide der Wurzelzellwand ließen eine Reduktion der Galaktose um ca. 20% und einen Anstieg an Rhamnose um 20% in den Wurzelzellwänden der *uge4* Mutante erkennen. In *uge3-1* konnten keine Unterschiede im Galaktosegehalt der Wurzelzellwand gefunden werden. Lediglich der Gehalt an Xylose war in der Wurzel der *uge3-1* Zellwänden um 6% reduziert. Durch Antikörpermarkierung konnte gezeigt werden, dass *UGE4* für die Bildung der fukosylierten Xyloglukane (durch CCRC-M1) der Epidermis- Cortex-, und Endodermiszellen der Wurzel, sowie der arabinosylierten Galaktane (durch CCRC-M7) der Epidermis essentiell ist. Außerdem zeigte sich, dass *UGE4* für die Bildung der Galaktoseseitenketten von RGI der Epidermis (durch LM5), sowie der Glukuronosylreste der AGPs (durch LM2) der Wurzelhaarzellen verantwortlich ist (Seifert *et al.*, 2002; 2004). Vergleicht man diese durch die Antikörpermarkierung erzielten Ergebnisse mit denen der *uge3-1* Mutante, so zeigt sich, dass sowohl *UGE4* als auch *UGE3* (und /oder das noch unbekannte Gen in *uge3-1*) an der Bildung der fukosylierten Xyloglukane in Epidermis-Cortex-, und Endodermiszellen beteiligt sind. Bei einer Reduktion an Galaktose in der Wurzelzelle kann also die endständige Fukose nicht mehr über ein Galaktose- und Xylosemolekül an Glukose-Rückgrat des Xyloglukans gebunden werden. In *uge3-1* zeigte sich allerdings, dass die Abnahme der fukosylierten Xyloglukane in den Zellen der Epidermis, Cortex und Endodermis zu einer Zunahme fukosylierter Xyloglukane im Zentralzylinder führte. Ein ähnliche Kompensation ließ sich in *uge3-1* erkennen, in deren Wurzeln  $\alpha$ -L-fukosyliertem Rhamnogalakturonan I (RGI) in den Epidermiszellen abnahm, während der Anteil in der Cortex zunahm. *UGE3*, oder das noch unbekannte Gen in *uge3-1* ist wie *UGE4* für die Bildung der Galaktoseseitenketten von RGI der Epidermis, aber auch des Cortex und der Endodermis essentiell. McCartney *et al.* (2003) zeigten, dass das gleiche Muster der Antikörpermarkierung durch LM5 in Wurzelquerschnitten von Wildtyppflanzen vorhanden

ist, die mit Yariv behandelt wurden. *UGE3*, oder das noch unbekannte Gen in *uge3-1* und *UGE4* sind also für die Bildung der AGPs in den Wurzeln verantwortlich. In *uge3-1* zeigte sich außerdem eine geringe Abnahme der  $\alpha$ -1,5-L-Arabinose des RGI in den Epidermiszellen der Wurzel.

*UGE1* als weiteres Mitglied der UGE-Familie wurde von P. Dörmann und C. Benning untersucht (Dörmann und Benning, 1998). Auch hier ließen sich in den erzielten Ergebnissen Übereinstimmungen zur Untersuchung der *uge3-1* Mutante finden. Die untersuchten Überexpressions- und Antisenselinien des *UGE1* Gens zeigten keinen abweichenden Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Die Lipidanalyse von Pflanzen beider Linien zeigten keine Unterschiede zum Wildtypen, wie auch in den Mutanten *uge3-1* und *uge4*. Also ist auch *UGE1* neben *UGE3* (oder dem noch unbekannte Gen in *uge3-1*) und *UGE4* nicht für die Bildung der Galaktolipide verantwortlich. Weder in den Pflanzen der *UGE1*-Antisense- und *UGE1*-Überexpressionslinie ließen sich Unterschiede im Gehalt der UDP-Glukose oder UDP-Galaktose, sowie im Galaktosegehalt der Zellwand finden. Die *UGE1*-Überexpressionslinie konnten im Gegensatz zur *UGE1*-Antisenselinie und zum Wildtypen gut auf 1% Galaktose wachsen und somit die Toxizität dieser hohen Galaktosekonzentration überwinden. Die *UGE1*-Antisenselinie zeigte bei einem Wachstum auf 1% Galaktose eine noch höhere Sensitivität zu Galaktose als der Wildtyp. Wurden Pflanzen mit veränderter *UGE1* Expression auf galaktoshaltigem Medium gezogen, so zeigte sich in den *UGE1*-Antisense-Pflanzen, wie auch im Wildtypen, ein erhöhter Einbau an Galaktose in die Zellwand im Vergleich zu *UGE1*-Antisense- oder Wildtyp-Pflanzen die auf 1% Glukose wuchsen. *UGE1*-Überexpressionspflanzen, die auf 1% Galaktose wuchsen zeigten im Vergleich zu Wildtyppflanzen, die auf 1% Glukose wuchsen keinen Unterschied, während der Gehalt an Galaktose in den Zellwänden der *UGE1*-Überexpressionspflanzen, die auf 1% Galaktose wuchsen im Vergleich zum Wildtyp oder *UGE1*-Antisensepflanzen, die auf 1% Galaktose wuchsen reduziert war.

### **4.2.3 Stärkeakkumulation und Phosphatmangel als mögliche Verursacher des *uge3-1* Phänotyps**

Nach einem Transfer von Wildtyppflanzen von 1% Saccharose auf 1% Galaktose konnte ein Anstieg des Stärkegehalts von 0,88  $\mu\text{mol/g}$  auf 7,34  $\mu\text{mol/g}$  in den Blättern der Pflanzen gemessen werden. Im Vergleich zum Wildtypen blieb der Gehalt an Stärke in den Blättern der *UGE1*-Überexpressionslinie konstant, wohingegen ein bis zu 40-facher Anstieg an Stärke in den Blättern der Antisenselinie zu messen war. Unabhängig von der Art des

Wachstumsmediums und der Linie konnte ein dem Wildtyp entsprechender Verlauf des Stärkeaufbaus während des Tages und des Stärkeabbaus während der Nacht in den *UGE1*-Antisense- und Überexpressionslinien festgestellt werden. Dörmann und Benning (1998) folgerten daraus, dass die Glukose oder Galaktose des Mediums nicht zum Aufbau der Stärke verwendet wurde, sondern in den Wildtyp-Pflanzen durch einen möglicherweise auftretenden Phosphatmangel Stärke nur noch vermindert abgebaut werden konnte. Der Mangel an Phosphat wird durch die Zuckeraufnahme einer externen Zuckerquelle hervorgerufen. So kann Galaktose z.B. nur unter der Bildung von Galaktose-1-P in die Pflanze aufgenommen werden (Loughman *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1988). Möglicherweise vermindert Phosphatmangel in diesen Pflanzen den Export von Zuckern aus den Chloroplasten und führt damit zu einem verminderten Abbau von Stärke in den Chloroplasten. Die Metabolitenanalyse von Sprossen und Wurzeln der *uge3-1* Mutante zeigte einen deutlichen Anstieg der Phosphatzucker. Auch in den Messungen der Stärke in Pflanzen, die auf Medien höher Saccharosekonzentration wuchsen, zeigte sich eine deutliche Zunahme des Stärkegehalts in den Blättern der *uge3-1* Mutante im Vergleich zum Wildtypen Col-0. Hingegen zeigten Pflanzen der *uge3-1* Mutante, die ohne Zuckerquelle oder auf Erde im Gewächshaus wuchsen, eine Abnahme an Stärke im Vergleich zum Wildtypen. Ein dem Wildtypen entsprechender Tag-/Nacht-Rhythmus des Stärkeauf- und Abbaus konnte in Pflanzen der *uge3-1* Mutante gemessen werden, so dass auch hier der Schluss zulässig ist, dass nicht die externe Zuckerquelle, sondern vielmehr die Mobilisierung der Stärke je nach Zuckerquellen unterschiedlich ist. Möglicherweise ist *uge3-1* nicht in der Lage, dieselben Mengen an Stärke wie der Wildtyp bei einem Wachstum ohne externe Zuckerquelle zu produzieren, wohingegen die Mobilisierung der synthetisierten Stärke beim Vorhandensein einer externen Zuckerquelle in *uge3-1* vermindert ist und so ein geringerer Abbau als in den Pflanzen des Wildtypen stattfinden kann.

Sánchez-Calderón *et al.* (2005) zeigten, dass Phosphat für die Architektur und Wachstumsweise der Wurzel essentiell ist. Das Wachstum der primären Hauptwurzel war in den ersten 4 Tagen nach der Samenkeimung bei Pflanzen, die auf hohen (1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) und niedrigen (1  $\mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) Phosphatkonzentrationen wuchsen gleich. Im weiteren Verlauf des Wachstums verlängerte sich die Hauptwurzel bei einem Wachstum auf niedrigen Phosphatkonzentrationen nicht mehr. Außerdem wurden verstärkt Seitenwurzeln gebildet. Nach 10 Tagen konnte eine Reduktion der Wurzellänge um 70% im Vergleich zu Wurzeln hoher Phosphatkonzentrationen gemessen werden. Außerdem zeigte sich, dass die Zellen der durch niedrige Phosphatkonzentrationen gestressten Wurzeln eine niedrigere Zellteilung

aufwiesen. Die Differenzierung dieser Zellen war erhöht, erkennbar an der schon frühen Bildung von Wurzelhaaren in der Elongationszone der Wurzel. Dieser beobachtete Phänotyp der verkürzten Wurzeln und erhöhten Anzahl an Seitenwurzeln entspricht der *uge3-1* Mutante. Das Wachstum der *uge3-1* Mutante auf einer externen Zuckerquelle führt also möglicherweise zu Phosphatmangel-bedingtem Stress in der Pflanze. Allerdings führte die externe Zugabe an Phosphat nicht zu einer vollständigen Komplementation des *uge3-1* Phänotyps.

Eine weitere Ursache des Anstiegs der Stärkekonzentration in den Blättern der *uge3-1* Mutante bei einem Wachstum auf einer externen Zuckerquelle wäre möglicherweise der zugleich erhöhte Trehalosegehalt in den Wurzeln der *uge3-1* Mutante. Trehalose ist ein Disaccharid, das den Metabolismus und die Entwicklung der Pflanze beeinflusst und in der Stressreaktion der Pflanze zum Schutz gebildet wird. In *Arabidopsis* kann es bei einer Unterdrückung des Enzyms Trehalase (hydrolysiert Trehalose) durch Valin zu einer Anhäufung von Trehalose kommen (Müller *et al.*, 2001). Trehalose führt in *Arabidopsis* Keimlingen zu einer unterdrückten Wurzelelongation und Akkumulation von Stärke in den Blättern (Wingler *et al.*, 2000). In den Wurzeln der *uge3-1* Mutante konnte ein erhöhter Gehalt an Trehalose und Valin im Metaboliten Profiling festgestellt werden, außerdem ließ sich ein Anstieg an Saccharose in den Sprossen dieser Pflanzen messen. Möglicherweise führen Phosphatmangel-bedingter Stress und/oder die Anhäufung von Trehalose bei einem Wachstum auf einer externen Zuckerquelle in den Blättern der *uge3-1* Mutante zu einer Anhäufung von Stärke und zu einer Reduktion von Stärke in den Wurzeln.

Ein verändertes Gravitationsverhalten konnte in den Wurzeln der *uge3-1* nicht festgestellt werden. Kiss *et al.* (1996) zeigte, dass Wurzeln, die über einen geringeren Stärkegehalt als Wildtyppflanzen verfügten, nicht der Gravitation entsprechend senkrecht nach unten wuchsen. Dieses abweichende Muster des Wurzelwachstums ließ sich nur bei Pflanzen feststellen, deren Stärke in den Wurzeln um mehr als 51% gegenüber dem Wildtyp vermindert war. In *uge3-1* lag die Reduktion der Stärke in den Wurzeln nur bei 34%.

In den Blättern der *uge3-1* Mutante kam es bei einem Wachstum im Gewächshaus zu einer Reduktion von Raffinose und Stärke. Nach einem Transfer der Pflanzen in 4°C ließ sich jedoch eine Steigerung an Raffinose und Stärke messen. Raffinose ist ein Galaktosyl-Saccharose Oligosaccharid, das als Speicher- und Transportkohlenhydrat dient. Raffinose wird vermehrt bei Stress, induziert durch Wassermangel, Hitze oder Kälte, in der Zelle synthetisiert. *uge3-1* ist also ohne Kälteinduktion nicht in der Lage, gleiche Mengen Raffinose und Stärke wie der Wildtyp zu bilden. Wie schon zuvor vermutet, akkumuliert *uge3-1* als

Reaktion auf Stress wie Kälte oder möglicherweise Phosphatmangel Stärke in den Chloroplasten. Möglicherweise übernimmt ein weiteres Mitglied der *UGE*-Genfamilie die vermehrte Produktion von Raffinose. Es müsste untersucht werden, wie sich die restlichen Mitglieder der *UGE*-Genfamilie nach der Kälteinduktion in *uge3-1* verhalten. Die Daten des AtGenexpress zeigen deutlich, dass *UGE2* und *UGE5* bei einer Induktion durch Kälte eine höhere Expression in Wurzeln und Sprossen aufweisen als die restlichen Mitglieder der *UGE*-Genfamilie.

#### **4.2.4 Das Zusammenspiel der *UGE*-Isoformen**

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich teilweise die selben Unterschiede in der Mutante *uge3-1*, der Knockout-Linie *uge4* und den *UGE1*-Antisense-/Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtypen finden ließen. Seifert *et al.* (2004) stellte die Hypothese auf, dass die Synthese der UDP-Galaktose und der anschließende Transport in die einzelnen Zellkompartimente je nach *UGE*-Isoform unterschiedlich ist. *UGE1* spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Bildung der Galaktane, die Bestandteile der Pektine sind, während *UGE3* in Kooperation mit *UGE4* für die Bildung der AGPs verantwortlich ist. Doch nicht nur die einzelnen *UGE*-Isoformen sind entscheidend für die Bildung des Nukleotidzuckers UDP-Galaktose, sondern auch die Interaktion der cytosolischen *UGEs*, der Golgi-lokalisierten Nukleotidzucker-Transporter und polymerspezifischer Galaktose-Transporter (Seifert *et al.*, 2004; Seifert, 2004).

#### **4.2.5 Mutanten mit verkürztem Wurzelwachstum**

Neben den gleichen Unterschieden, die durch Untersuchungen der einzelnen Mitglieder der *UGE*-Genfamilie durch Mutanten mit veränderter Expression im Vergleich zum Wildtypen festgestellt werden konnten, ließen sich einige Unterschiede im Vergleich von *uge3-1* und Wildtyppflanzen nicht erklären, da die Lokalisation des zweiten Gendefekts in *uge3-1* noch unbekannt ist. Zur Lokalisation der zweiten Mutation in *uge3-1* können nur Vermutungen angestellt werden. Schwierig ist eine Vorhersage, an welcher Stelle des Genoms die zweite Insertion erfolgt, da Wurzelmutanten durch die verschiedensten Mutationen hervorgerufen werden können. So sind z.B. Transkriptionsfaktoren wie die so genannten DELLA Proteine, die Ziele der Wachstumsregulatoren sind, für die Koordination der Zellexpansion in Pflanzen verantwortlich (Peng *et al.*, 1997). Regulatoren der Zellexpansion in den pflanzlichen Wurzeln sind Gibberellin (GA), Auxin und Ethylen. Unter dem Einfluss von Auxin oder Ethylen wird die Elongation der Wurzel verhindert und eine radiale Expansion der Wurzel hervorgerufen (Mussig *et al.*, 2003). Bei einer zu geringen Menge an GA entwickeln Pflanzen

dagegen verkürzte Wurzeln. Mutanten der DELLA Proteine *gai* (*gibberellic acid insensitive*) und *rga* (*repressor of gai-3*) zeigten ein zwerghaftes Wachstum (Fu und Harberd, 2003). *SHR* (*SHORT ROOT*) ist ein Gen, das für einen weiteren putativen Transkriptionsfaktor kodiert und für die Zellteilung und Spezifikation der Wurzelzellen verantwortlich ist. *shr* ist eine Mutante, die ein verkürztes Wurzelwachstum aufweist und über eine gesteigerte Zellteilung der Wurzelzellen verfügt. Diese bilden abnorme Zellspezifikationen in der Wurzel aus (Helariutta *et al.*, 2000).

Neben den Transkriptionsfaktoren spielen Ionen, wie Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Wurzel.  $\text{Ca}^{2+}$  ist an der polaren Expansion der Wurzelhaare beteiligt. Wurzeln können bei einer mangelhaften  $\text{Ca}^{2+}$ -Versorgung der Wurzelhaare, eine veränderte Form aufweisen. *RHD2* (*ROOT HAIR DEFICIENT2*) kodiert für einen NADPH-Oxidase, die die Calcium-Kanäle in den Wurzelhaaren aktiviert. Die Aktivität dieser Kanäle ist für die Bildung eines Calciumgradienten in den Spitzen der wachsenden Wurzelhaare verantwortlich (Foreman *et al.*, 2003). *rhd2* kann diesen Gradienten nicht aufbauen und bildet so nur den Ansatz eines Wurzelhaares. Ein normales Wurzelhaar kann hierbei nicht ausgebildet und verlängert werden. Kalium ( $\text{K}^+$ )-Kanäle sind in *Arabidopsis* für die Aufnahme von  $\text{K}^+$ , ein osmotisch aktives Ion, das am Zellwachstum beteiligt ist, verantwortlich. Bei geringen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen im Medium kann die *Arabidopsis* Mutante *akt1* nicht genug  $\text{K}^+$  aufnehmen. *akt1* ist kleinwüchsig und entwickelt nur Wurzeln mit verkürzten Wurzelhaaren (Debrosses *et al.*, 2003). Die Mutante *cax1* (*Arabidopsis cation exchanger1*) trägt eine Mutation im  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter und ist nicht in der Lage, Wurzeln normaler Länge auszubilden (Cheng *et al.*, 2003).

Nicht nur die Aufnahme von Ionen in die Zellen der Wurzeln ist essentiell für ihre Entwicklung. *RHD3* (*ROOT HAIR DEFICIENT3*) kodiert für ein kleines G-Protein, unbekannter Funktion, ist aber wahrscheinlich für das Wachstum der Vakuole verantwortlich. Die Wasseraufnahme in die Vakuole kann das Zellvolumen während der Expansion steigern und damit essentiell für eine normale Zellentwicklung sein. *rhd3* ist eine Mutante, deren Vakuole kleiner als die des Wildtypen ist. Die Wurzeln der *rhd3* Mutante sind verkürzt und ihre Wurzelhaare wachsen in welliger Form (Wang *et al.*, 1997).

Auch die Zellwand ist wichtig für die Entwicklung der Wurzel- und Wurzelhaarzellform. Die Wurzelzellen der Elongationszone der *Arabidopsis* Mutante *cobra* (*cob*) dehnen sich im Vergleich zum Wildtypen nur radial aus. Sie weisen einen größeren Durchmesser als die des Wildtypen auf. *COB* kodiert für ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Zelloberflächenprotein, das in den wachsenden Wurzelzellwänden der Elongationszone

vorkommt, die genaue Funktion von *COB* ist jedoch noch unbekannt (Schindelman *et al.*, 2001). Eine weitere Mutante mit verkürztem Wurzelwachstum ist *kob1* (*Arabidopsis kobito1*). *KOB1* kodiert für ein Plasmamembran-gebundenes Protein, das an der Synthese der Zellulose beteiligt ist (Pagant *et al.*, 2002). Auch die Mikrotubuli der Zelle sind für das Wachstum der Zelle und die Richtung der Zellexpansion verantwortlich. Bei einem Defekt der Mikrotubuli weisen die betroffenen Zellen eine abnormale Zellexpansion auf. Sie sind während der Zellexpansion für die Orientierung der Zellulosefasern der Zellwand verantwortlich sind. Die Wurzeln der Mutanten *lefty2* und *lefty1*, die eine Mutation in den  $\beta$ -Tubulinen TUA4 und TUA6 tragen, wachsen in einer Linkswindung. Die Windung der Zellen kommt in den Mutanten durch die fehlerhaften  $\beta$ -Tubuline zustande, die die Zellen während der Elongation in eine falsche Richtung wachsen lassen (Thitamadee *et al.*, 2002). Wurzelphänotypen können also durch Defekte einer Vielzahl von Genen hervorgerufen werden.

## 5. Zusammenfassung

Obwohl in den letzten Jahren die Struktur der pflanzlichen Zellwand eingehend untersucht wurde, blieben die Vorgänge bei der Zellwandsynthese und die hierbei wirksamen Transportsysteme weitgehend unbekannt. Der pflanzliche Golgiapparat spielt bei der Synthese der primären Zellwand eine zentrale Rolle, denn in ihm werden Matrix-Polysaccharide, aber auch der Proteoglykane synthetisiert. Diese werden vom Golgiapparat in Vesikeln durch das Cytoplasma zum Apoplasten, dem Raum zwischen Plasmamembran und Cuticula, transportiert, dort freigesetzt und so in die Zellwand eingebaut.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war, apoplastische Proteine, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind, zu identifizieren. Dazu wurde das Transposon-basierte TAST (Transposon assisted signal trapping) Selektionssystem verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass TAST eine Anreicherung apoplastischer Proteine aus einer cDNA regenerierter Protoplasten ermöglicht. Die Expressionsanalyse einiger Kandidatengene zeigte, dass Gene, die für zellwandspezifische apoplastische Proteine kodieren, in den ersten Stunden der Protoplastenregeneration exprimiert werden. Die korrekte Selektion sekretorischer Proteine durch TAST konnte durch GFP-Fusion bewiesen werden, die eine Lokalisation einiger Kandidatengene im Apoplasten verifizierte.

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse einer T-DNA Mutante mit Insertion im *UGE3*-Gen (UDP-Glukose Epimerase), einem Gen des Nucleotidzucker-Synthesewegs. Die Mutante zeigt eine starke Verkürzung der Wurzellänge bei einem Wachstum auf saccharosehaltigem Medium. Die Zellwandmonosaccharide dieser Mutante unterschieden sich nicht vom Wildtypen. Hingegen konnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Arabinogalaktan Proteine (AGPs) der Wurzelzellwand festgestellt werden. Eine chemische oder genetische Komplementation der *uge3-1* Mutante war nicht möglich. Vermutlich wurde das stark verkürzte Wurzelwachstum nicht durch die T-DNA Insertion in *UGE3* hervorgerufen, sondern durch eine weitere Mutation im Genom der *uge3-1* Mutante.

## 6. Referenzen

Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422, 198-207.

Albersheim P, Nevins DJ, English PD, Karr A (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res*. 5, 340-345.

Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom C (2004) Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol*. 45, 1543-1556.

Altmann T, Damm B, Halfter U, Willmitzer L, Morris PC (1992) Protoplast transformation and methods to create specific mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: *Methods in Arabidopsis research*. Koncz C, Chua NH, Schell J (Eds) World Scientific, Singapore, pp 310-330.

Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP (1995) A membrane-associated form of synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 92, 9353-9357.

Arretz M, Schneider H, Wienhues U, Neupert W (1991) Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed Biochim Acta*. 50, 403-12.

Bae MS, Cho EJ, Choi EY, Park OK (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J*. 36, 652-663.

Baldwin TC, Handford MG, Yuseff MI, Orellana A, Durpee P (2001) Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 13, 2283-2295.

Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*. 18, 298-305.

Baskin TI, Busby CH, Fowke LC, Sammut M, Gubler F (1992a). Improvements of immunostaining of samples embedded in methacrylate: Localization of microtubules and other antigens throughout the developing organs in plants of diverse taxa. *Planta*. 187, 395-405.

- Baskin TI, Betzner AS, Hoggart R, Cork A, Williamson RE (1992b) Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust J Plant Physiol.* 19, 427-437.
- Becker F, Schnorr K, Wilting R, Tolstrup N, Bendtsen JD, Olsen PB (2004) Development of in vitro transposon assisted signal sequence trapping and its use in screening *Bacillus halodurans* C125 and *Sulfolobus solfataricus* P2 gene libraries. *J Microbiol Methods.* 57, 123-33.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology.* 340, 783-795.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem.* 54, 484-489.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot.* 53, 1367-1376.
- Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter WD (1997) The *MURI* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalysing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 2085-2090.
- Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Jauneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerre-Tugaye MT, Boudet A, Pont-Lezica R (2003) Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: A critical analysis. *Electrophoresis.* 24, 3421-3432.
- Borner GHH, Sherrier DJ, Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P (2002) Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiol.* 129, 486-499.
- Borner GHH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132, 568-577.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerre-Tugaye MT, Pont-Lezica R (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics.* 5, 212-221.
- Brown RM, Saxena IM, Kudlicka K (1996) Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in plant science.* 1, 149-156.
- Bruening G, Lyons JM (2000) The case of the FLAVR SAVR<sup>TM</sup> tomato. *California Agriculture,* 54, 6-7.
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural model of primary cell walls in flowering plants – consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *Plant J.* 3, 1-30.

- Carpita NC, McCann M (2000) The cell wall. In: Biochemistry and Molecular Biology of plants. Buchanan BB, Gruissem W, Jones R (Eds), Beltsville: Am. Soc. Plant Physiol. pp 52-108.
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 49, 281-309.
- Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R, Canut H (2005) Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry*. 66, 453-461.
- Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 14, 2771-2785.
- Cheng NH, Pitman JK, Barkla BJ, Shigaki T, Hirschi KD (2003) The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *Plant Cell*. 15, 347-364.
- Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu XL, Knox JP, Bolwell P, Slabas AR (2002) Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis*. 23, 1754-1765.
- Cosgrove DJ (1997) Assembly and enlargement of the primary wall in plants. *Annual Rev Cell Dev. Biol.* 13, 171-201.
- Cosgrove, DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 50, 391-417.
- Cosgrove DJ (2003) Expansion of the plant cell wall. In: The Plant cell wall, Annual Plant Review, J.K.C. Rose (Ed.) Vol. 8. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK and CRC Press, Boca Raton, FL, pp 237- 263.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Colebatch G, Kloska S, Trevaskis B, Freund S, Altmann T, Udvardi MK (2002) Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15, 411-420.
- Coutinho PM, Henrissat B (1999a) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson B (Eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 3-12.
- Coutinho PM, Henrissat, B. (1999b) The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation. Ohmiya K, Hayashi K, Sakka K, Kobayashi Y, Karita S, Kimura T (Eds.) Uni Publishers Co., Tokyo, pp 15-23.
- Czechowski T, Bari RP, Stitt M, Scheible WR, Udvardi MK (2004) Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J.* 38, 366-379.

- Dani V, Simon WJ, Duranti M, Croy RRD (2005) Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*. 5, 737-745.
- Das A, Xie YH (1998) Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol Microbiol*. 27, 405-414.
- Delmer DP, Stone BA (1988) Biosynthesis of plant cell walls. In: *The Biochemistry of Plants*. Preiss J (Ed) Vol 14, Academic Press, San Francisco, pp 373-420.
- Debrosses G, Josefsson C, Rigas S, Hatzopoulos P, Dolan L (2003) AKT1 and THR1 are required during root hair elongation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 54, 781-788.
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Rhandhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar seed beta-mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science*. 303, 363-366.
- Ding L, Zhou JK (1997) A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta*. 203, 289-294.
- Dische Z (1962) Colour reactions of carbohydrates. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler RL, Wolfrom ML (Eds), Vol. 1. Academic Press Inc, New York, NY, pp 478-548.
- Doco T, Williams P, Vidal S, Pellerin P (1997) Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymatic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate Res.* 297, 181-186.
- Dörmann P, Hoffmann S, Balbo I, Benning C (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell*. 7, 1801-1810.
- Dörmann P, Benning C (1996) Functional Expression of 5'-Diphospho-Glucose 4-Epimerase (EC.5.1.3.2) from *Arabidopsis thaliana* in *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 327, 27-34.
- Dörmann P, Benning C (1998) The role of UDP-glucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*. *Plant J*. 13, 641-652.
- Dupree P, Sherrier DJ (1998) The plant Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1401, 259-270.
- Elortza F, Nühse TS, Foster LJ, Stensballe A, Peck SC, Jensen ON (2003) Proteomic Analysis of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2, 1261-1270.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*. 300, 1005-1016.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res*. 8, 175-185.

- Feingold DS, Avigad G (1980) Sugar nucleotide transformation in plants. In: The Biochemistry of Plants. Stumpf PK, Conn EE (Eds), Vol 3. Academic Press, New York, pp 101-170.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422, 422-446.
- Freshour G, Bonin CP, Reiter WD, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG (2003) Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the mur1 mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 131, 1602-1612.
- Fry SC (1988) The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis. Harlow: Longmann Sci. Technic.
- Fry SC (1989) The structure and function of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40, 1-12.
- Fry SC (1995) Polysaccharide modifying enzymes in the plant cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 46, 497-520.
- Fry SC, York WS, Albersheim P (1993) An ambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharide. *Physiol. Plant.* 89, 1-3.
- Fu X, Harberd NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*. 421, 740-743.
- Gentschev I, Maier G, Kranig A, Goebel W (1996) Mini-Tn<sup>hly</sup>As: a new tool for the construction of secreted fusion proteins. *Mol Gen Genet.* 252, 266-74.
- Gibeaut DM, Carpita NC (1994) Biosynthesis of the plant cell wall polysaccharides. *FASEB Journal*. 8, 904-915.
- Gibeaut DM (2000) Nucleotide-sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol Biochem.* 38, 69-80.
- Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, Geigenberger P, Stitt M (2002) Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J.* 30, 221-235.
- Gibson CM, Caparon MG (2002) Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 68, 928-932.
- Handford MG, Sicilia F, Brandizzi F, Chung JH, Dupree P (2004) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi-localised nucleotide sugar transporters related to GONST1. *Mol Gen Genomics.* 272, 397-410.
- Haslam RP, Downie AL, Raveton M, Gallardo K, Job D, Pallett KE, John P, Parry MAJ, Coleman JOD (2003) The assessment of enriched apoplastic extracts using proteomic approaches. *Annals of Applied Biology.* 143, 81-91.

- Hawlitsek G, Schneider H, Schmidt B, Tropschug M, Hartl FU, Neupert W (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*. 53, 795-806.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signalling. *Cell*. 101, 555-567.
- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol*. 133, 838-849.
- Höfgen R, Willmitzer L (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato *Solanum tuberosum*. *Plant Sci*. 66, 221-230.
- Huxley TH (1853) Review I: The Cell Theory. British and Foreign Medico-Chirurgical Review or Quarterly Journal of Practical Medicine and Surgery. Vol. 12 (July-October 1853). London: John Churchill and Samuel Highley. (285-314) 290-292.
- Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kritz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, Stover J, Williamson MJ, McCoy JM (1997) A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene*. 198, 289-296.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions:  $\beta$ -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *EMBO J*. 6, 3901-3907.
- Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, Hajirezaei MR, Stitt M (1992) Inorganic pyrophosphate content and metabolites in leaves and tubers of potato and tobacco plants expressing *E.coli* pyrophosphatase in their cytosol: biochemical evidence that sucrose metabolism has been manipulated. *Planta*. 188, 238-244.
- Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C, Andersen CAF, Knudsen S, Krogh A, Valencia A, Brunak S (2002) Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features. *Journal of Molecular Biology*. 319, 1257-1265.
- Jones L, Seymour GB, Knox JP (1997) Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Galactan. *Plant Physiol*. 113, 1405-1412.
- Jouanneau JP, Péaud-Lenoël C (1967) Growth and synthesis of proteins in cell suspensions of a kinetin dependent tobacco. *Physiol Plant*. 20, 834-850.
- Jung E, Heller M, Sanchez JC, Hochstrasser DF (2000) Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis*. 21, 3369-3377.
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 60, 2299-2301.

- Kawamura Y, Uemura M (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* 36, 141-154.
- Keegstra K, Raikhel N (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol.* 4, 219-224.
- Keller R, Brearley CA, Trethewey RN, Müller-Röber B (1998) Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-*myo*-inositol 3-phosphate synthase. *Plant J.* 16, 403-410.
- Kieliszewski MJ, Shpak E (2001) Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 1386-1398.
- Kiss ZJ, Wright JB, Caspar T (1996) Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 97, 237-244.
- Komalavilas P, Mort AJ (1989) The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich region of pectins. *Carbohydr.Res.* 189, 261-272.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kwon HK, Yokoyama R, Nishitani K (2005) A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of Arabidopsis suspension-cultured cells. *Plant & Cell Physiology.* 46, 843-857.
- Lai-Kee-Him J, Chanzy H, Müller M, Putaux JL, Imai T, Bulone V (2002) *In Vitro Versus in Vivo* Cellulose Microfibrils from Plant Primary Wall Synthases: Structural Differences. *J. Biol. Chem.* 277, 36931-36939.
- Lalanne E, Honys D, Johnson A, Borner GHH, Lilley KS, Dupree P, Grossniklaus U, Twell D (2004) SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell.* 16, 229-240.
- Lampart DTA (2001) Life behind cell walls: paradigm lost, paradigm regained. *Cell Mol.Life Sci.* 58, 1363-1385.
- Lerouge P, O'Neill MA, Darviele AG, Albersheim P (1993) Structural characterisation of endo-galactanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydr. Res.* 243, 359-371.
- Lerouxel O, Choo TS, Seveno M, Usadel B, Faye L, Lerouge P, Pauly M (2002) Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiol.* 130, 1754-1763.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 603, 591-592.

- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem.* 163, 16-20.
- Loughman BC, Ratcliffe RG, Schwabe JWR (1989) Galactose metabolism in *Zea mays* root tissues observed by <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. *Plant Sci.* 59, 11-23.
- Mathon T, Kawaguchi S, Kobayashi M (1996) Ubiquity of borate rhamnogalacturonan II complex in the cell wall of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 636-640.
- Mathon T, Takasaki M, Kobayashi M, Takabe K (2000) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. III Characterization of the boron rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron. *Plant Cell Physiol.* 41, 363-366.
- McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox JP (2003) Cell wall pectic (1→4)-β-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J.* 33, 447-454.
- McNeil M, Darville AG, Fry SC, Alberheim P (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann.Rev.Biochem.* 53, 625-63.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JAH (2002) Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry.* 277, 41987-42002.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JAH (2003) Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Molecular Biology.* 53, 423-442.
- Millar AH, Sweetlove LJ, Giege P, Leaver CJ (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127, 1711-1727.
- Moffatt BA, McWhinnie EA, Agarwal SK, Schaff DA (1994) The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene.* 143, 211-216.
- Mohnen D (1990) Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: D.Barton, K. Nakanishi O. Meth-Cohn, BM Pinto (Eds). *Comprehensive Natural Products Chemistry.* Vol.3, Carbohydrates and their derivatives including Tannins, Cellulose and related Lignins. Elsevier, Oxford, pp 497-527.
- Moore PJ, Swords KMM, Lynch MA, Staehelin LA (1991) Spatial organization of the assembly pathway of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J Cell Biol.* 112, 589-602.
- Morris VJ, Wilde PJ (1997) Interaction of food polymers. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* 2, 567-572.
- Müller J, Boller T, Wiemken A (2001) Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125, 1086-1093.
- Munoz P, Norambuena L, Orellana A (1996) Evidence for UDP-glucose transporter in Golgi apparatus-derived vesicles from pea and its possible role in polysaccharide biosynthesis. *Plant Physiol.* 112, 1585-1594.

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473 – 497.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
- Mussig C, Shin GH, Altmann T (2003) Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133, 1261-1271.
- Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, Ravebtós D, Buskov S, Christensen B, DeMaria L, Taboureau O, Yaver D, Elvig-Jørgensen S, Sørensen MV, Christensen BE, Kjærulff S, Frimodt-Møller N, Lehrer RI, Zasloff M, Kristensen HH (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature.* 437, 975-980.
- Naismith JH (2004) Chemical insights from structural studies of enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 647–654.
- Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, Simon WJ, Slabas AR (2003) Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics.* 3, 1047-1059.
- Neckelmann G, Orellana A (1998) Metabolism of uridine 5'-diphosphate-glucose in Golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol.* 177, 1007-1014.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, Vonheijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering.* 10, 1-6.
- Norambuena L, Marchant L, Berninsone P, Hirschberg CB, Silva H, Orellana A (2002) Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an Arabidopsis thaliana UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *J Biol Chem.* 277, 32923-32929.
- O'Neill MA, Albersheim P, Darville A (1990) The pectic polysaccharide of primary cell walls. In: Methods in plant biochemistry. Dey PM (Ed) Academic Press. 2, pp 415-441.
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darville A (2001) Requirement of borate cross-linking of the cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science.* 294, 846-849.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. *Plant Physiol.* 129, 886-896.
- Pagant S, Bichet A, Sugimoto K, Lerouxel O, Desprez T, Mc Cann M, Lerouge P, Vernhettes S, Höfte H (2002) *KOBITO1* encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in Arabidopsis. *Plant Cell.* 14, 2001-2013.
- Perrin RM (2001) Cellulose: How many cellulose synthases to make a plant? *Current Biology.* 11, R213-R216.

- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Sonderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell*. 14, 211-236.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes and Development*. 11, 3194-3205.
- Pilate G, Guiney E, Holt K, Petit-Conil M, Lapierre C, Leple JC, Pollet B, Mila I, Webster EA, Marstrop HG, Hopkins DW, Jouanin L, Boerjan W, Schuch W, Cornu D, Haplin C (2002) Field and pulping performance of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology*. 20, 607-612.
- Puhlmann J, Bucheli E, Swain MJ, Dunning N, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG (1994) Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides.1. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal alpha-(1-2)-linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiol*. 104,699-710.
- Rapoport TA (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*. 258, 931-936.
- Raven PH, Evert RF, Eichorn SE (1999) The biology of plants. 6th Edn, W.H. Freeman Worth Publisher, New York.
- Ravn P, Arnau J, Madsen SM, Vrang A, Israelsen H (2000) The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*. *Gene*. 25, 347-56.
- Reiter WD, Chapple C, Somerville CR (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J*. 12, 335-345.
- Reiter WD, Vanzin GF (2001) Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Mol Biol*. 47, 95-113.
- Reiter WD (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol*. 5, 536-542.
- Richmond TA, Somerville CR (2001) Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Mol Biol*, 47, 131-143.
- Riesmeier WJ, Willmitzer L, Frommer WB (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J*. 11, 4705-13.
- Robertson D, Mitchell, GP, Gilroy, GS, Gerrish, C, Bollwell, GP, Slabas, AR (1997) Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J Biol Chem*. 272, 15841-15848.
- Robinson C, Ellis RJ (1984) Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of important precursor polypeptides. *Eur J Biochem*. 142, 337-42.

Rolland N, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Garin J, Douce R, Joyard J (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynthesis Research*. 78, 205-230.

Rose JKC, Bennett AB (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls; parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4, 176-183.

Rose JKC, Catala C, Gonzalez-Carranza CZH, Roberts J (2003) Plant cell wall assembly. In: The plant cell wall. Annual Plant Review, Vol. 8, Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK and CRC Press, Boca Raton, FL, pp 264-324.

Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol.* 53, 247-59.

Rusch SL, Kendall DA (1995) Protein transport via amino-terminal targeting sequences; common theme in diverse systems. *Mol.Membr.Biol.* 12, 295-307.

Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants-genes for improving defences against insects and pathogens. *Annual review of phytopathology.* 28, 425-499.

Sakurai N (1998) Dynamic Function and Regulation of Apoplast in the Plant Body. *J. Plant Res.* 111, 133-148.

Salnikov V, Grimson MJ, Seagull RW, Haigler CH (2003). Localization of sucrose synthase and callose in freeze substituted, secondary wall stage, cotton fibers. *Protoplasma.* 221, 175-184.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, Cold Spring Harbor, NY.

Samuels AL, Giddings THJr, Staehelin LA (1995) Cytokinesis in tobacco BY2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J. Cell Biol.* 130, 1033-1040.

Sánchez-Calderón L, Lopez-Bucio J, Chacon-Lopez A, Cruz-Ramirez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology.* 46, 174-184.

Santoni V, Rouquie D, Doumas P, Mansion M, Boutry M, Degand H, Dupree P, Packman L, Sherrier J, Prime T, Brauw G, Posada E, Rouze P, Dehais P, Sahnoun I, Barlier I, Rossignol M (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J.* 16, 633-641.

Schatz G, Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science.* 271, 1519-1526.

Scheible WR, Pauly M (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology.* 7, 285-295.

- Schindelman G, Morikami A, Jung J, Baskin TI, Carpita NC, Derbyshire P, McCann MC, Benfey PN (2001) *COBRA* encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Gene Dev.* 15, 1115-1127.
- Schopfer CR, Hepler PK (1991) Distribution of membranes and the cytoskeleton during cell plate formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. *J. Cell Sci.* 100, 717-728.
- Seifert GJ, Barber C, Wells B, Dolan L, Roberts K (2002) Galactose biosynthesis in *Arabidopsis*: Genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-galactose into cell wall polymers. *Curr. Biol.* 12, 1840-1845.
- Seifert GJ (2004) Nucleotide sugar interconversion and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Current Opinion in Plant Biology.* 7, 277-284.
- Seifert GJ, Barber C, Wells B, Roberts K (2004) Growth regulators and the control of nucleotide sugar flux. *Plant Cell.* 16, 723-730.
- Seitz B, Klos C, Wurm M, Tenhaken R (2000) Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *Plant J.* 21, 537-546.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 14440-14445.
- Sørensen SO, Pauly M, Bush M, Skjøt M, McCann MC, Borkhard B, Ulvskov P (2000) Pectin engineering; Modification of potato pectin by in vivo expression of endo-1,4- $\beta$ -D-galactase. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 7639-7644.
- Staehelin LA, Moore I (1995) The plant Golgi apparatus: Structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 261-288.
- Sterling JD, Quigley HF, Orellana A, Mohnen D (2001) The catalytic site of the pectin biosynthesis enzyme  $\alpha$ -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127, 360-371.
- Surpili MJ, Müller-Röber B, Willmitzer L (2002) A yeast-based model system for cloning secreted and membrane proteins. *An Acad Bras Cienc.* 74, 599-608.
- Taiz L, Zeiger E (1998) Cell Walls: Structure, biogenesis, and expansion. In: *Plant Physiology* 2<sup>nd</sup> Ed. Sinauer Associates, inc. pp 424-443.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29, 417-426.
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakanko T, Honjo T (1993) Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science.* 261, 600-603.

- Terpstra AHM, Lapre JA, de Vries HT, Beynen AC (2002) The hypocholesterolemic effect of lemon peels, lemon pectin and the waste stream material of lemon peels in hybrid F1B hamsters. *Eur.J.Nutr.* 41, 19-26.
- Thitamadee S, Tuchiara K, Hashimoto T (2002) Microtubules basis for left-hand helical growth in Arabidopsis. *Nature.* 417, 193-196.
- Updegraff DM (1969) Semi-micro determination of cellulose in biological material. *Anal Biochem.* 32, 420-424.
- Usadel B, Kuschinsky AM, Rosso MG, Eckermann N, Pauly M (2004) RHM2 Is Involved in Mucilage Pectin Synthesis and Is Required for the Development of the Seed Coat in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134, 286-295.
- Van Larebeke N, Hernalsteens JP, Depicker A, Zaenen I, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1977) Transfer of Ti-plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. *Molecular and General Genetics.* 152, 119-124.
- Varadarajan DK, Karthikeyan AS, Matilda PD, Raghothama KG (2002) Phosphite, an analogue of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol.* 129, 1232-1240.
- Vener AV, Harms A, Sussmann MR, Vierstra RD (2001) Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem.* 276, 6959-6966.
- Verma DBS (1996) Vesicle dynamics during cell-plate formation in plants. *Plant Science.* 1, 145-149.
- Voet D, Voet JG (1994) Membranordnung und Protein-Targeting. In: Biochemie, 2<sup>nd</sup> Ed. VCH, Weinheim, pp 291-298.
- von Heijne G (1985) Signal Sequences. The limit of variation. *J.Mol.Biol.* 184, 99-105.
- von Heijne G (1990a) Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol.* 2, 604-608.
- von Heijne G (1990b) The Signal Peptide. *J. Membrane Biol.* 115, 195-201.
- Wagner C, Sefkow M, Kopka J (2003) Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry.* 62, 887-900.
- Wang H, Lockwood SK, Hoeltzel MF, Schiefelbein JW (1997) The *ROOT HAIR DEFICIENT3* gene encodes an evolutionarily conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in Arabidopsis. *Gene Dev.* 11, 799-811.
- Werhahn W, Braun HP (2002) Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from Arabidopsis thaliana by three-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 23, 640-646.

- Wilkins MR, Pasquali C, Apple RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*. 14, 61-65.
- Willats WGT, Marcus SE, Knox JP (1998) Generation of a monoclonal antibody specific to (1-5)- $\alpha$ -L-arabinan. *Carbohydrate Research*. 308, 149-152.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47, 9-27.
- William GTW, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP (2001) Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 19404-19413.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA (2000) Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, ApL3, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124, 105-14.
- Yamamoto R, Inouhe M, Masuda Y (1988) Galactose inhibition of auxin-induced growth of mono- and dicotyledonous plants. *Plant Physiol.* 86, 1223-1227.
- Yamane H, Lee SJ, Kim BD, Tao R, Rose JKC (2005) A coupled yeast signal sequence trap and transient plant expression strategy to identify genes encoding secreted proteins from peach pistils. *J Exp Bot.* 56, 2229-2238.
- Youl JJ, Bacic A, Oxley D (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7921-7926.
- Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC, Yamada H (2001) Characterization of pectic polysaccharides having intestinal immune system modulation activity from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. *Carbohydr. Polymers*. 46, 125-134.
- Zabackis E, York WS, Pauly M, Hantus S, Reiter WD, Chapple CCS, Albersheim P, Darvill A (1996) Substitution of L-Fucose by L-Galactose in Cell Walls of *Arabidopsis mur1*. *Science*. 272, 1808-1810.
- Zuther E, Buchel K, Hundertmark M, Stitt M, Hinch DK, Heyer AG (2004) The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 576, 169-173.

## 7. Anhang

**Tab. I Chloroplastidäre N-terminale Signalsequenzen der getaggtten cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der getaggtten Proteine wurden durch SignalP3.0 und TargetP1.1 den chloroplastidären Proteinen zugeordnet (meist auch mit iPSORT übereinstimmend). (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1			SignalP3.0			Anzahl der Transposon-Insertionen
						SP	andere	Lok.	RC	ØS	Lok.	
ERSEQN:ZY132879	At1g20340	Plastocyanin (PetE2)	C	0,874	0,022	0,030	0,069	C	1	0,241	S	1
ERSEQN:ZY133517	At2g05710	cytoplasmic aconitate hydratase	C	0,916	0,131	0,002	0,010	C	2	0,144	S	3
ERSEQN:ZY133630	At5g64040	photosystem I reaction centre subunit psaN precursor (PSI-N)	C	0,422	0,023	0,276	0,269	C	5	0,248	S	1
ERSEQN:ZY133474	At4g09030	unknown protein	S	0,416	0,016	0,270	0,005	C	5	0,957	S	2
ERSEQN:ZY133477												
ERSEQN:ZY133613	At3g66654	cyclophilin (AtCYP21-4)	M	0,750	0,362	0,007	0,089	C	4	0,312	S.a.	1

**Tab. II Mitochondriale N-terminale Signalsequenzen der getaggtten cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der getaggtten Peptide wurden durch SignalP3.0 und TargetP1.1 den mitochondrialen Proteinen zugeordnet (meist auch mit iPSORT übereinstimmend). (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1			SignalP3.0			Anzahl der Transposon-Insertionen
						SP	andere	Lok.	RC	ØS	Lok.	
ERSEQN:ZY132853	At2g47320	cyclophilin (ROC16)	M	0,315	0,710	0,004	0,177	M	4	0,408	S.a.	7
ERSEQN:ZY133621	At3g46430	unknown protein	M	0,023	0,856	0,053	0,204	M	2	0,472	S.a.	1
ERSEQN:ZY133633	At4g18030	unknown protein	M	0,022	0,420	0,361	0,172	M	5	0,567	S.a.	1
ERSEQN:ZY132846	At5g65810	unknown protein	M	0,062	0,788	0,013	0,233	M	3	0,567	S.a.	4
ERSEQN:ZY133644												
ERSEQN:ZY132825	At3g27220	unknown protein	C	0,046	0,528	0,020	0,412	M	5	0,512	S.a.	4



**Tab. IV N-terminale Signalsequenzen ohne eindeutige Zuordnung der getaggtten cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der getaggtten Peptide konnten durch SignalP3.0, TargetP1.1 und iPSORT nicht eindeutig zugeordnet werden. (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1			SignalP3.0			Anzahl der Transposon-Insertionen
						SP	andere	Lok.	RC	ØS	Lok.	
ERSEQN:ZY132897	At1g73590	auxin transporter splice variant b, putative	S	0,001	0,055	0,780	0,511	S	4	0,681	-	1
ERSEQN:ZY133652	At2g33120	putative synaptobrevin	S	0,024	0,141	0,516	0,306	S	4	0,638	-	1
ERSEQN:ZY132842	At2g20530	putative prohibitin	S	0,010	0,167	0,471	0,671	-	4	0,369	S	6
ERSEQN:ZY133650	At5g40670	unknown protein	C	0,053	0,010	0,692	0,310	S	4	0,308	-	1
ERSEQN:ZY132889	At1g48530	hypothetical protein	C	0,230	0,322	0,144	0,298	M	5	0,341	-	1
ERSEQN:ZY132926	At3g55460	RNA binding protein like	C	0,185	0,556	0,003	0,263	M	4	0,242	-	2
ERSEQN:ZY133624	At4g13720	unknown protein	M	0,102	0,164	0,374	0,251	S	5	0,318	-	1
ERSEQN:ZY132921	At1g80040	unknown protein	M	0,932	0,087	0,008	0,083	C	1	0,070	-	1
ERSEQN:ZY133619	At3g57810	unknown protein	M	0,639	0,279	0,002	0,202	C	4	0,138	-	1
ERSEQN:ZY133622	At4g35760	unknown protein	M	0,765	0,354	0,028	0,011	C	3	0,161	-	1
ERSEQN:ZY133494	At2g13975	expressed protein	-	0,019	0,082	0,597	0,558	S	5	0,059	-	2
ERSEQN:ZY132828	At3g62450	unknown protein	-	0,020	0,089	0,816	0,307	S	3	0,442	-	3
ERSEQN:ZY133629												
ERSEQN:ZY132915	At3g05165	sugar transporter like protein	-	0,009	0,163	0,048	0,987	-	1	0,179	S	1
ERSEQN:ZY133625	At1g14450	unknown protein	-	0,053	0,643	0,021	0,766	-	5	0,120	S.a.	1
ERSEQN:ZY133614	At1g16000	unknown protein	-	0,051	0,141	0,092	0,942	-	1	0,120	S.a.	1
ERSEQN:ZY132840	At4g15630	unknown protein	-	0,061	0,042	0,009	0,988	-	1	0,320	S.a.	4
ERSEQN:ZY133641	At4g36660	hypothetical protein	-	0,169	0,030	0,027	0,966	-	2	0,266	S.a.	1
ERSEQN:ZY132830	At3g52190	unknown protein	-	0,746	0,058	0,014	0,497	C	4	0,061	-	2
ERSEQN:ZY133508	At4g17390	60S ribosomal protein L15 homolog	-	0,020	0,665	0,014	0,531	M	5	0,044	-	2
ERSEQN:ZY133645	At5g65960	unknown protein	-	0,103	0,491	0,028	0,353	M	5	0,165	-	1

**Tab. V Chloroplastidäre N-terminale Signalsequenzen der ungetaggtten cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der ungetaggtten Proteine wurden durch SignalP3.0, TargetP1.1 und iPSORT den chloroplastidären Proteinen zugeordnet. (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1			SignalP3.0		
						SP	andere	Lok.	RC	ØS	Lok.
AK_Nov2_D5	At1g67090	ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A / RuBisCO small subunit 1A (RBCS-1A) (ATS1A)	C	0,772	0,023	0,365	0,089	C	3	0,469	S
AK_Nov1_F7	At2g36145	expressed protein	C	0,659	0,268	0,051	0,022	C	4	0,455	S
AK_Nov1_H10, AK_Nov2_A9	At4g27670	25,3 kDa small heat shock protein, chloroplast precursor (HSP25,3-P)	C	0,868	0,050	0,090	0,027	C	2	0,342	S
AK_Nov1_G10	At5g19050	expressed protein	C	0,946	0,069	0,142	0,028	C	1	0,241	S
AK_Nov1_H3	At1g30935	pseudogene, F-box protein family, contains F-box domain	C	0,726	0,042	0,023	0,331	C	4	0,105	-
AK_Nov2_H1	At1g31330	photosystem I reaction center subunit III family protein	C	0,971	0,066	0,004	0,020	C	1	0,035	-
AK_Nov1_C3, AK_Nov2_F2	At2g26930	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (CMK) (CDPMEK)	C	0,785	0,217	0,039	0,099	C	3	0,416	-
AK_Nov1_A8	At2g28800	chloroplast membrane protein (ALBINO3)	C	0,919	0,193	0,008	0,013	C	2	0,238	-
AK_Nov3_B12	At2g38240	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	C	0,588	0,074	0,113	0,405	C	5	0,163	-
AK_Nov2_E7	At2g39990	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5 / eIF-3 epsilon / eIF3f (TIF3F1)	C	0,797	0,094	0,133	0,099	C	2	0,200	-
AK_Nov2_B1	At5g27390	expressed protein	C	0,899	0,101	0,030	0,212	C	2	0,119	-
AK_Nov3_G5	At5g53820	expressed protein	C	0,552	0,131	0,106	0,448	C	5	0,016	-

**Tab. VI Mitochondriale N-terminale Signalsequenzen der ungetaggenen cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der ungetaggenen Peptide wurden durch SignalP3.0, TargetP1.1 und iPSORT den mitochondrialen Proteinen zugeordnet. (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 ØS	Lok.
AK_Nov3_H5	At1g04480	CS902 60S ribosomal protein L23 (RPL23A) gene	M	0,023	0,713	0,024	0,387	M	4	0,252	S
AK_Nov2_F10	At1g53290	galactosyltransferase family protein	M	0,036	0,753	0,013	0,041	M	2	0,706	S,a
AK_Nov3_C5	At5g51440	23,5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23,5-M)	M	0,360	0,827	0,018	0,004	M	3	0,651	S
AK_Nov1_F4	At1g09690	60S ribosomal protein L21 (RPL21C)	M	0,019	0,872	0,020	0,407	M	3	0,266	-
AK_Nov2_C9	At1g23490	ADP-ribosylation factor	M	0,003	0,515	0,378	0,382	M	5	0,576	-
AK_Nov2_H5	At1g75600	histone H3,2, putative	M	0,496	0,539	0,022	0,063	M	5	0,097	-
AK_Nov3_A1	At2g02750	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein expressed protein	M	0,019	0,628	0,014	0,419	M	4	0,224	-
AK_Nov3_D11	At2g46505	DEAD/DEAH box helicase, putative	M	0,162	0,624	0,037	0,246	M	4	0,032	-
AK_Nov1_B7	At2g47330	60S ribosomal protein L27 (RPL27B)	M	0,037	0,558	0,204	0,164	M	4	0,130	-
AK_Nov2_D3	At3g55750	60S ribosomal protein L35a (RPL35aD)	M	0,018	0,850	0,025	0,240	M	2	0,182	-
AK_Nov1_H7	At3g55750	60S ribosomal protein L35a (RPL35aD)	M	0,018	0,850	0,025	0,240	M	2	0,182	-
AK_Nov3_B2	At4g09750	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	M	0,030	0,640	0,055	0,294	M	4	0,531	-
AK_Nov2_H3	At4g25200	23,6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23,6-M)	M	0,353	0,811	0,057	0,008	M	3	0,377	-
AK_Nov3_C4	At5g04800	40S ribosomal protein S17 (RPS17D)	M	0,059	0,697	0,011	0,427	M	4	0,071	-
AK_Nov2_B12	At5g46430	60S ribosomal protein L32 (RPL32B)	M	0,338	0,349	0,005	0,317	M	5	0,064	-
AK_Nov3_H8	At5g51220	ubiquinol-cytochrome C chaperone family protein	M	0,036	0,937	0,002	0,079	M	1	0,250	-
AK_Nov2_A8	At5g51220	ubiquinol-cytochrome C chaperone family protein	M	0,036	0,937	0,002	0,079	M	1	0,250	-
AK_Nov1_H6	At5g64650	ribosomal protein L17 family protein	M	0,093	0,842	0,031	0,128	M	2	0,202	-

**Tab. VII Peptide ohne Signalsequenz der ungetaggten cDNA.** Die N-terminale Signalsequenzen der ungetaggten Peptide wurden durch SignalP3.0 und TargetP1.1 den Proteinen ohne Signalsequenz zugeordnet (meist auch mit iPSORT übereinstimmend). (AGI: *Arabidopsis* gene identification, S: sekretorische Signalsequenz, S.a: Signalanker, C: chloroplastidäre Signalsequenz, M: mitochondriale Signalsequenz, -: keine Signalsequenz, Lok.: Lokalisation, cTP: chloroplastidäres Signalpeptid (= chloroplastic transit peptide), mTP: mitochondriales Signalpeptid (= mitochondrial transit peptide), SP: sekretorisches Signalpeptid (= Signal Peptide), RC: Zuverlässigkeitsklasse (= Reliability Class), ØS: durchschnittlicher Wahrscheinlichkeitswert zum Vorhandensein eines Sekretionssignalpeptides (= signal peptide score).

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 ØS	Lok.
AK_Nov3_E6	At1g02280	GTP-binding protein (TOC33)	-	0,142	0,124	0,055	0,706	-	3	0,126	-
AK_Nov1_A10	At4g05050	polyubiquitin (UBQ11)	-	0,081	0,111	0,138	0,847	-	2	0,098	-
AK_Nov3_B8	At1g07400	17,8 kDa class I heat shock protein (HSP17,8-CI)	-	0,230	0,26	0,062	0,531	-	4	0,132	-
AK_Nov1_B12	At1g09640	elongation factor 1B-gamma, putative / eEF-1B gamma, putative	-	0,027	0,066	0,399	0,686	-	-	0,052	-
AK_Nov1_E6, G3	At1g15270	expressed protein	-	0,095	0,168	0,168	0,89	-	2	0,020	-
AK_Nov1_B2	At1g15930	40S ribosomal protein S12 (RPS12A)	-	0,197	0,055	0,09	0,799	-	2	0,068	-
AK_Nov2_H2	At1g16790	ribosomal protein-related	-	0,641	0,035	0,034	0,747	-	5	0,012	-
AK_Nov3_E1	At1g16790	ribosomal protein-related	-	0,641	0,035	0,034	0,747	-	5	0,012	-
AK_Nov3_G9	At1g17490	expressed protein	-	0,316	0,079	0,148	0,766	-	3	0,015	-
AK_Nov2_C3	At1g18210	calcium-binding protein, putative	-	0,269	0,052	0,155	0,848	-	3	0,086	-
AK_Nov2_F3	At1g26630	eukaryotic translation initiation factor 5A, putative / eIF-5A, putative	-	0,159	0,104	0,046	0,894	-	2	0,019	-
AK_Nov1_A2	At1g33120	60S ribosomal protein L9 (RPL90B)	-	0,068	0,085	0,152	0,931	-	2	0,029	-
AK_Nov3_A8	At1g34030	40S ribosomal protein S18 (RPS18B)	-	0,250	0,118	0,117	0,603	-	4	0,070	-
AK_Nov2_E8	At1g35720	gene for Ca2+-dependent membrane-binding protein annexin	-	0,102	0,126	0,045	0,905	-	2	0,055	-
AK_Nov1_G2	At1g52380	Ran-binding protein 1 domain-containing protein / RanBP1 domain-containing protein	-	0,113	0,050	0,023	0,908	-	2	0,015	-
AK_Nov1_F8	At1g63090	F-box family protein / SKP1 interacting partner 3-related	-	0,040	0,222	0,086	0,783	-	3	0,092	-
AK_Nov1_E2	At1g65370	meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein	-	0,076	0,089	0,171	0,790	-	2	0,055	-
AK_Nov3_F7	At1g65560	allyl alcohol dehydrogenase	-	0,076	0,052	0,222	0,898	-	2	0,036	-
AK_Nov1_C7	At1g69410	eukaryotic translation initiation factor 5A, putative / eIF-5A	-	0,101	0,089	0,055	0,931	-	1	0,015	-
AK_Nov2_B6	At1g69410	eukaryotic translation initiation factor 5A, putative / eIF-5A	-	0,101	0,089	0,055	0,931	-	1	0,015	-
AK_Nov1_E3	At1g75280	isoflavone reductase	-	0,040	0,185	0,218	0,69	-	3	0,079	-
AK_Nov3_H11	At1g78380	glutathione S-transferase, putative	-	0,070	0,247	0,140	0,523	-	4	0,312	-
AK_Nov3_C3	At2g01430	homeobox-leucine zipper protein 17 (HB-17) / HD-ZIP transcription factor 17	-	0,346	0,081	0,023	0,843	-	3	0,011	-
AK_Nov2_B5	At2g16070	expressed protein	-	0,052	0,134	0,174	0,911	-	2	0,076	-
AK_Nov3_H4	At2g25355	exonuclease-related	-	0,277	0,031	0,143	0,870	-	3	0,048	-
AK_Nov3_C2	At2g29450	glutathione S-transferase (103-1A)	-	0,041	0,234	0,120	0,762	-	3	0,108	-
AK_Nov2_H4	At2g36460	fructose-bisphosphate aldolase, putative	-	0,289	0,023	0,149	0,447	-	5	0,079	-
AK_Nov3_H3	At2g38710	AMMECR1 family	-	0,136	0,06	0,306	0,652	-	4	0,161	-
AK_Nov2_G12	At2g39460	60S ribosomal protein L23A (RPL23aA)	-	0,433	0,041	0,051	0,839	-	3	0,018	-
AK_Nov2_A10	At2g40510	40S ribosomal protein S26 (RPS26A)	-	0,138	0,223	0,004	0,757	-	3	0,048	-
AK_Nov3_E9	At2g45950	SKP1 family protein	-	0,039	0,120	0,102	0,922	-	1	0,051	-
AK_Nov2_C8	At2g46140	late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative	-	0,078	0,086	0,138	0,848	-	2	0,055	-
AK_Nov1_A11	At3g02470	adenosylmethionine decarboxylase family protein	-	0,058	0,104	0,093	0,866	-	2	0,063	-
AK_Nov1_B4	At3g09390	metallothionein protein, putative (MT2A)	-	0,201	0,108	0,131	0,785	-	3	0,105	-
AK_Nov2_D4	At3g09390	metallothionein protein, putative (MT2A)	-	0,201	0,108	0,131	0,785	-	3	0,105	-
AK_Nov3_C1	At3g11940	40S ribosomal protein S5 (RPS5B)	-	0,152	0,089	0,126	0,836	-	2	0,027	-
AK_Nov2_F12	At3g11940	40S ribosomal protein S5 (RPS5B)	-	0,152	0,089	0,126	0,836	-	2	0,027	-
AK_Nov3_G11	At3g12120	unknown protein	-	0,151	0,247	0,024	0,793	-	3	0,100	-
AK_Nov1_H8	At3g12290	tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, putative	-	0,382	0,056	0,068	0,728	-	4	0,032	-
AK_Nov3_B10	At3g12290	tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, putative	-	0,382	0,056	0,068	0,728	-	4	0,032	-
AK_Nov1_C4	At3g12390	nascent polypeptide associated complex alpha chain protein, putative / alpha-NAC, putative	-	0,086	0,071	0,123	0,933	-	1	0,011	-
AK_Nov2_A2	At3g13920	eukaryotic translation initiation factor 4A-1 / eIF-4A-1	-	0,146	0,071	0,092	0,937	-	2	0,039	-

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 ØS	Lok.
AK_Nov1_F5	At3g14420	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase, putative / short chain alpha-hydroxy acid oxidase, putative	-	0,036	0,211	0,027	0,912	-	2	0,016	-
AK_Nov1_E7	At3g15580	autophagy 8i (APG8i)	-	0,056	0,107	0,052	0,908	-	1	0,023	-
AK_Nov2_C1	At3g16080	60S ribosomal protein L37 (RPL37C)	-	0,089	0,265	0,066	0,688	-	3	0,053	-
AK_Nov1_A9, D12, AK_Nov2_D1	At3g16640	translationally controlled tumor family protein	-	0,153	0,101	0,232	0,817	-	3	0,100	-
AK_Nov2_E3	At3g24830	gene for 60S ribosomal protein	-	0,272	0,108	0,048	0,437	-	5	0,096	-
AK_Nov3_A4	At3g28180	glycosyl transferase family 2 protein	-	0,424	0,007	0,044	0,828	-	3	0,067	-
AK_Nov2_D6	At3g46230	17,4 kDa class I heat shock protein (HSP17,4-CI)	-	0,044	0,358	0,057	0,720	-	4	0,157	-
AK_Nov3_G3	At3g48930	40S ribosomal protein S11 (RPS11A)	-	0,171	0,104	0,079	0,846	-	2	0,029	-
AK_Nov1_F1	At3g52590	ubiquitin extension protein 1 (UBQ1) / 60S ribosomal protein L40 (RPL40B)	-	0,049	0,072	0,136	0,937	-	1	0,129	-
AK_Nov3_D2, E8	At3g5440	triosephosphate isomerase, cytosolic, putative	-	0,076	0,163	0,037	0,802	-	2	0,088	-
AK_Nov1_C11	At3g55900	F-box family protein	-	0,120	0,203	0,058	0,397	-	5	0,099	-
AK_Nov3_H6	At3g56020	60S ribosomal protein L41 (RPL41G)	-	0,201	0,201	0,364	0,063	-	4	0,111	-
AK_Nov2_C11	At3g60245	60S ribosomal protein L37a (RPL37aC)	-	0,054	0,521	0,065	0,610	-	5	0,073	-
AK_Nov3_D10	At3g60420	expressed protein	-	0,234	0,109	0,034	0,696	-	3	0,050	-
AK_Nov1_A10	At3g63520	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase / neoxanthin cleavage enzyme / NCED1 / carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1)	-	0,421	0,069	0,122	0,707	-	4	0,130	-
AK_Nov3_H9	At4g11220	unknown protein	-	0,431	0,032	0,037	0,841	-	3	0,013	-
AK_Nov3_H7	At4g12040	zinc finger (AN1-like) family protein	-	0,503	0,026	0,022	0,738	-	4	0,021	-
AK_Nov1_C6	At4g17890	human Rev interacting-like family protein / hRIP family protein	-	0,36	0,022	0,067	0,858	-	3	0,027	-
AK_Nov2_F8	At4g19880	glutathione S-transferase-related	-	0,151	0,108	0,077	0,881	-	2	0,056	-
AK_Nov1_C1	At4g21580	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	-	0,102	0,133	0,07	0,799	-	2	0,032	-
AK_Nov3_A7	At4g21810	Der1-like family protein / degradation in the ER-like family protein	-	0,009	0,261	0,101	0,78	-	3	0,388	-
AK_Nov2_A3, E10	At4g29160	SNF7 family protein	-	0,061	0,181	0,095	0,857	-	2	0,029	-
AK_Nov3_H10	At4g29680	type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase family protein	-	0,362	0,01	0,002	0,734	-	4	0,078	-
AK_Nov2_B9	At4g30350	heat shock protein-related	-	0,161	0,085	0,004	0,675	-	3	0,102	-
AK_Nov3_C8	At4g33980	expressed protein	-	0,082	0,138	0,094	0,897	-	2	0,014	-
AK_Nov2_A1, A4, B4	At4g34870	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin (CYP1) / rotamase	-	0,134	0,106	0,228	0,682	-	3	0,129	-
AK_Nov2_F6	At4g39260	glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8) (CCR1)	-	0,093	0,152	0,145	0,748	-	3	0,138	-
AK_Nov3_C12	At5g64250	2-nitropropane dioxygenase family / NPD family	-	0,081	0,126	0,22	0,622	-	3	0,107	-
AK_Nov1_B5	At5g37475	translation initiation factor-related	-	0,061	0,169	0,069	0,913	-	2	0,021	-
AK_Nov1_B8	At5g57015	casein kinase, putative	-	0,073	0,413	0,025	0,689	-	4	0,050	-
AK_Nov1_C12	At5g02380	metallothionein protein 2B (MT-2B)	-	0,281	0,109	0,195	0,617	-	4	0,263	-
AK_Nov3_F10	At5g03660	putative protein	-	0,494	0,162	0,041	0,516	-	5	0,015	-
AK_Nov1_F11	At5g03850	40S ribosomal protein S28 (RPS28B)	-	0,119	0,247	0,129	0,653	-	3	0,067	-
AK_Nov3_G1	At5g11200	DEAD/DEAH box helicase, putative	-	0,109	0,093	0,048	0,932	-	1	0,011	-
AK_Nov1_D1	At5g15970	stress-responsive protein (KIN2) / stress-induced protein (KIN2) / cold-responsive protein (COR6,6) / cold-regulated protein	-	0,160	0,154	0,123	0,804	-	2	0,020	-
AK_Nov1_G4	At5g17240	SET domain-containing protein	-	0,078	0,091	0,057	0,842	-	2	0,077	-
AK_Nov3_A5	At5g20160	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	-	0,046	0,115	0,091	0,863	-	2	0,069	-
AK_Nov1_D9	At5g20920	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2, putative / eIF-2-beta, putative	-	0,161	0,103	0,06	0,882	-	2	0,011	-
AK_Nov2_D9	At5g22060	DNAJ heat shock protein, putative	-	0,040	0,375	0,077	0,84	-	3	0,030	-
AK_Nov3_B7	At5g22650	gene for putative histone deacetylase (HD2B)	-	0,157	0,097	0,079	0,83	-	2	0,088	-
AK_Nov2_E5	At5g37830	hydantoinase/ oxoprolinase family protein	-	0,048	0,168	0,168	0,893	-	2	0,072	-
AK_Nov2_D12	At5g44940	F-box family protein	-	0,152	0,172	0,051	0,765	-	3	0,079	-

Zuordnung	AGI Code	Beschreibung (NCBI)	iPSORT	cTP	mTP	TargetP1.1 SP	andere	Lok.	RC	SignalP3.0 ØS	Lok.
AK_Nov2_B3	At5g45775	60S ribosomal protein L11 (RPL11D)	-	0,312	0,06	0,032	0,715	-	3	0,035	-
AK_Nov3_G7	At5g49010	gene for hypothetical protein	-	0,073	0,087	0,191	0,923	-	2	0,022	-
AK_Nov3_C6	At5g49820	expressed protein	-	0,470	0,090	0,040	0,491	-	5	0,065	-
AK_Nov2_B8	At5g53590	auxin-responsive family protein	-	0,073	0,441	0,032	0,755	-	4	0,049	-
AK_Nov3_C7	At5g57290	60S acidic ribosomal protein P3 (RPP3B)	-	0,093		0,173	0,761	-	3	0,060	-
AK_Nov1_A12	At5g58005	unknown protein	-	0,115	0,080	0,097	0,901	-	2	0,023	-
AK_Nov2_E9	At5g58070	lipocalin, putative	-	0,079	0,179	0,208	0,788	-	3	0,031	-
AK_Nov3_F6	At5g59830	expressed protein	-	0,091	0,096	0,024	0,899	-	1	0,064	-
AK_Nov3_G10	At5g62300	40S ribosomal protein S20 (RPS20C)	-	0,105	0,102	0,075	0,873	-	2	0,027	-
AK_Nov1_A7	At1g01160	SSXT protein-related / transcription co-activator-related	C	0,049	0,059	0,092	0,877	-	2	0,092	-
AK_Nov1_G11	At1g25370	expressed protein	C	0,460	0,120	0,018	0,505	-	5	0,043	-
AK_Nov2_E1	At1g42430	expressed protein	C	0,150	0,198	0,011	0,415	-	4	0,202	-
AK_Nov3_B1	At1g48270	G protein coupled receptor-related	C	0,041	0,285	0,051	0,830	-	3	0,228	-
AK_Nov1_G1	At4g09320	nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1)	C	0,096	0,269	0,110	0,383	-	5	0,549	-
AK_Nov1_H11	At4g25100	superoxide dismutase [Fe], chloroplast (SODB) / iron superoxide dismutase (FSD1)	C	0,128	0,063	0,427	0,456	-	5	0,153	-
AK_Nov2_B7	At5g13200	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related	C	0,108	0,288	0,036	0,708	-	3	0,083	-
AK_Nov3_F8	At1g15800	expressed protein	S	0,123	0,030	0,043	0,889	-	2	0,090	-
AK_Nov1_G7	At2g32060	40S ribosomal protein S12 (RPS12C)	S	0,164	0,050	0,209	0,669	-	3	0,085	-
AK_Nov2_B2	At3g04120	gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit	S	0,025	0,364	0,134	0,619	-	4	0,209	-
AK_Nov3_F9	At5g16010	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein / steroid 5-alpha-reductase family protein	S	0,025	0,044	0,214	0,367	-	5	0,386	-
AK_Nov3_F5	At1g03610	expressed protein	M	0,069	0,344	0,040	0,648	-	4	0,064	-
AK_Nov2_F9	At1g37130	nitrate reductase 2 (NR2)	M	0,154	0,361	0,036	0,433	-	5	0,041	-
AK_Nov3_B5	At2g18110	elongation factor 1-beta, putative / EF-1-beta, putative	M	0,106	0,129	0,031	0,759	-	2	0,041	-
AK_Nov2_C4	At3g10860	ubiquinol-cytochrome C reductase complex ubiquinone-binding protein, putative / ubiquinol-cytochrome C reductase complex 8.2 kD	M	0,032	0,208	0,343	0,368	-	5	0,219	-
AK_Nov1_A4	At3g13540	myb family transcription factor	M	0,226	0,043	0,095	0,875	-	3	0,057	-
AK_Nov2_H10	At3g46040	40S ribosomal protein S15A (RPS15aD)	M	0,042	0,289	0,120	0,866	-	3	0,050	-
AK_Nov2_D10	At4g28390	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial, putative / ADP/ATP translocase, putative / adenine nucleotide translocator, putative	M	0,134	0,342	0,016	0,354	-	5	0,065	-
AK_Nov1_F3	At4g29480	mitochondrial ATP synthase g subunit family protein	M	0,084	0,196	0,327	0,396	-	5	0,047	-
AK_Nov2_G2	At5g27720	small nuclear ribonucleoprotein, putative / snRNP, putative / Sm protein, putative	M	0,047	0,212	0,216	0,671	-	3	0,379	-



**Tab. IX N-terminale sekretorische Signalsequenzen und deren Aminosäurelängen, sowie die Gesamtlängen der Sekretionsproteine.** (AGI: *Arabidopsis* gene identification, AS: Aminosäuren).

AGI Code	Signalsequenz	Proteinlänge	Länge der Signalsequenz (AS)
At1g07960	MTLGARLVAPMIILLFIPIELVKAE	146	1-26
At1g09850	MSMSSSSFISLTFFFLLLVSSSSSS	437	1-25
At1g16850	MAEKVKSGQVFNLLCIFSIFFFLVLSVNVSA	152	1-32
At1g25275	MMKKQVTIVAALLIMMALCSSLNMVAEA	74	1-28
At1g28400	MAFSTRGSLFFFTLVLLSTQIHA	335	1-25
At1g31420	MMGICEMKSCSWLLLSLCSLSNESQA	592	1-29
At1g33590	MNSSFTLFIFTFVIFLQCLNPTGA	477	1-24
At1g44960	MKKWLAIAATVAIIAIVRQGT	261	1-23
At1g48140	MKHIVKILSLLVAISAFWIGLLQA	89	1-24
At1g48440	MALQWLILSYVVAVEVVITLVLT	129	1-23
At1g48750	MVKVMWVSVLALAAAILLLTVPVAEG	94	1-26
At1g51760	MSFFKWVSFVLILHLLNPTLISC	440	1-23
At1g55210	MAKLIFFLAVQILFLAVVSS	187	1-20
At1g55330	MEAMKMKMMVFIMVVAFAAATA	58	1-24
At1g56340	MAKLNPKFISLILFALVVVISA	425	1-22
At1g65490	MGSKSPNIVALVPLLLILYTLSSQVEEVES	88	1-31
At1g71950	MQTFAPGTRVYHLIIIVFFFFCLSSFFASIVMA	136	1-34
At1g74020	MTSFCMSISLLLLLSAVFS	335	1-22
At1g75630	MASSGFSGETAPFFGFLGAAAALVFSCMG	166	1-30
At1g79940	MAASEENSALFPIFILTIMAIPVY	702	1-26
At2g02100	MKLSMRLISAVLIMFIMFVATGMGPVTVEA	77	1-30
At2g02120	MKFSMRLISAVLFLVMIFVATG	77	1-22
At2g19990	MNEMSFFGYSFIVVALFFDLTQA	176	1-23
At2g21160	MMNLRVFLALLLLASPLLQVARC	258	1-24
At2g22470	MNSKAMQALIFLGFATSCLA	131	1-21
At2g29960	MAKASFILLGTLFLFGAIASIQA	201	1-23
At2g32580	MAKHTAALKVGLALLALS MIGIYL	183	1-25
At2g34585	MAAITSAVIAIAGIILGWITIELACKPCL	81	1-24
At2g36670	MRTLRLMLAAAALAVALA	469	1-18
At2g37130	MANAKPFCLLGGFCLLLQLFSIFHIGNG	327	1-28
At2g37195	MAGGSERKTILVGLVLAIVLIG	133	1-23
At2g38530	MAGVMKLACMVLACMIVAGPITA	118	1-23
At2g38540	MAGVMKLACLALLACMIVAGPITSNA	118	1-25
At2g40880	MESKTFWIVTLLCGTIQLAIC	125	1-22
At2g41290	MMKLLLVVATSVLIFSVDLSDG	376	1-23
At2g43510	MAKAIVSIFVFFIFFLVIDSVPEIEA	89	1-27
At2g43570	MAKPTSRNDRFALFFITLIFLITVSKPVAS	277	1-31
At2g43660	MPKAQIWFPFIILLCISSVGS	123	1-21
At2g47470	MAKSQIWFGFALLALLLVSAVA	361	1-22
At3g02885	MANCIRRNALFFLTLLFLLSVSNLVQA	97	1-27
At3g05200	MRSSDHMAFAGVLPVIFLILSSADLAAS	398	1-29
At3g08610	MSLVWLEAMLPLGIH	65	1-16
At3g12700	MQKTLLSCLITLTLITVADS	439	1-21
At3g13520	MESMKMKLIVVLMVAIVAFSAVGNVAA	60	1-27
At3g18280	MVMIKTTMVSLFALAAVLLMILAPAAEA	96	1-28
At3g23805	MSRSLALVYLSLLCLQTHLSIS	118	1-22
At3g27400	MVSYNNHFAYAFLLLTIGNTLA	412	1-24
At3g44280	MSKPVLLVCLLVILIVTS	108	1-18
At3g51730	MGLKAGTFVLLLLGLILVSDA	213	1-21
At3g52850	MKLGLFTLSFLLILNLAMG	623	1-19
At3g56310	MVIMKMKKDSVFLVVGFLSVLVSQISA	437	1-30
At4g10250	MMKHLLSIFFIGALLGNIKT	195	1-21
At4g11650	MANLLVSTFIFSAALLISTATA	244	1-22
At4g12480	MASKNSASIALFFALNIIFFLTAA	168	1-25
At4g12545	MAPRTSLALFVSLNLLFFCTSA	108	1-23
At4g13950	MFNSTALVIFAILFLLISADA	120	1-21
At4g16500	MMMKSILCLSLPLVSVVEG	117	1-22
At4g17050	MRSLYLIVFIVISLVKASKS	298	1-20
At4g18280	MKGFFTLMAIMSLLLAFSLVHG	148	1-23
At4g19810	MSSTKLISLIVSITFFLTQLCSMA	379	1-24
At4g21960	MGGKGVMMVAAILCLWALSATS	330	1-21
At4g24190	MRKRTLVSVLFSLFLLFLPDQG	823	1-23
At4g24780	MKMQTKKLFITIVSFLLYAPLFLS	408	1-24
At4g27520	MTFLKMKLSFFFITLLSLTLFTISNA	349	1-28
At4g31840	MASSLLVTFICISVFFSSVNA	177	1-24
At4g34960	MRREISFLLQPRCLLLVALTIFLVFA	224	1-27
At4g38270	MTTFSTCAAFLSLVVVLHAVHVGGA	680	1-25
At4g38920	MSTFSGETAPFFGFLGAAAALVFSCMGAAYGTA	164	1-34
At4g39090	MDRLKLYFSVFLSFFIVSVSS	368	1-22
At4g39730	MARRDVLLPFLLLLATVSAVAFA	181	1-23
At5g06480	MSRIFAILPLAAVFLLLLVSPIVA	153	1-24

AGI Code	Signalsequenz	Proteinlänge	Länge der Signalsequenz (AS)
At5g07340	MRERIITFVSLLLVALLSFPSVSYC	532	1-25
At5g17190	MALEWVVVLGYAAAAEAIMVILLTMPGLDA	130	1-29
At5g18850	MASPSSSPTRIWFRTVILIALMVVLFYVG	99	1-30
At5g20230	MAGVFKTVTFLVLFVFAAVVFA	196	1-22
At5g20500	MTMFRSISMVMLLVALVFISMVSS	135	1-25
At5g24770	MKILSLSLLLLLAATVSA	265	1-18
At5g38630	MAVPVLGGFPIFMVVRVLGFHIAALVLT	230	1-28
At5g44130	MATTPLLLLLTAVFLSTEITAQRA	247	1-25
At5g48580	MASKMSLRYSFLIFFSLISLQGF	163	1-25
At5g53650	MGYVFRVRLASFFAGAATA	72	1-19
At5g58650	MTFVVRLVCLLLTLTITSSLA	75	1-22
At5g60360	MSAKTILSSVVLVVAASAA	358	1-21
At5g62350	MAKQYLFVLLSISYLLSLELTAATA	202	1-25
At1g71380	MTSLFFFVLLFSSLLISNGDA	484	1-21
At2g41800	MSLYHSLIFLLLSLCHGSYS	370	1-21
At1g67785	MVKVLTTFYGMTLAFA	63	1-16
At2g40160	MKQTDGRERKAYLSLLYFAVILLPVFLLG	427	1-29
At5g43980	MKLTYYQFFIFWFLPFFAISG	303	1-21

**Tab. X Expressionsanalyse durch Macroarray.** Expression im Verlauf der Regeneration zunehmend und wieder abnehmend.

AGI Code	Beschreibung (NCBI)	Verhältnis 14h/14h	Verhältnis 26h/14h	Verhältnis 58h/14h	Lokalisation
At1g48750	putative lipid transfer protein (F1114_8)	1,00	1,23	1,01	S
At1g65490	unknown protein	1,00	1,13	0,91	S
At1g71380	beta-glucanase	1,00	1,45	0,81	S
At1g75630	vacuolar ATP synthase, putative	1,00	1,21	0,58	S
At1g79940	Putative DnaJ protein	1,00	1,19	0,95	S
At2g19990	pathogenesis-related protein (PR-1)	1,00	1,16	0,88	S
At2g21160	Translocon-associated protein, alpha subunit precursor TRAP complex/Signal sequence receptor alpha subunit (SSR-alpha)	1,00	1,33	1,25	S
At2g34585	expressed protein	1,00	1,21	1,12	S
At2g40880	cysteine proteinase inhibitor B like, cystatin B	1,00	1,37	1,07	S
At2g41290	strictosidine synthase like protein	1,00	1,25	0,87	S
At2g43570	putative endochitinase	1,00	3,13	2,82	S
At3g05200	RING-H2 zinc finger protein ATL6 (ATL6)	1,00	1,19	0,78	S
At3g12700	unknown protein	1,00	1,20	0,91	S
At3g27400	pectate lyase, putative	1,00	1,18	1,11	S
At3g56310	alpha-galactosidase-like protein	1,00	1,15	1,00	S
At4g11650	osmotin precursor like protein	1,00	1,74	0,78	S
At4g18280	unknown protein	1,00	1,08	0,87	S
At4g19810	putative chitinase	1,00	2,26	0,74	S
At4g24190	HSP90-like protein	1,00	1,26	1,06	S
At4g24190	HSP90-like protein	1,00	1,21	1,11	S
At4g34960	cyclophilin (AtCYP21-1)	1,00	1,40	1,29	S
At4g38920	H <sup>+</sup> -transporting ATPase 16K chain P2, vacuolar	1,00	1,16	0,89	S
At5g06480	unknown protein	1,00	1,11	0,82	S
At5g07340	calnexin homolog	1,00	1,10	0,89	S
At5g20230	blue copper binding protein (bcb)	1,00	1,28	1,05	S
At5g38630	cytochrome b-561	1,00	1,37	0,49	S
At5g43980	unknown protein	1,00	1,15	0,70	S
At5g48580	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like protein	1,00	1,69	1,05	S
At1g59740	Nitrate transporter NTL1, putative	1,00	1,31	1,01	-
At1g59740	Nitrate transporter NTL1, putative	1,00	1,28	1,06	-
At2g22450	putative GTP cyclohydrolase	1,00	1,30	0,87	-
At3g13540	myb-related protein 5	1,00	1,35	0,95	-
At3g26950	unknown protein	1,00	1,05	0,91	-
At3g26950	unknown protein	1,00	1,18	0,89	-
At4g09030	unknown protein	1,00	1,17	1,11	C
At5g65810	unknown protein	1,00	1,34	1,26	M
At1g73590	Auxin transporter splice variant b, putative	1,00	1,14	0,41	S/-

**Tab. XI Expressionsanalyse durch Macroarray. Expression im Verlauf der Regeneration zunehmend.**

AGI Code	Beschreibung (NCBI)	Verhältnis 14h/14h	Verhältnis 26h/14h	Verhältnis 58h/14h	Lokalisation
At1g09850	Papain-like cysteine peptidase XBCP3	1,00	1,35	1,52	S
At1g16850	unknown protein	1,00	1,16	1,50	S
At1g28400	unknown protein	1,00	1,18	2,17	S
At1g31420	unknown protein	1,00	1,35	1,48	S
At1g44960	unknown protein	1,00	1,05	1,97	S
At1g74020	putative strictosidine synthase	1,00	2,14	2,96	S
At2g02120	protease inhibitor II	1,00	2,72	7,01	S
At2g29960	cyclophilin (ROC11)	1,00	0,91	2,03	S
At2g36670	putative protease	1,00	1,16	2,06	S
At2g37130	putative peroxidase ATP2a	1,00	1,20	1,57	S
At2g38540	putative nonspecific lipid-transfer protein	1,00	1,21	1,40	S
At2g47470	putative protein disulfide-isomerase	1,00	1,25	1,76	S
At3g02885	GASA5	1,00	1,06	1,11	S
At3g13520	arabinogalactan-protein AGP12	1,00	2,33	7,67	S
At3g18280	lipid transfer like protein	1,00	2,26	13,09	S
At3g27400	Pectate lyase, putative	1,00	1,09	1,90	S
At3g44280	unknown protein	1,00	1,48	3,41	S
At3g51730	unknown protein	1,00	1,04	1,44	S
At3g52850	Spot 3 protein and vacuolar sorting receptor homolog/AtELP1	1,00	1,45	1,78	S
At4g16500	cysteine proteinase inhibitor like protein	1,00	1,17	1,26	S
At4g21960	peroxidase prxr1	1,00	1,07	1,18	S
At4g24780	Pectate lyase like protein	1,00	1,02	2,16	S
At4g27520	Hypothetical protein (T29A15.10)	1,00	1,31	1,34	S
At4g31840	Plastocyanin-like domain containing protein, predicted GPI-anchored protein	1,00	10,96	35,42	S
At4g39090	drought-inducible cysteine proteinase RD19A precursor	1,00	1,57	2,94	S
At5g17190	unknown protein	1,00	1,34	1,65	S
At5g18850	unknown protein	1,00	2,92	3,71	S
At5g20500	Glutaredoxin	1,00	1,38	1,96	S
At5g58650	unknown protein	1,00	1,19	1,20	S
At5g62350	ripening-related protein-like; contains similarity to pectinesterase	1,00	1,08	2,02	S
At2g05710	cytoplasmic aconitate hydratase	1,00	1,10	1,50	C
At2g20530	putative prohibitin	1,00	1,00	1,56	S/-
At3g11520	cyclin box	1,00	1,04	3,17	-
At3g12120	unknown protein	1,00	1,57	4,38	-

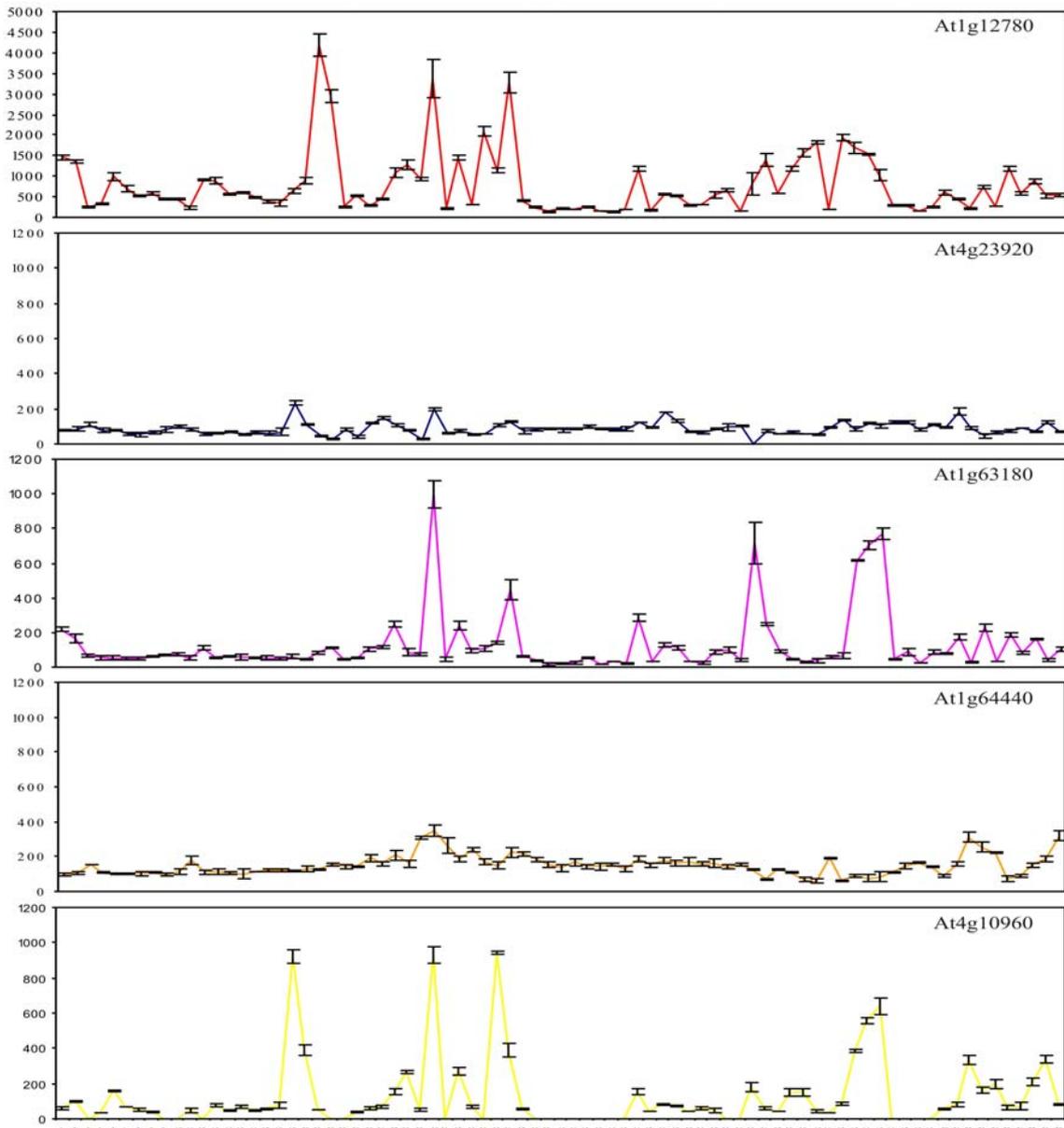
**Tab. XII Expressionsanalyse durch Macroarray. Expression im Verlauf der Regeneration abnehmend.**

AGI Code	Beschreibung (NCBI)	Verhältnis 14h/14h	Verhältnis 26h/14h	Verhältnis 58h/14h	Lokalisation
At1g71950	unknown protein	1,00	0,80	0,93	S
At4g13950	hypothetical protein	1,00	0,99	1,75	S
At4g17050	unknown protein	1,00	0,61	2,55	S
At5g53650	unknown protein	1,00	0,98	1,21	S
At3g09820	adenosine kinase like protein	1,00	0,78	1,82	-

**Tab. XIII Qualitätskontrolle der RNA der Zeitpunkte 14 h, 26 h, 58 h durch Real-time RT-PCR.**

	14 h	26 h	58 h
At1g72530	29,19 ± 0,17	28,15 ± 0,57	28,15 ± 0,34
At2g28390	24,19 ± 0,07	24,00 ± 0,27	24,87 ± 0,34
At4g05320	20,92 ± 0,18	20,31 ± 0,18	21,26 ± 0,34
At4g26410	22,15 ± 0,56	21,64 ± 0,56	22,08 ± 0,12
At4g27960	20,59 ± 0,57	21,16 ± 0,50	21,05 ± 0,56
At4g33380	19,34 ± 0,17	19,42 ± 0,13	20,29 ± 0,07
At4g34270	25,47 ± 0,45	24,74 ± 0,63	24,78 ± 0,51
At4g38070	33,03 ± 0,41	32,52 ± 0,72	33,24 ± 0,25
At5g15710	30,58 ± 0,51	30,08 ± 0,3	31,36 ± 0,17
At5g46630	24,40 ± 0,11	24,77 ± 0,51	24,48 ± 0,47

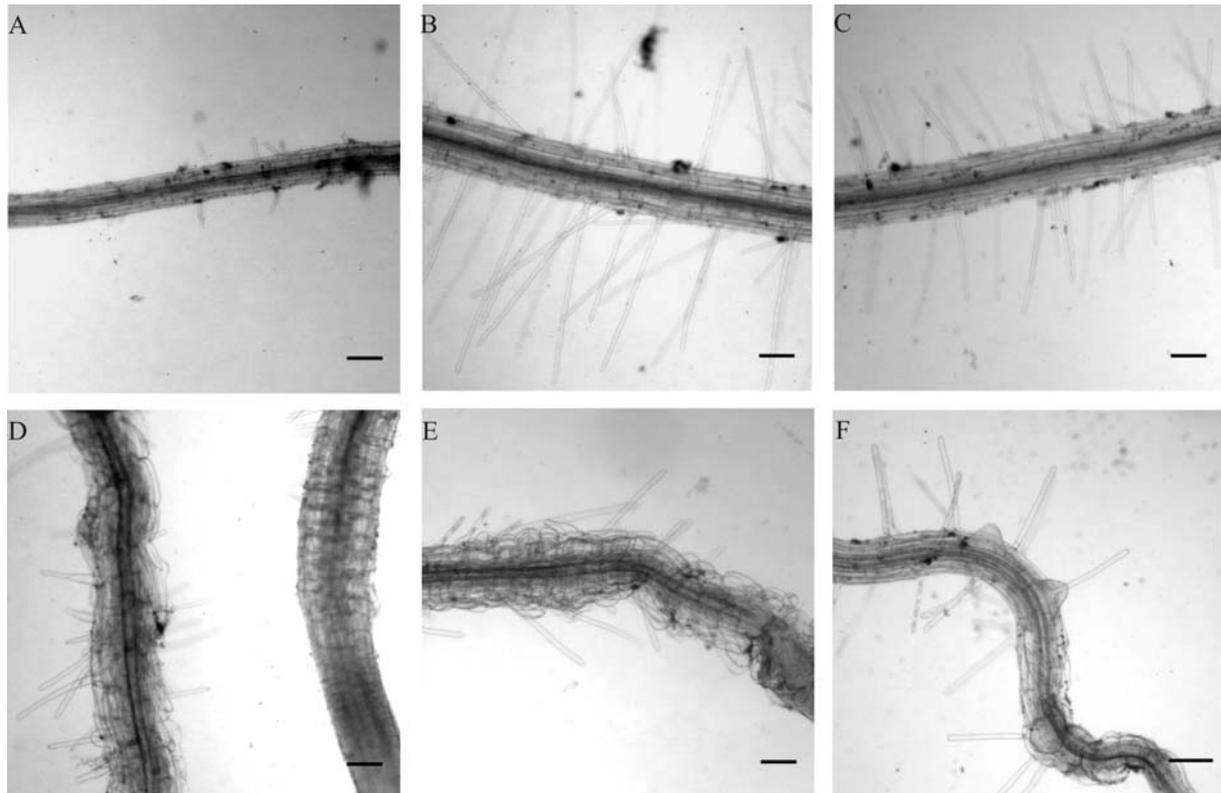




**Abb. I Expressionsverhalten der UGE-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* unterschiedlicher Gewebe und Entwicklungsstadien (*UGE1* (At1g12780), *UGE2* (At4g23920), *UGE3* (At1g63180), *UGE4* (At1g64440), *UGE5* (At4g10960)), ([ftp.arabidopsis.org](http://ftp.arabidopsis.org)).** 1: Keimling (grüne Teile), 2: Rosettenblatt #4 (1cm lang), 3: Rosettenblatt #4 (1cm lang), 4: Rosettenblatt #4 (1cm lang), 5: Rosettenblatt # 2, 6: Rosettenblatt # 4, 7: Rosettenblatt # 4, 8: Rosettenblatt # 8, 9: Rosettenblatt # 10, 10: Rosettenblatt # 12, 11: Rosettenblatt # 12, 12: Blatt 7 (Stengelblatt), 13: Cotyledon, 14: Blatt 7 (proximal der Hälfte), 15: Blatt 7 (distal der Hälfte), 16: ganze Pflanze (nach Stengelbildung, jedoch vor Blütenbildung), 17: ganze Pflanze (nach Stengelbildung, jedoch vor Blütenbildung), 18: ganze Pflanze (nach Stengelbildung, jedoch vor Blütenbildung), 19: Seneszenzblätter, 20: Stengelblatt, 21: Stengel (zweite Internode), 22: erste Internode, 23: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 24: Hypocotyl, 25: Blüte (Stadium 9), 26: Blüte (Stadium 10/11), 27: Blüte (Stadium 12), 28: Blüte (Stadium 12; Kelchblätter), 29: Blüte (Stadium 12, Blütenblätter), 30: Blüte (Stadium 12, Stamen), 31: Blüte (Stadium 12; Karpell), 32: Blüte (Stadium 15), 33: Wurzeln, 34: Blüte (Stadium 15; Blütenstengel), 35: Blüte (Stadium 15; Kelchblätter), 36: Blüte (Stadium 15; Stamen), 37: Blüte (Stadium 15; Karpell), 38: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 39: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 40: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 41: Stengelspitze (junge Blätter vorhanden), 42: Stengelspitze (junge Blätter vorhanden), 43: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 44: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 45: Stengelspitze (nach der Blütenentwicklung), 46: Blüte (Stadium 12; äquivalent: vergrößertes Meristem; Anstieg der Anzahl der Organe), 47: Blüte (Stadium 12; äquivalent: Blüten haben eine blattähnliche Form), 48: Blüte (Stadium 12; äquivalent: Blüten ohne Kelchblätter und Petale; Blüten durch sekundäre Blüten ersetzt), 49: Blüte (Stadium 12; äquivalent: Blüten ohne Kelchblätter, Petale; Karpell-ähnliche Struktur der Kelchblätter), 50: Blüte (Stadium 12; äquivalent: Blüten ohne Kelchblätter und Stamen), 51: Blüte (Stadium 12; äquivalent: Blüten ohne Stamen und Karpelle; ersetzt durch Kelchblätter und Petale), 52: Blüte (Stadium 12; äquivalent: faserartige Organe in zwei oder drei Windungen), 53: Blätter 1 + 2, 54: vegetative Stengelspitze, 55: reife Pollen, 56: Schote (Stadium 2; ohne Samen), 57: Blüte (Stadium 12; äquivalent: Multi-Karpell Gynoeceum; vergrößertes Meristem; Anstieg der Anzahl der Organe), 58: Schote (Stadium 4; ohne Samen), 59: Schote (Stadium 5; ohne Samen), 60: Schote (Stadium 6; ohne Samen), 61: Blüte (Stadium 9), 62: Samen (Stadium 7; ohne Schote), 63: Samen (Stadium 8; ohne Schote), 64: Samen (Stadium 9; ohne Schote), 65: Samen (Stadium 10; ohne Schote), 66: Rosettenblätter, 67: Rosettenblätter, 68: ganze Pflanze (nach Stengelbildung, jedoch vor Blütenbildung), Rosettenblätter, 70: Blatt, 71: Blüte, 72: Wurzeln, 73: Wurzeln, 74: Wurzeln, 75: Keimling (grüne Teile), 76: Keimling (grüne Teile), 77: Wurzeln, 78: Wurzeln, 79: Wurzeln.

**Tab. XV** Anzahl der tatsächlich überlebenden Pflanzen (O) und Anzahl der erwarteten überlebenden Pflanzen (E) der Nachkommen der heterozygoten T-DNA Linie *uge3-2#2* der F1-Generation nach Selektion auf Sulfadiazin (O: observed; E: expected).

tatsächlich überlebende Pflanzen (O)	erwartete überlebende Pflanzen (E)	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
805	725,5	80,5	6480,25	8,94
161	241,5	-80,5	6480,25	26,83



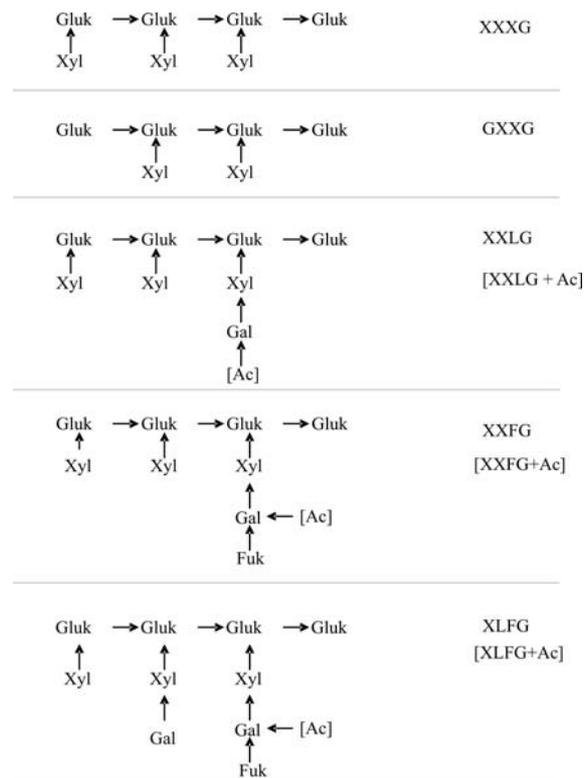
**Abb. II** Phänotypische Bestimmung 8 Tage alter Col-0 und *uge3-1* Wurzeln. (A) Col-0 in 0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (B) Col-0 in 1 µM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (C) Col-0 in 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (D) *uge3-1* in 0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (E) *uge3-1* in 1 µM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (F) *uge3-1* in 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Skala = 200 µm. Wachstumsbedingung: MS-Flüssigmedium, permanentes Licht, 1% Saccharose.

**Tab. XVI** Anzahl der tatsächlich überlebenden Pflanzen (O) und Anzahl der erwarteten überlebenden Pflanzen (E) der Nachkommen der heterozygoten T-DNA *uge4#E5* der F1-Generation nach Selektion auf Sulfadiazin (O: observed; E: expected).

tatsächlich überlebende Pflanzen (O)	erwartete überlebende Pflanzen (E)	O-E	(O-E) <sup>2</sup>	(O-E) <sup>2</sup> /E
976	987	-11	121	0,123
340	329	11	121	0,368

**Tab. XVII Genotypische und phänotypische Analyse der Nachkommen (F2) der heterozygoten gekreuzten Linie *uge4x3#8/2* der F1-Generation.** Der Phänotyp wurde anhand der Wurzellänge nach 12 Tagen Wachstum bestimmt. (WT: Die Wurzellänge entspricht der des Wildtypen, 2x KO: Die Wurzellänge entspricht der der Doppelmutante, *uge3*: Die Wurzellänge entspricht der der väterlichen Linie *uge3-1*, *uge4*: Die Wurzellänge entspricht der der mütterlichen Linie *uge4#E5/A3*) Der Genotyp wurde anhand der T-DNA Insertionen in den Genen *UGE3* und *UGE4* durch PCR überprüft. (hetero: Die T-DNA ist nur in heterozygoter Form im Gen *UGE3* oder *UGE4* vorhanden, homo: Die T-DNA ist in homozygoter Form im Gen *UGE3* oder *UGE4* vorhanden, WT: Das Wildtyp-Gen konnte amplifiziert werden, keine T-DNA ist vorhanden). Wachstumsbedingungen: MS-Festmedium (0,5% Gelrite), 1% Saccharose, permanentes Licht.

Plattennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Phänotyp	WT	2x KO	WT	WT	2x KO	<i>uge3</i>	WT	WT	WT	WT
Genotype <i>uge3</i>	hetero	WT	homo	hetero	hetero	hetero	homo	homo	hetero	homo
Genotype <i>uge4</i>	hetero	homo	hetero	hetero	hetero	hetero	WT	WT	hetero	WT
Plattennummer	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Phänotyp	WT	<i>uge3</i>	<i>uge4</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	2x KO
Genotype <i>uge3</i>	hetero	hetero	WT	WT	hetero	hetero	homo	homo	hetero	WT
Genotype <i>uge4</i>	hetero	hetero	hetero	hetero	hetero	hetero	WT	WT	hetero	hetero
Plattennummer	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Phänotyp	<i>uge4</i>	<i>uge4</i>	WT	<i>uge3</i>	WT	2x KO	2x KO	WT	WT	WT
Genotype <i>uge3</i>	WT	WT	hetero	hetero	homo	WT	-	hetero	hetero	homo
Genotype <i>uge4</i>	homo	homo	hetero	hetero	hetero	hetero	-	hetero	hetero	hetero
Plattennummer	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Phänotyp	WT	WT	<i>uge4</i>	WT	2x KO	<i>uge3</i>	WT	WT	<i>uge3</i>	<i>uge3</i>
Genotype <i>uge3</i>	hetero	homo	WT	homo	WT	hetero	hetero	homo	homo	WT
Genotype <i>uge4</i>	hetero	WT	hetero	WT	hetero	hetero	hetero	WT	hetero	hetero
Plattennummer	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Phänotyp	<i>uge3</i>	WT	WT	WT	2x KO	WT	WT	WT	WT	<i>uge3</i>
Genotype <i>uge3</i>	homo	homo	hetero	homo	WT	hetero	homo	hetero	hetero	homo
Genotype <i>uge4</i>	hetero	WT	hetero	WT	hetero	hetero	hetero	hetero	hetero	hetero
Plattennummer	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Phänotyp	WT	<i>uge3</i>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	<i>uge4</i>	<i>uge3</i>
Genotype <i>uge3</i>	hetero	hetero	hetero	hetero	homo	homo	hetero	hetero	WT	homo
Genotype <i>uge4</i>	hetero	hetero	hetero	hetero	WT	WT	hetero	hetero	homo	hetero
Plattennummer	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Phänotyp	<i>uge4</i>	WT	2x KO	WT	WT	WT	<i>uge3</i>	WT	WT	<i>uge3</i>
Genotype <i>uge3</i>	WT	homo	hetero	homo	hetero	homo	WT	homo	homo	homo
Genotype <i>uge4</i>	homo	WT	hetero	WT	hetero	WT	hetero	hetero	WT	WT
Plattennummer	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Phänotyp	<i>uge3</i>	2x KO	WT	WT	WT		WT	2x KO	WT	WT
Genotype <i>uge3</i>	homo	WT	hetero	homo	hetero		homo	WT	hetero	hetero
Genotype <i>uge4</i>	WT	homo	hetero	WT	hetero		WT	homo	hetero	hetero
Plattennummer	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Phänotyp	<i>uge3</i>	<i>uge3</i>	WT	2x KO	2x KO		WT	2x KO	WT	<i>uge4</i>
Genotype <i>uge3</i>	hetero	homo	hetero	WT	WT		homo	hetero	homo	WT
Genotype <i>uge4</i>	hetero	WT	hetero	hetero	hetero		WT	hetero	WT	hetero
Plattennummer	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Phänotyp	WT	2x KO	WT	<i>uge4</i>	WT	WT	WT	<i>uge3</i>	WT	
Genotype <i>uge3</i>	homo	hetero	homo	WT	homo	homo	homo	hetero	homo	
Genotype <i>uge4</i>	WT	hetero	WT	hetero	WT	hetero	hetero	hetero	WT	

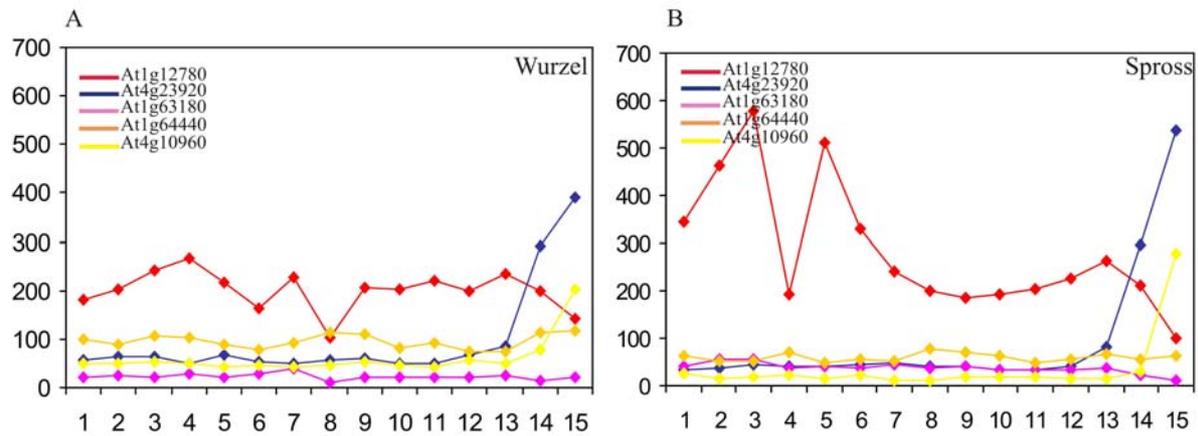


**Abb. III Xyloglukanfragmente bekannter Oligosaccharide.** Gluk: Glukose, Xyl: Xylose, Gal: Galaktose, Ac: Acetylierung, Fuk: Fukose, G: unsubstituierte Glukose-Einheit, X: durch Xylose substituierte Glukose-Einheit, L: durch Galaktose substituierte Xylose-Glukose-Einheit, L: durch Galaktose substituierte Xylose-Glukose-Einheit F: durch Fukose substituierte Galaktose-Xylose-Glukose-Einheit (Fry *et al.*, 1993).

**Tab. XVIII Metaboliten Analyse 12 Tage alter Sprosse und Wurzeln.** Alle Werte wurden auf den Wildtypen Col-0 bezogen. (Wachstumsbedingungen Sprosse: MS-Festmedium, 1,2% Agar, 0% oder 1% Saccharose, permanentes Licht; Wachstumsbedingungen Wurzel: MS-Flüssigmedium, 1% Saccharose, permanentes Licht). (Sac.: Saccharose. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden durch \*, alle Werte  $p < 0,01$  durch \*\* gekennzeichnet. Alle Werte  $< 1$  wurden in Grün dargestellt, alle Werte  $> 1,5$  in Rot dargestellt.).

	<i>uge3-1</i> /Col-0 Spross 1% Sac.		<i>uge3-1</i> /Col-0 Spross 0% Sac.		<i>uge3-1</i> /Col-0 Wurzel 1% Sac.	
	x-fach	T-Test	x-fach	T-Test	x-fach	T-Test
Alanin	2,10	0,0267*	1,87	0,2704	2,74	0,0005**
Asparagin	1,74	0,0465*	1,80	0,2790	1,93	0,0102
Aspartat					1,60	0,0032**
Cystein	1,51	0,0347*			2,09	0,0018**
Glutamat	1,83	0,2915			1,41	0,0469*
Glutamin	1,83	0,2915			1,41	0,0469*
Homocystein					1,76	0,0230*
Homoserin	1,79	0,0345*				
Hydroxyprolin	1,76	0,0761			1,72	0,0241*
o-acetyl-Serine	0,54	0,3209	0,10	0,2628	2,87	0,0214*
Threonin					1,87	0,0455*
Tryptophan	0,35	0,0978	1,97	0,0339*		
Lysin	2,40	0,1576				
Methionin			1,96	0,2189		
Phenylalanin			1,93	0,2258		
Pyroglutamat	1,77	0,0827			1,71	0,0219*
Valin	1,76	0,0075**				
Fruktose-6-P	2,40	0,0483*			2,15	0,0322*
Galaktose-6-P	1,79	0,0967			1,66	0,0206*
Glukonat-6-P					2,19	0,0727
Glukose-6-P	2,47	0,0135*			1,89	0,0361*
Glycerol-1-P	2,29	0,0024**			1,77	0,0695
Mannose-6-P	2,44	0,0434*			2,16	0,0369*
Myoinositol-P	1,87	0,0173*			2,21	0,0287*
Arabinose			0,60	0,4656	2,13	0,0132*
Galaktose			0,39	0,4144		
Glukose			0,26	0,2957	2,16	0,0054**
Melezitose			0,46	0,4959	2,01	0,0166*
Melibiose	0,52	0,2098	0,55	0,4383		
Rhamnose	1,62	0,0457*				
Trehalose					2,38	0,0129*
Xylose			0,60	0,4731	2,12	0,0135*
Erythritol	1,51	0,0000**				
Glycerol	1,74	0,0037**				
Inositol					1,93	0,0432*
Ononitol					0,68	0,6234
Xylitol					2,50	0,0568
Aconitat	0,74	0,4870				
Aminobutansäure	0,74	0,3952	0,58	0,4593	1,36	0,0223*
Ascorbat	2,31	0,0957			2,73	0,1088
Citramalat			0,71	0,5993		
Citrat			0,50	0,4429	0,49	0,0348*
Cumarsäure			0,37	0,2648	2,00	0,1952
Dehydroascorbat			0,60	0,3424	0,72	0,1191
Ferulasäure			0,21	0,1997	2,79	0,1286
Fumarat			0,58	0,4389	0,44	0,0173*
Galakturonat			4,10	0,4040	4,71	0,0012**
Gluconat	1,82	0,1087				
Glutarat	1,78	0,1900	2,08	0,1834	1,78	0,0319*

	<i>uge3-1</i> /Col-0 Spross 0% Sac.		<i>uge3-1</i> /Col-0 Spross 1% Sac.		<i>uge3-1</i> /Col-0 Wurzel 0% Sac.	
	x-fach	T-Test	x-fach		x-fach	T-Test
Glycerat			0,74	0,3032		
Gulonat			0,55	0,0059**	0,64	0,1898
Harnsäure					0,35	0,1071
Isoascorbat					2,31	0,1735
Isocitrat	0,75	0,4744	0,62	0,5268	0,67	0,2539
Kaffeesäure					2,00	0,0440*
Malat	0,49	0,2403	0,11	0,3904	0,61	0,0915
Salicylsäure			0,11	0,0997	0,25	0,2361
Shikimat	0,72	0,4950				
Sinapinsäure					0,71	0,6691
Threoninsäure			0,53	0,5024		
Zuckersäure					1,76	0,1867
$\alpha$ -Tocopherol	2,22	0,1714	1,86	0,0787		
$\gamma$ -Tocopherol	0,51	0,1144			0,73	0,1583



**Abb. IV AtGenexpress: Expressionsverhalten der *UGE*-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* Wurzel- und Sprossproben ohne und mit Kälteinduktion.** (16 Tage alt, Festmedium) (*UGE1* (At1g12780), *UGE2* (At4g23920), *UGE3* (At1g63180), *UGE4* (At1g64440), *UGE5* (At4g10960)), ([ftp.arabidopsis.org](http://ftp.arabidopsis.org)). 1: Kontrolle, 2: Kontrolle (0,25 h außerhalb der Wachstumskammer), 3: Kontrolle (0,5 h außerhalb der Wachstumskammer), 4: Kontrolle (1 h außerhalb der Wachstumskammer), 5: Kontrolle (3 h außerhalb der Wachstumskammer), 6: Kontrolle (4 h außerhalb der Wachstumskammer), 7: Kontrolle (6 h außerhalb der Wachstumskammer), 8: Kontrolle (12 h außerhalb der Wachstumskammer), 9: Kontrolle (24 h außerhalb der Wachstumskammer), 10: Kälte (4°C, 0,5h), 11: Kälte (4°C, 1h), 12: Kälte (4°C, 3h), 13: Kälte (4°C, 6h), 14: Kälte (4°C, 12h), 15: Kälte (4°C, 24h).