



Untersuchungen zum Einfluss der komplexen
Glykoprotein-Modifikation auf die
Zellwandbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Julia Frank
aus Pinneberg

Münster, März 2008

Dekan: Prof. Dr. Norbert Sachser

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Antje von Schaewen

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Bettina Tudzynski

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2008

Tag der Promotion: 6. Juni 2008

Für meine Eltern ...

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Die Zellwand	1
1.1.1 Die Cellulosesynthese	1
1.1.2 Aufbau der Zellwand durch die Cellulosemikrofibrillen	3
1.2 Das Sekretorische System in Höheren Pflanzen.....	4
1.3 Die N-Glykosylierung	6
1.3.1 Die verschiedenen Formen der N-Glykane in Pflanzen	6
1.3.2 Glykosidasen und Glykosyltransferasen der N-Glykanprozessierung	8
1.4 Fragestellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	13
2.2 Pflanzenmaterial	14
2.2.1 Pflanzenanzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2.2 Verwendete und identifizierte Arabidopsislينien	14
2.2.3 Kreuzen von Arabidopsispflanzen.....	16
2.2.4 Phänotypuntersuchung von Arabidopsiswurzeln	16
2.2.5 Pflanzenanzucht von Tabakstecklingen.....	16
2.2.6 Protoplasten-Isolierung.....	16
2.3 Molekularbiologische Methoden	19
2.3.1 Bakterienstämme und Plasmide	19
2.3.2 Bakterienkulturen	20
2.3.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.3.4 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.3.5 Blau-Weiß-Selektion	22
2.3.6 Plasmidisolierung	22
2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	23
2.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzengewebe	23
2.4.2 Gesamt RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial.....	24
2.4.3 Synthese von komplementärer DNA	24
2.4.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)....	25
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.4.6 Reinigung von DNA-Fragmenten	27
2.4.7 DNA-Restriktion	27
2.4.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden	28
2.4.9 Anhängen eines Adenin-Überhangs an ein PCR-Fragment	28
2.4.10 DNA-Ligation.....	29
2.4.11 DNA-Sequenzierung	29
2.5 Klonierungen	29
2.5.1 Klonierung eines CESA1-Vollängen-Klons	29
2.5.2 Klonierung des <i>bait</i> -Konstruktes für die Hefe-2-Hybrid-Analyse	30
2.5.3 Klonierung des N-Terminus von CESA1 an den N-Terminus des GFP	30
2.5.4 Klonierung von CESA1 an den N-Terminus des GFP.....	30
2.5.5 Klonierung von CESA1 mit einer weiteren Transmembrandomäne an den N-Terminus des GFP	31
2.5.6 Klonierung von CESA1 an den C-Terminus des YFP	31
2.5.7 Klonierung des KinesinLC an den N- und C-Terminus des OFP	32
2.5.8 Klonierung des pOPF2ΔΔNcoI-Vektors	32
2.5.9 Klonierung von KORRIGAN an den N-Terminus des OFP	32

2.6 Biochemische Methoden	32
2.6.1 LewisA-Antikörper-Herstellung.....	32
2.6.2 Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe	33
2.6.3 Isolierung von Apoplasteneluat aus Blättern.....	34
2.6.4 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)	34
2.6.5 Behandlung der Proteinextrakte mit Peptid-N-Glycosidase F	34
2.6.6 Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
2.6.7 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.6.8 Western-Blot-Analyse und Immundekoration.....	36
2.6.8.1 Färbung geblotteter Proteine mit PonceauS	37
2.6.8.2 Colorimetrische Entwicklung.....	38
2.6.8.3 Chemilumineszente Entwicklung	38
2.6.8.4 Ablösen eines gebundenen Antikörpers („strippen“)	38
2.6.8.5 „Dot-Blot“ – eine Variante des Western-Blots	38
2.6.9 Nachweis endständiger Mannosen mittels Concanavalin A.....	39
2.6.10 Behandlung von geblotteten Proteinen und Proteinextrakten mit <i>jack bean-</i> Mannosidase	39
2.6.11 Glucuronidase-Aktivitätstest	40
2.7 Hefe-2-Hybrid-System	40
2.7.1 Hefestamm und Wachstumsbedingungen	41
2.7.2 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation	41
2.7.3 Bestimmung der 3-amino-1,2,4-triazole-Konzentration zur Expressionsunterdrückung des Histidin-Gens.....	42
2.7.4 Hefe-2-Hybrid- <i>screen</i>	42
2.7.5 Filter-Lift-Assay zur Detektion der β -Galactosidase-Aktivität.....	43
2.7.6 Plasmidisolierung aus Hefezellen und Kolonie-PCR.....	44
2.7.7 Mini- <i>mating</i> der möglichen Interaktionspartner mit dem leerem Vektor	44
2.8 Mikroskopie.....	45
2.8.1 Confokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM).....	45
2.8.2 Rasterelektronenmikroskopie	46
2.9 Computerprogramme.....	46
3 Ergebnisse.....	47
Teil I	47
3.1 Cellulosesynthase A1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.1.1 Lokalisation der Cellulosesynthase A1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in Protoplasten .	47
3.1.2 Lokalisations-Studien von CESA1 mit Markerkonstrukten für das Sekretorische System	50
3.2 Hefe-2-Hybrid-Analyse mit der cytosolischen Domäne der Cellulosesynthase A1	54
3.2.1 Lokalisationsstudien von KinesinLC und CESA1	57
Teil II	59
3.3 <i>cgl1</i> -Mutanten und die Kreuzung in <i>stt3a-2</i>	59
3.3.1 Mutationen in den <i>cgl1</i> -Linien C5, C6 und <i>cgl1-T</i>	59
3.3.1.1 Identifizierung der <i>cgl1-T</i>	60
3.3.2 Kreuzung der <i>cgl1-C6</i> -Mutante in <i>stt3a-2</i>	61
3.3.3 Immunologische Analyse der <i>cgl1</i> -Mutanten und der <i>cgl1 stt3a-2</i> -Doppelmutanten	61
3.3.4 Phänotyp der <i>cgl1</i> -Mutanten und der <i>cgl1 stt3a-2</i> -Doppelmutanten	62
3.3.5 mRNA-Analyse der <i>cgl1</i> -Mutanten.....	66
3.3.5.1 Alternatives Spleißen der C6-mRNA	68
3.3.6 Lokalisationsstudien von KOR1 in <i>cgl1-T</i> , <i>stt3a-2</i> und <i>cgl1-T stt3a-2</i>	69

3.3.7 REM-Aufnahmen der <i>cgl1-T stt3a-2</i> -Doppelmutante mit den Zellwandmutanten <i>rsw2-1</i> und <i>rsw1-1</i>	71
3.4 Glykosylierungsmutanten	74
3.4.1 Identifizierung von Arabidopsis-T-DNA-Mutanten	74
3.4.1.1 Identifizierung einer homozygoten <i>gnTII</i>	74
3.4.1.2 Identifizierung einer homozygoten <i>fucTc</i>	75
3.4.2 Proteinmuster der Glykosylierungsmutanten	76
3.4.3 Immunologische Analyse der Glykosylierungsmutanten	78
3.4.4 Untersuchung der Glykomutanten mit KOR1-spezifischen Antikörpern	83
3.5 Herstellung eines Antikörpers gegen das LewisA-Epitop	86
4. Diskussion	89
4.1 Lokalisationsstudien verschiedener Cellulosesynthase A1-Konstrukte in Protoplasten mit Markern für das Sekretorische System	89
4.2 Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-2-Hybrid-System	93
4.2.1 Mögliche Interaktionspartner der Cellulosesynthase A1 in Arabidopsis	93
4.2.1.1 Proteine aus der <i>Bcl-2-associated athanogene</i> -Familie (BAG-Proteine)	93
4.2.1.2 Protein der Glycosylhydrolase-Familie 36	94
4.2.1.3 Ein genereller Regulierungsfaktor (GRF3)	96
4.2.1.4 Ein Motorprotein (<i>kinesin light chain-related</i> Protein)	96
4.2.1.4.1 Lokalisation des <i>kinesin light chain-related</i> Protein	98
4.2.1.4.2 Co-Expressionsanalysen von <i>kinesin light chain-related</i> Protein und Cellulosesynthase A1	99
4.3 Die <i>cgl1</i> -Mutanten und Kreuzungen mit diesen Mutanten	100
4.3.1 Mutationen in <i>cgl1</i>	100
4.3.2 Charakterisierung der <i>cgl1</i> -Mutanten und deren Kreuzungen mit <i>stt3a-2</i>	103
4.3.3 KOR1-OFP-Expression in den <i>cgl1-T</i> -, <i>stt3a-2</i> -Einzelmutanten und der <i>cgl1-T stt3a-2</i> -Doppelmutante	105
4.3.4 Kreuzungen von <i>cgl1-T stt3a-2</i> mit <i>rsw1-1</i> und <i>rsw2-1</i> in Kombination	106
4.4 Glykosylierungsmutanten	109
4.4.1 Proteinmuster in den Glykosylierungsmutanten	110
4.4.2 Komplexe Glykane in den Glykosylierungsmutanten	111
4.4.3 Die Endoglucanase KORRIGAN 1 in den Glykosylierungsmutanten	119
4.5 Das LewisA-Epitop in Pflanzen	124
5 Zusammenfassung	127
6 Literatur	129
7 Anhang	139
7.1 Abkürzungsverzeichnis	139
7.2 Abbildungsverzeichnis	140
7.3 Tabellenverzeichnis	141
7.4 Sequenzen zur Herstellung von Konstrukten	142
7.4.1 DNA- und Protein-Sequenz der Cellulosesynthase A1 aus <i>A. thaliana</i> (At4g32410)	142
7.4.2 DNA- und Protein-Sequenz von Korrigan aus <i>A. thaliana</i> (At5g49720)	144
7.4.3 DNA- und Protein-Sequenz von KinesinLC aus <i>A. thaliana</i> (At4g10840)	145
7.5 Sequenzen der pACT-cDNA-Bank-Konstrukte	146
7.5.1 <i>kinesin light chain-related</i> -Protein	146
7.5.2 <i>general regulation factor 3</i> -Protein (GRF3)	147
7.5.3 <i>Bcl-2-associated athanogene 3</i> -Protein (BAG3)	147
7.5.4 <i>Bcl-2-associated athanogene 1</i> -Protein (BAG1)	147
7.5.5 <i>dark inducible 10</i> -Protein (DIN10) oder Raffinosesynthase	148

7.6 Sequenzierungen der Glykosylierungsmutanten <i>cglI-T</i> , <i>gnIII</i> , <i>fucTc</i> (genomische DNA) und C6-cDNA.....	148
7.6.1 T-DNA-Insertion in <i>cglI-T</i>	148
7.6.2 Sequenzierung der C6-cDNA.....	150
7.6.3 T-DNA-Insertion in <i>gnIII</i>	151
7.6.4 T-DNA-Insertion in <i>fucTc</i>	151
7.7 Vektorkarten.....	153
7.7.1 pOFP Δ NcoI (ursprünglicher Name pSY526).....	153
7.7.2 pYFP2.....	153
7.7.3 pGFP2 Δ NcoI.....	154
7.7.4 pOFP2 $\Delta\Delta$ NcoI.....	154
Eidesstattliche Versicherung.....	155
Lebenslauf.....	156

1 Einleitung

1.1 Die Zellwand

Pflanzenzellen besitzen im Gegensatz zu tierischen Zellen eine Zellwand, die der Zelle mechanische Stabilität verleiht und dem Turgordruck der Vakuole entgegenwirkt. Der plasmatische Inhalt einer Zelle ist von einer Plasmamembran umgeben und bildet den Protoplast. Der Protoplast ist von einer Zellwand umgeben. Erst durch die Zellwand bekommt der Protoplast eine Form, welche durch die Funktion der Zelle definiert ist. Die Zellwand von Pflanzen ist nicht homogen, sondern eine komplexe Mischung aus Polysacchariden und Proteinen. Der hauptsächliche Kohlenhydratbestandteil ist Cellulose, die im nächsten Abschnitt näher vorgestellt wird. Hemicellulosen sind ein weiterer Bestandteil der Zellwand. Sie umfassen eine Vielfalt verzweigter Polysaccharide, die neben Glucose auch Mannose, Galactose, Fucose, Xylose und Arabinose enthalten. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist das Pektin, ein Gemisch aus Polymerisaten von Zuckersäuren (z. B. Galacturonsäure). Die freien Carboxygruppen der Zuckersäuren können untereinander durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zusammengehalten werden (Heldt, 1999).

1.1.1 Die Cellulosesynthese

Den Hauptteil der Polysaccharide in der Zellwand macht die Cellulose aus. Cellulose ist ein unverzweigtes Polymer aus Glucosemolekülen, die durch β -1,4-Bindungen verknüpft sind. Die kleinste Untereinheit ist das Disaccharid Cellobiose. Jede Glucoseeinheit ist um 180° gegenüber der nächsten gedreht, was die Ausbildung langer gerader Ketten ermöglicht. Mehrere Celluloseketten lagern sich spontan zu kristallinen Mikrofibrillen zusammen. Der Zusammenhalt innerhalb und zwischen den einzelnen Ketten wird durch Wasserstoffbrücken und „van der Waals“-Kräfte hervorgerufen (French et al., 1993). Diese kristallinen Mikrofibrillen sind wasserundurchlässig, sehr reißfest und verleihen damit der Zelle einen Schutz gegen chemische und biologische Angriffe. Sie sind dabei so stabil, dass sie nur sehr schwer durch hydrolytische Enzyme spaltbar sind. Cellulose ist die am häufigsten vorkommende organische Substanz in der Biosphäre (Heldt, 1999).

Die Celluloseketten werden von der Cellulosesynthase gebildet, welches ein integrales Membranprotein ist. Es inseriert mit acht Transmembrandomänen in der Plasmamembran und bildet einen Zentralkanal aus, durch den die neu synthetisierte Cellulosekette in den extrazellulären Raum entlassen wird (Delmer, 1999). Das Arabidopsis-Genom enthält 12

Cellulosesynthase Gene (*CESA*) (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Alle Cellulosesynthasen weisen drei konservierte Aspartatreste und das QxxRW-Motiv auf, die beide eine essentielle Rolle bei der Substratbindung und Synthese der Cellulosemikrofibrillen spielen. Zwei oder mehrere verschiedene Cellulosesynthase-Untereinheiten sind für die Funktion und Ausbildung der Rosettenkomplexe nötig (Fargard et al., 2000, Taylor et al., 2000). Für die Protein-Protein-Interaktion der Cellulosesynthase-Untereinheiten miteinander sind die Zink-Domänen am N-Terminus wichtig, die unter oxidativen Bedingungen die Dimerisierung der Cellulosesynthase-Untereinheiten bewirken (Kurek et al., 2002) (Abb. 1.1).

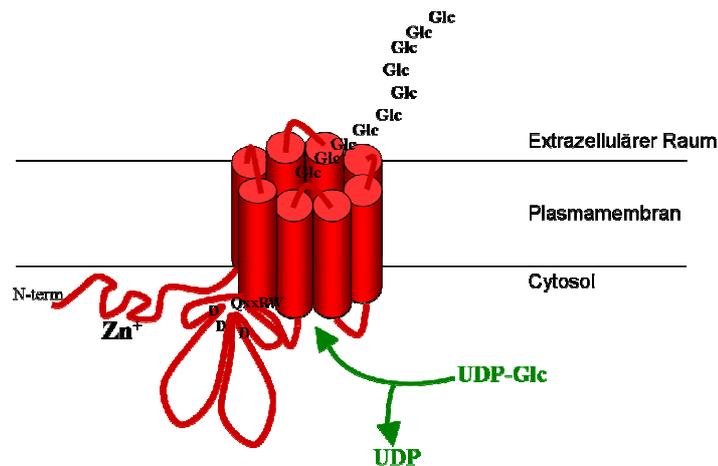


Abb. 1.1: Das Tonnen-Modell einer Cellulosesynthase-Untereinheit. Am N-Terminus befinden sich zwei Zink-Domänen, die für die Ausbildung von Dimeren zweier *CESA*-Untereinheiten und somit zur Bildung der Rosettenkomplexe wichtig sind. Die Cellulosekette wird durch die Verknüpfung von Glucosemolekülen gebildet und in den extrazellulären Raum entlassen.

Die Cellulosesynthase-Gene werden zell- und gewebespezifisch exprimiert. Arabidopsis-Zellwandmutanten in (*irx3*, *rsw1*, *prc1*) mit Defekten in der Synthese und Ablagerung von Cellulosefibrillen zeigten, dass die verschiedenen *CESA*-Gene zellspezifische Funktionen bei der Synthese der Primär- bzw. Sekundärwand haben (Taylor et al., 1999, Arioli et al., 1998, Fargard et al., 2000). So bildet die *rsw1*-Mutante bei niedrigen Temperaturen (ca. 18°C) das Erscheinungsbild des Wildtyps aus, bei Temperaturen über 30°C hingegen stellen die Wurzeln ihr Längenwachstum ein und die Wurzelspitzen beginnen anzuschwellen (*rsw* = *radial swelling*). *rsw1* ist eine Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutante, bei der das Gen der Cellulosesynthase A1 betroffen ist. Cellulosesynthase A1 (*CESA1*) ist bei der Bildung der Primärwand involviert. Die Mutation bewirkt eine Reduktion der kristallinen Cellulose und verursacht eine verminderte Zahl von Rosettenkomplexen in der Membran (Arioli et al., 1998). Für die Synthese der Mikrofibrillen benötigt die Cellulosesynthase-Untereinheit einen Glucose-Primer, der von dem Typ II-Membranprotein KORRIGAN, einer β -1,4-Endoglucanase (*KOR1*, Nicol et al., 1998) angereicht wird. Peng et al. (2002) identifizierten

ein Sitosterol- β -Glucosid als Initiator der Cellulosesynthese in Pflanzen. Die Sitosterol- β -Glucosid-Bildung und die Verlängerung durch eine initialisierende Cellulosesynthase-Untereinheit mit weiteren Glucosemolekülen formt eine Art Primer, das Sitosterol-Cellodextrin. Das Cellodextrin wird durch KOR1 vom Sitosterol abgetrennt und an die Cellulosesynthase-Untereinheiten des Rosettenkomplexes weitergereicht, die es als Startkette zur Verlängerung nutzen und daraufhin die Cellulosemikrofibrillen ausbilden.

1.1.2 Aufbau der Zellwand durch die Cellulosemikrofibrillen

Die β -1,4 verknüpften Glucoseketten lagern sich spontan nach ihrer Synthese zu kristallinen Mikrofibrillen zusammen und bilden so entlang der Syntheserichtung der Mikrofibrillen eine nicht-elastische Struktur. Die Mikrofibrillenorientierung in der Zellwand ist der Schlüsselfaktor bei der Kontrolle der Zellstreckung und Zellform. Das Muster der Cellulosefibrillen ist abhängig vom Zelltyp und vom Entwicklungsstadium. Diese verschiedenartigen Anordnungen (vgl. Abbildung 1.2) haben Auswirkungen auf die Eigenschaften der Zellwand. Eine junge Zelle muss noch in der Lage sein zu wachsen und an Volumen zunehmen zu können. So liegen die Mikrofibrillen in der Primärwand diffus vor, um einer Volumenzunahme mechanisch nicht im Wege zu stehen. Je älter die Zelle wird, desto stärker ist die Tendenz der Mikrofibrillen in einer Zellwandschicht sich parallel zueinander anzuordnen. Im fortgeschrittenen Sekundärwandstadium sind die Fasern transversal um die Zelle angeordnet. Durch die starre Struktur der Fasern ist nur noch eine Längenausdehnung der Zelle in die Zellstreckungsrichtung möglich.

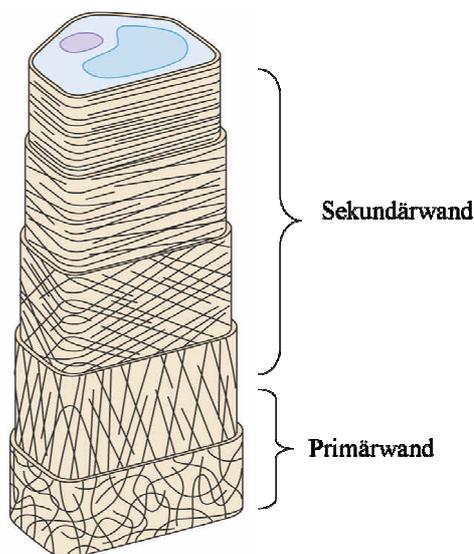


Abb. 1.2: Cellulosemikrofibrillenablagerung in der Zellwand. In der Primärwand einer jungen Zelle sind die Mikrofibrillen ungeordnet abgelegt, mit fortschreitendem Alter werden die Cellulosefasern transversal um die Zelle angeordnet (aus Buchanan et al., 2000).

Verschiedene Hypothesen wurden aufgestellt, die diese geordnete Ablagerung der Mikrofibrillen in der Zellwand zu erklären versuchen. Zwei davon sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden (für mehr Details siehe Emons and Mulder, 2000).

- I. Mikrofibrillen-Mikrotubuli-Paradigma
- II. *membran-flow*-Hypothese

I. Die Beobachtung, dass die Muster kortikaler Mikrotubuli während des Streckungswachstums von Pflanzenzellen mit der Lokalisation neusynthetisierter Cellulosemikrofibrillen in der extrazellulären Matrix korrelieren (Giddings and Staehelin, 1988; Seagull, 1986), führte zur „Mikrofibrillen-Mikrotubuli-Hypothese“ (Giddings and Staehelin, 1991). Diese Hypothese beschreibt die Funktion kortikaler Mikrotubuli als Schienen- oder Leitplanken-System zur Festlegung der Bewegungsrichtung der Rosettenkomplexe in der Plasmamembran. Die Hypothese wurde inzwischen durch verschiedene Experimente erhärtet. Haigler und Blanton (1996) konnten an Xylemzellen von *Zinnia elegans* eine Co-Lokalisation von Mikrotubuli mit Cellulosemikrofibrillen sichtbar machen. Erst vor kurzem konnte die Assoziation von CESA6 mit den kortikalen Mikrotubuli *in planta* beobachtet werden (Paradez et al., 2006).

II. Eine weitere Alternative stellt die „*membran-flow*-Hypothese“ dar (Mueller and Brown, 1982). Demnach liegen die Rosettenkomplexe frei in der viskosen Plasmamembran vor und werden durch die Synthese und Kristallisation der Mikrofibrillen voran geschoben. Die Aussage dieser Hypothese ist allgemein akzeptiert, jedoch geht diese Hypothese weiter davon aus, dass der Protoplast innerhalb der Zellwand rotiert. Diese Rotation konnte noch nicht nachgewiesen werden.

1.2 Das Sekretorische System in Höheren Pflanzen

Das Sekretorische System in Höheren Pflanzen besteht aus einer Vielzahl von Kompartimenten. Dazu gehören das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, die Endosomen und die Vakuole. Die Plasmamembran und der extrazelluläre Raum werden als Endstation für sekretierte Glykoproteine ebenfalls dazu gezählt. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) fungiert als Eintrittsstelle neu synthetisierter Proteine in das Sekretorische System. Die Faltung der Proteine findet nach dem Entfernen des Signalpeptids durch eine luminal Signalpeptidase statt. Falsch gefaltete Proteine werden von einem Qualitätskontrollmechanismus erkannt und für die Degradation ins Cytosol zurücktransportiert (Brandizzi et al., 2003). Richtig gefaltete Proteine werden über Vesikeltransport in den Golgi-Apparat geleitet. Der Golgi-Apparat stellt nicht nur den zentralen Ort für die Synthese von komplexen Polysacchariden für die Zellwand und Glykolipiden für die Plasmamembran dar, sondern auch den Ort der N-Glykosylierung von Proteinen, welche für die Zellwand, Plasmamembran oder Speichervakuole bestimmt sind. Der Golgi-Apparat ist außerdem das Schlüsselorganell beim Sortieren und Versenden von Proteinen (Neumann et al., 2003). Im Gegensatz zum tierischen Golgi-Apparat, der eher eine

stationäre kernnahe Position einnimmt, ist in Pflanzenzellen der Golgi-Apparat in individuelle Golgi-Stapel aufgetrennt, die auch unabhängig voneinander arbeiten (Staehelin and Moore, 1995). Jeder Golgi-Stapel besteht dabei aus mehreren polarisierten Zisternen, deren Morphologie und enzymatische Aktivität sich von der *cis*-, über die *medial*- bis zur *trans*-Seite nach und nach verändert (Fitchette et al., 1999). Die Golgi-Stapel sind innerhalb der Pflanzenzelle sehr mobil und bewegen sich entlang einem Aktin-Netzwerk (Boevink et al., 1998, Nebenführ and Staehelin, 2001).

Vom Golgi-Apparat ausgehend erfolgt die Verteilung der Proteine zur Plasmamembran, der Zellwand, den Endosomen und der Vakuole. Die Sortierung von Proteinen findet in Säugetierzellen im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) statt. Bisher konnte allerdings in Pflanzen noch kein diskretes „Protein-Sortier-Kompartiment“ „stromabwärts“ der *trans*-Seite des Golgi-Apparates identifiziert werden. Vielmehr kann in Pflanzen die Bildung sekretorischer Vesikel und die Sortierung von Proteinen bereits in der *cis*-Zisterne des Golgi-Stapels erfolgen (Neuman et al., 2003). Verschiedene Studien weisen jedoch darauf hin, dass auch Pflanzenzellen ein TGN besitzen (Saint-Jore-Dupas et al., 2004).

Über Endosomen in Pflanzen ist bisher recht wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass Pflanzenzellen mindestens zwei unterschiedliche endosomale Kompartimente beinhalten. Frühe Endosomen, welche beim Sortieren und Recyclen involviert sind und späte Endosomen bzw. das prävakuoläre Kompartiment, welches am Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zur lytischen Vakuole beteiligt ist (Tse et al., 2004).

Die meisten Proteine verlassen den Golgi-Apparat mit dem Ziel Plasmamembran oder Vakuole. Pflanzenzellen können zwei oder mehr Typen von Vakuolen enthalten. Wie die Proteine die Vakuolen erreichen, ist noch nicht zweifelsfrei geklärt (Paris et al., 1996). Der Transport zur lytischen Vakuole verläuft über das prävakuoläre Kompartiment und ist abhängig von einer N-terminalen Signalsequenz, welche von einem vakuolären Signalrezeptor erkannt wird (Paris and Neuhaus, 2002).

Die Transportroute vom *trans*-Golgi-Apparat zur Plasmamembran scheint der vorgegebene Weg für lösliche Proteine und komplexe Kohlenhydrate zu sein (Denecke et al., 1990). Lösliche sekretierte Proteine tragen kein Sortiersignal für die Plasmamembran, im Gegensatz dazu gibt es ein Signal für den Weg zur Vakuole und zurück ins ER (Hadlington and Denecke, 2000). Es ist nicht bekannt, wie Membranproteine zur Plasmamembran gelangen. Es wird vermutet, dass die Länge der Membrandomäne eine Sortierungsrolle übernimmt. Dennoch muss es eine Form von positiver Zielsteuerung oder nachträglicher Domänenbildung

geben, denn die Plasmamembran in Pflanzenzellen weist eine Asymmetrie in ihrer Zusammensetzung, Dicke und Verteilung von Membranproteinen auf (Neumann et al., 2003).

1.3 Die N-Glykosylierung

Die N-Glykosylierung stellt die Hauptmodifikation von Proteinen in der Pflanzenzelle dar und wird im Sekretorischen System durchgeführt. Der Prozess startet mit dem co-translationalen Transfer eines Oligosaccharids auf einen spezifischen Asparaginrest der entstehenden Polypeptidkette. In Pflanzen unterstützen N-Glykane die Konformation, die Stabilität und die biologische Aktivität von Glykoproteinen. Neben dem Einfluss auf die co- und post-translationale Proteinfaltung wird auch die Löslichkeit der Proteine durch N-Glykane verändert und ein Schutz vor proteolytischen Abbau gewährleistet. Die N-Glykosylierung ist unersetzlich für die Sekretion von extrazellulären Glykoproteinen. Durch Tunicamycin-Versuche konnte anschaulich gezeigt werden, dass Glykosylierung für Pflanzen überlebenswichtig ist (Tunicamycin blockiert die Übertragung des Glykans auf das naszierende Protein im ER).

Durch den Nachweis, dass auch Pflanzen ein Lewis-*acid*-Epitop (LewisA) an den Glykanen tragen, zeichnen sich zusätzliche mögliche Funktionen der N-Glykane ab. In Säugern ist das LewisA-Epitop üblicherweise auf Glykoproteinen zu finden. Dort ist bekannt, dass es bei der Zell-Zell-Erkennung und Adhäsion involviert ist. Die biologische Relevanz von diesem Epitop in Pflanzen ist noch nicht klar. LewisA-Epitope sind an sekretierten Proteinen und an Proteinen der Zelloberfläche gefunden worden, was eine Rolle in der Signalweiterleitung, der Zellkommunikation und der Interaktionen mit Pathogenen vermuten lässt (Lerouge et al., 1998).

1.3.1 Die verschiedenen Formen der N-Glykane in Pflanzen

Beim Durchlaufen des Sekretorischen Systems wird das im ER an das spezifische Asparagin geknüpfte Oligosaccharid in den *high-mannose-type*, *paucimannosidic-type*, *hybrid-type* oder *complex-type* prozessiert (siehe Abb. 1.3 für die Glykanstrukturen). Nach der Reifung des Oligosaccharids weisen die pflanzlichen N-Glykane typische Strukturen auf, die von den tierischen N-Glykanen abweichen.

Die N-Glykane sind kovalent an spezifische Asparaginreste gebunden. Dieses N-Glykosylierungsmotiv besteht aus dem Tripeptid Asparagin (N) - X - Serin (S)/Threonin (T), wobei X für jede beliebige Aminosäure steht außer für ein Prolin oder eine Asparaginsäure.

Allen N-Glykanen ist die Grundstruktur, die aus drei Mannosen und zwei N-Acetylglucosaminyresten (GlcNAc oder Gn) besteht, gemeinsam (die Abkürzung für die Grundstruktur ist M3Gn2; siehe Abb. 1.3) (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

Charakteristisch für komplexe Glykane in Pflanzen ist das Vorhandensein eines α -1,3-Fucoserestes, das an das proximale GlcNAc, und/oder eines β -1,2-Xyloserestes, das an die β -Mannose gebunden ist (Lerouge et al., 1998). Ebenso typisch für pflanzliche Glykane ist das Fehlen von Sialinsäure im Gegensatz zu N-Glykanen aus Säugetieren. Bei Invertebraten ist ein natürliches Vorkommen von Sialinsäure über Lektin-Bindeversuche beschrieben worden, jedoch ist der Einbau in eine N-Glykanstruktur noch nicht gezeigt worden (zusammengefasst in Wilson, 2002). Eine weitere Form der komplexen Glykane in Pflanzen trägt das LewisA-Epitop. An die terminalen GlcNAc sind jeweils ein α -1,4-Fucose- und β -1,3-Galactoserest gebunden.

	M3Gn2	Grundstruktur
	M5-9Gn2	<i>high-mannose-type</i>
	F ⁴ 2G2Gn2M3XFGn2	} <i>complex-type</i>
	F ⁴ 2G2Gn2M3XFGn2	
	M3XFGn2	<i>paucimannosidic-type</i>
	GnM5XFGn2	<i>hybrid-type</i>

Abb. 1.3: Strukturen der verschiedenen Formen von N-Glykanen in Pflanzen. Die Zuckerstruktur der Glykane mit den einzelnen Verknüpfungen ist links dargestellt, so wie die Formeln der Strukturen (mitte), wie sie in dieser Arbeit benutzt werden. M: Mannose, Gn: N-Acetylglucosamin, X: Xylose, F: Fucose (α -1,3-verknüpft), G: Galactose, F⁴: Fucose (α -1,4-verknüpft).

Auf der Grundstruktur M3Gn2 aufbauend werden vier Klassen von Glykanen in Pflanzen unterschieden. Ausgehend von der Grundstruktur kommt das *high-mannose*-Glykan bei einer

Vielzahl von extrazellulären und vakuolären Glykoproteinen vor. Diese Struktur besteht aus M5-9Gn2. Die Anzahl der Mannose-Reste variiert mit der Trimmung des Vorläufers Glc3M9Gn2, der im ER an den Asparaginrest geknüpft wird.

Die *paucimannosidic-type* N-Glykane haben an der Grundstruktur nur eine α -1,3-Fucose und/oder β -1,2-Xylose gebunden. Der *paucimannosidic-type* wird durch die Eliminierung der terminalen Zuckerreste (GlcNAc) aus komplexen Glykanen gebildet und ist das typische vakuoläre N-Glykan.

Die *hybrid-type*-N-Glykane stellen die vierte Klasse dar. Sie werden durch die einseitige Prozessierung des α -1,3-Mannosearms gebildet, das durch das Vorhandensein von α -1,3-Fucose und/oder β -1,2-Xylose zu der Struktur GnM5XF führt (zusammengefasst in Lerouge et al., 1998).

Während die Struktur und der Syntheseweg von *high-mannose*-Glykanen in Pflanzen, Invertebraten und Säugern identisch sind, resultieren aus der Prozessierung des *high-mannose*-Glykans im Golgi-Apparat verschiedene komplexe Glykane in den einzelnen Spezies. Die N-Glykane der Invertebraten sind denen der Pflanzen ähnlicher als zu denen der Säuger. Vor einigen Jahren wurde herausgefunden, dass Antikörper gegen pflanzliche Glykoproteine mit Glykoproteinen aus Invertebraten kreuzreagierten. Später zeigten Fabini et al. (2001), dass in *Drosophila melanogaster* zweifach-fucosylierte Glykane auftreten (α -1,6- und α -1,3-verknüpfte mit dem proximalen GlcNAc). In *Caenorhabditis elegans* sind eine Vielzahl verschiedener N-Glykane identifiziert worden. Eine Studie zeigte, dass das Profil an N-Glykanen während eines Entwicklungsstadiums einzigartig zu sein scheint (Cipollo et al., 2005). In erster Linie kommen in *C. elegans* *high-mannose*-Glykane in verschiedenen Verknüpfungen vor. Doch auch hier gibt es Glykane die eine α -1,6-Fucose am proximalen GlcNAc tragen (Cipollo et al., 2002).

In Säugern werden die N-Glykane mit der Grundstruktur M3GlcNAc2 im Golgi durch Anhängen von drei N-Acetylglucosamin-Molekülen modifiziert. Abschließend wird das Glykan mit einem α -1,6-Fucoserest (am proximalen GlcNAc) und drei Galactose- und Sialinsäureresten vervollständigt (Streuer, 1996). Es können aber auch neben dieser Form andere Abwandlungen vorkommen.

1.3.2 Glykosidasen und Glykosyltransferasen der N-Glykanprozessierung

Die N-Glykosylierung von Glykoproteinen beginnt im ER-Lumen. Das an Dolicholphosphat geknüpfte Oligosaccharid Glc3M9Gn2 wird im Cytosol erstellt und durch eine Flippase auf die ER-Lumenseite geholt (Helenius et al., 2002). Anschließend überträgt die

Oligosaccharyltransferase (OST) das Oligosaccharid über eine N-Verbindung auf einen Asparaginrest der naszierenden Proteinkette. In Hefezellen sind 9 Untereinheiten der OST identifiziert worden (Knauer and Lehle, 1999) und auch in Arabidopsis sind mehrere Untereinheiten der OST bekannt. Die Gene der STT3-Familie codieren für die STT3a und STT3b-Untereinheiten der OST. Die *stt3a*-Mutante, jedoch nicht die *stt3b*-Mutante reagiert sensitiv auf Salz. Daraus resultieren eine reduzierte Proteinglykosylierung und eine Überexpression des *binding proteins* (BiP). BiP wird bei der *unfolded protein response* (UPR) verstärkt exprimiert, um eine bessere Proteinfaltung zu gewährleisten. Dies weist darauf hin, dass osmotischer Stress den Zellzyklus von meristematischen Wurzelzellen der *stt3a*-Mutante, der mit einer korrekten Glykosylierung und Proteinfaltung verbunden ist, zerstört (Koiwa et al., 2003).

Dem von der OST übertragenem Oligosaccharid Glc3M9Gn2 werden im ER durch die Glucosidase I und II die drei Glucosereste abgespalten (Kaushal et al., 1990; Szumilo et al., 1986). Nach der Eliminierung dieser Glucosereste folgt eine vorübergehende Re-Glucosylierung durch eine ER-UDP-Glucosidase (Parodi et al., 1984; Trombetta et al., 1989). Es wurde gezeigt, dass diese Re-Glucosylierung bei ungefalteten Proteinen stattfindet und in die Qualitätskontrolle von Glykoproteinen im ER involviert ist (Hammond et al., 1994). In Säugetieren folgt nun die Abspaltung einer einzelnen Mannose durch eine ER-Mannosidase, das zu M8Gn2 führt. Obwohl eine solche ER-Mannosidase bisher in Pflanzen nicht identifiziert wurde, gibt es Hinweise auf deren Vorkommen in Pflanzen. So konnte in Spinat nachgewiesen werden, dass die Glykanstruktur des ER-residenten Proteins Calreticulin acht Mannosen beinhaltet (Navazio et al., 1996).

Die N-Glykane werden nun im Golgi-Apparat, während des Transports der Glykoproteine von der *cis*-, über die *mediale*- zur *trans*-Zisterne, weiter modifiziert. Während Glucosidasen Zuckerreste entfernen, übertragen Glykosyltransferasen Zuckerreste von einem aktivierten Zuckerdonor auf das Glykan. Ein Schema des Ablaufes der N-Glykosylierung im ER und Golgi-Apparat ist in Abb. 1.4 wiedergegeben.

Zunächst entfernt die α -1,2-Mannosidase I (MANI) ein bis drei α -1,2-Mannose-Reste und konvertiert M8Gn2 zu M5Gn2 (Sturm et al., 1987; Szumilo et al., 1986). Die Synthese von Glykanen des komplexen Typs startet mit der Addition eines ersten GlcNAc auf den α -1,3-Mannose-Arm des M5Gn2-Glykans (*high-mannose-type*). Dieser Schritt wird durch die N-Acetylglucosaminyltransferase I (GNTI) katalysiert und führt zu GnM5Gn2 (von Schaewen et al., 1993). Mutanten, die durch die Inaktivierung der GNTI unfähig sind komplexe Glykane zu bilden, werden auch *cgl1* (*complex glycan less*) genannt. In Mäusen ist das Fehlen der

GNTI-Aktivität letal und wird von verschiedenen morphologischen und entwicklungsspezifischen Abnormalitäten begleitet (Ioffe and Stanley, 1994; Metzler et al., 1994). In Pflanzen sind Glykane der komplexen Form und des *hybrid-types* für eine „normale“ Entwicklung nicht notwendig. Die Arabidopsis *cgl1*-Mutanten sind lebensfähig, fruchtbar und zeigen keinen ersichtlichen Phänotyp unter Standardwachstumsbedingungen (von Schaewen et al., 1993).

Im nächsten Schritt werden zwei weitere Mannose-Reste von GnM5Gn2 durch die α -Mannosidase II (MANII) entfernt (Kaushal et al., 1990; Strasser et al., 2006) und ein weiteres GlcNAc durch die N-Acetylglucosaminyltransferase II (GNTII) auf den α -1,6-Mannose-Zweig transferiert (Johnson et al., 1987; Tezuka et al., 1992, Strasser et al., 1999). Durch die anschließende α -1,3-Fucosylierung und β -1,2-Xylosylierung von Gn2M3Gn2 entstehen die für Pflanzen spezifischen N-Glykane. Die Fucosylierung und Xylosylierung kann auch schon nach der GNTI-Aktivität stattfinden, da die Struktur GnM5XFGn2 in Mannosidase II-Mutanten nachgewiesen werden konnte (Strasser et al., 2006). Für die Substratspezifität der α -1,3-Fucosyltransferase (FUCTa und FUCTb) und der β -1,2-Xylosyltransferase (XYLT) muss zumindest ein terminales GlcNAc vorhanden sein (Johnson et al., 1987; Staudacher et al., 1995; Tezuka et al., 1992; Zeng et al., 1997). Nach dem Transfer von Xylose und Fucose auf den *core*-Komplex können die komplexen N-Glykane durch Addition des LewisA-Epitopes weiter prozessiert werden, und damit eine oder zwei Antennen bestehend aus Gal- β -1,3(Fuc- α -1,4)-GlcNAc aufweisen (Fichette-Lainé et al., 1997; Melo et al., 1997). Die Addition von Fucose- und Galactoseresten werden durch eine β -1,3-Galactosyltransferase (GALT) und einer α -1,4-Fucosyltransferase (FUCTc) auf die terminalen GlcNAc generiert. Eine Studie zur Substratspezifität von FUCTc zeigte, dass dieses Enzym Fucose von GDP-Fucose auf Gal- β -1,3-GlcNAc überträgt (Crawley et al., 1989; Fichette-Lainé et al., 1997; Melo et al., 1997). Es gibt also eine strikte Reihenfolge bei der Verknüpfung der Zuckerreste für das LewisA-Epitop. Eine weitere Modifizierung von komplexen N-Glykanen kann während des Transports der Glykoproteine zu ihrem Zielort oder am Zielort stattfinden.

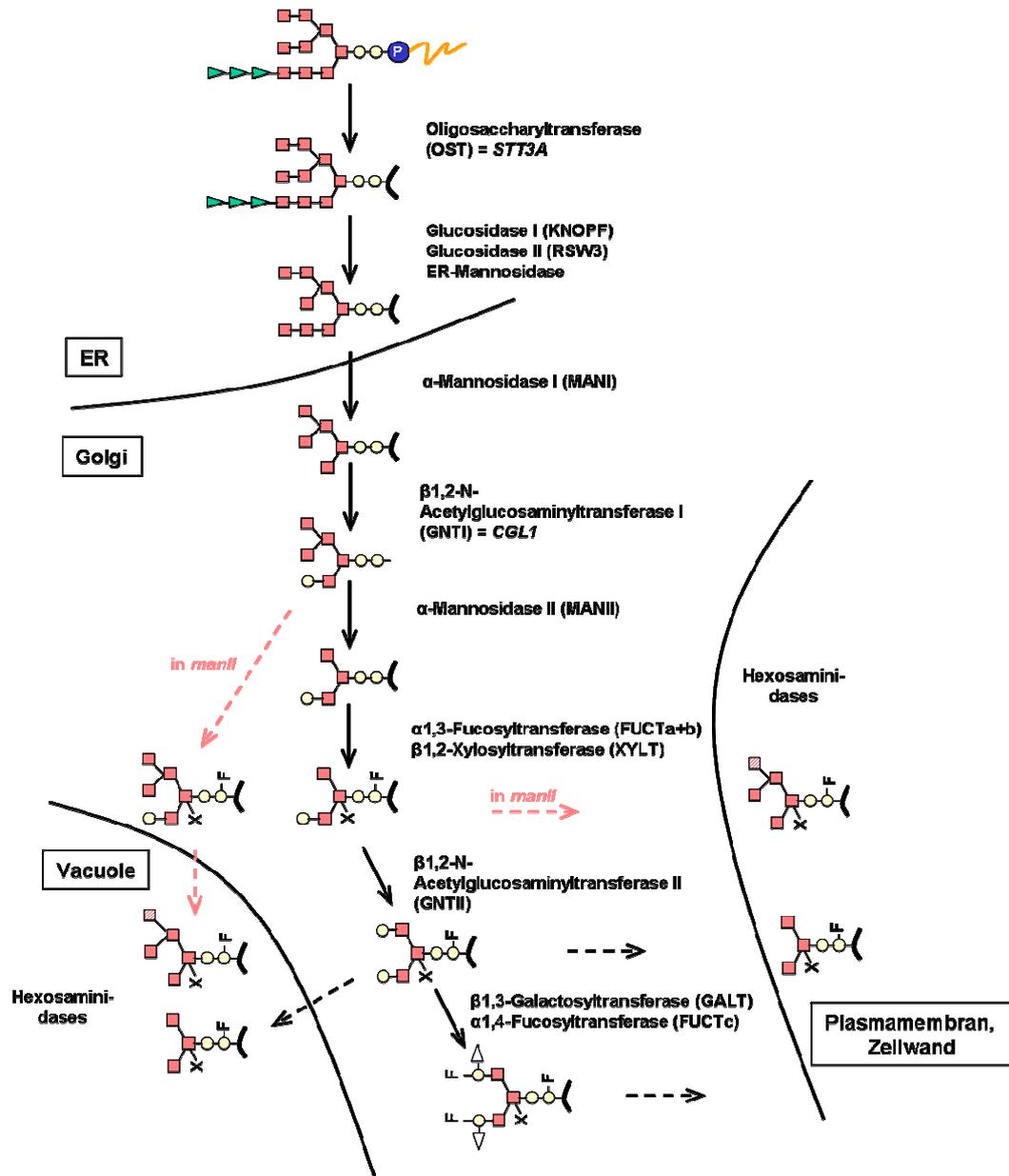


Abb. 1.4: N-Glykosylierung im Sekretorischen System von Höheren Pflanzen. N-Glykane werden im ER-Lumen *en bloc* von der Oligosaccharyltransferase auf co-translational wachsende Proteinketten transferiert und im Golgi-Apparat weiter modifiziert.

Glykoproteine, die in die Vakuole gelangen, werden durch vakuoläre Hexosaminidasen von den endständigen GlcNAc getrennt und es entsteht das *paucimannosidic-type*-Glykan (M3XFGn2) (Vitale and Chrispeels, 1984). In neueren Arbeiten sind weitere Hexosaminidasen identifiziert worden, die in der Plasmamembran inserieren und bei der Trimmung der N-Glykane von Plasmamembranproteinen oder sekretierten Glykoproteinen beteiligt sein könnten. Sie könnten ebenfalls zusätzliche Funktionen bei der Pflanzenabwehr übernehmen (Strasser et al., 2007a).

1.4 Fragestellung

Die Zellwand in Pflanzen übernimmt vielfältige Aufgaben und Funktionen für die Zelle. Die Cellulose, der Hauptbestandteil der Zellwand wird von der Cellulosesynthase synthetisiert. Über die Regulation und den genauen Ablauf der Cellulosesynthese ist nicht viel bekannt. Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Systems sollten unbekannte Protein-Protein-Interaktionen der Cellulosesynthase A1 gefunden werden. Mögliche Interaktionen sollten anschließend mit einem fluoreszenzmarkiertem Cellulosesynthase-Protein *in planta* bestätigt werden.

Durch die Entdeckung, dass eine Mutation in einem Gen, welches an der N-Glykanmodifikation beteiligt ist, bei Salzstress einen Wurzelphänotyp auslöst, der dem Phänotyp einer Mutante der Cellulosesynthase A1 ähnelt, wurde das Augenmerk auf dieses Glykosylierungsenzym gelenkt. Hier schien sich eine Verknüpfung der Zellwandsynthese mit der N-Glykosylierung von Proteinen abzuzeichnen. Bei diesem Enzym des Glykosylierungsweges handelt es sich um die GNTI, das Schlüsselenzym bei der Bildung komplexer Glykane.

Dass Fehlen der N-Glykane bei einzelnen Proteinen hat negative Auswirkung auf die Enzymaktivität, auf Protein-Protein-Interaktionen, auf die Stabilität sowie auf die Faltung (Koiwa et al., 2003). Wird die Glykosylierung komplett unterbunden, hat es sogar letale Auswirkungen (Doppelmutante *stt3a-1 stt3b-1* ist schon im Gametophytenstadium letal, Koiwa et al., 2003). Jedoch ist über die Auswirkung einer abweichenden Modifikation der N-Glykane im Golgi-Apparat und im TGN noch wenig bekannt. Durch die Einbeziehung verschiedener Glykosylierungsmutanten aus *Arabidopsis thaliana* sollte die Auswirkung der Glykosylierung auf die Zellwandsynthese analysiert werden und Unterschiede in den Glykanstrukturen der Glykosylierungsmutanten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Chemikalien und deren Hersteller.

Hersteller	Chemikalien und Enzyme
AppliChem, Darmstadt	Hefeextrakt, Agar, 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Polyvinylpolypyrrolidin (PVPP), 2-Propanol, Kaliumacetat, Milchpulver, X-Gal, Na-3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS), Diethylpyrocarbonat (DEPC), Kaliumhydroxid, Guanidinium-HCl, Na-Borat, 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)
biomol, Hamburg	Glycin, 3-[4-Morpholino]-propansulfonsäure (MOPS), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), 2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES)
Biozym, Hess. Oldendorf	NuSieve 3:1 Agarose
Boehringer, Ingelheim	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid (PefablocSC)
Duchefa, Haarlem, Niederlande	Gamborg B5-Medium, MS-Medium
Fermentas, St. Leon-Roth	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Restriktionsenzyme, RNase, dATP, dNTP, DNase, Reverse Transcriptase
Finnzymes, Espoo, Finnland	Phusion-Polymerase
GE Healthcare, Braunschweig	<i>ECLTM Western Blotting Detection Reagent</i>
Genecraft, Lüdinghausen	BioTherm-Taq-Polymerase
Invitrogen, Karlsruhe	Agarose, SuperSkriptIII Reverse Transcriptase, Agar
Merck, Darmstadt	Kaliumphosphat, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Lithiumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumpyrosulfit, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Tetracyclin, Ethanol, Chloramphenicol, Magnesiumsulfat, Phosphorsäure, Natriumacetat, Essigsäure, Hydroxylamin, Trichloressigsäure, Acrylamid, Thiamin, Ethidiumbromid, Ammoniumpersulfat (APS), Mannitol, Wasserstoffperoxid, Ethanol, Kaliumchlorid, Triethylamin, Polyethylenglycol 6000 und 3350, Magnesiumphosphat, Dioxan, Calciumnitrat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Mangan-II-chlorid, Magnesiumsulfat
Omnilab, Bremen	Ampicillin, Kanamycin
QBiogene, Heidelberg	Dropout-Medium, SD-Basis
Riedel de Haën, Seelze	Aceton, Methanol
Roche, Mannheim	PNGaseF
Roth, Karlsruhe	Phenol/Chloroform/IAA, Agarose, Glycerin, Trypton, Saccharose, Pepton
Serva, Heidelberg	Coomassie-Brilliant-Blue G250, NNNN-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), Bromphenolblau, Proteinase K, Natriumdodecylsulfat (SDS), PonceauS, Triton X100, Cellulase (Onozuka R-10), Macerolyse (Onozuka R-10),
Sigma-Aldrich, Hamburg	Polyoxyethylene-sorbitan-Monolautate (Tween-20), 4-Chloro-1-naphthol, β -Mercaptoethanol, NNNN-tetramethyl-succinimido-uronium-tetrafluorborat (TSTU), Lacto-N-fucopentaoseII, Lachssamen-DNA, Proteinaseinhibitorcocktail, α -Mannosidase, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronide (X-GlcA) Hormone: 6-Benzylaminopurin (BAP), α -Naphtalenessigsäure (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4D)

2.2 Pflanzenmaterial

Die Versuche und Analysen in der hier vorliegenden Arbeit wurden mit Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.)) der Ökotypen Columbia (Col) und Wassilewskija (Ws) durchgeführt. Für die Protoplasten-Isolierung stand außerdem Blattgewebe von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) in Gewebekultur der Varietät Xanthi zur Verfügung.

2.2.1 Pflanzenanzucht von *Arabidopsis thaliana*

Für die Anzucht von Arabidopsispflanzen aus Samen wurde das Saatgut oberflächensterilisiert, indem die Samen für eine Minute in 70 %igem Ethanol und anschließend für 10 Minuten in 12 %igem Natriumhypochlorit geschüttelt wurden. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen auf festem Ara-MS-Agarmedium (Murashige & Skoog, 1962) ausgesät. Zur Synchronisation der Samenkeimung wurden die Platten für 48 Stunden dunkel und bei 4°C gehalten und anschließend in eine der folgenden Standardlichtbedingungen überführt:

Langtag: 16 Stunden Licht bei 20°C / 8 Stunden Dunkelheit bei 18°C

Kurztag: 8 Stunden Licht bei 20°C / 16 Stunden Dunkelheit bei 18°C

Ara-MS-Agarmedium: 0,22% MS-Salze, pH 5,7 (KOH)
 1% Saccharose
 0,8% Agar

Für die Anzucht auf Erde wurden die Samen auf einer Mischung aus 8 Teilen Erde und 2 Teilen Vermiculite ausgelegt und nach 48 Stunden Dunkelheit und 4°C ins Licht bei 20°C überführt.

2.2.2 Verwendete und identifizierte Arabidopsislinien

Für die Untersuchungen und Analysen in dieser Arbeit wurde auf Mutantenlinien von *Arabidopsis thaliana* zurückgegriffen. Dabei handelte es sich um T-DNA-Insertionslinien (SALK- und FLAG-Linien) und EMS-Mutanten. In Tabelle 2.2 sind diese Mutanten aufgeführt zusammen mit der Identifikationsnummer der Mutantenlinien und der Genidentifikationsnummer (At-Nummer).

Tab. 2.2: Aufgelistet sind die verwendeten Arabidopsismutanten. SALK- und FLAG-Linien sind T-DNA-Insertionsmutanten, die anderen sind EMS-Mutanten. Mehrfachmutanten wurden durch Kreuzung der einzelnen Mutanten erzeugt.

Name	Mutante	Liniennummer	At-Nummer
Oligosaccharyltransferase Untereinheit stt3a-2 (STT3a)	<i>stt3a-2</i>	SALK_058814	At5g19690
Oligosaccharyltransferase Untereinheit stt3b-1 (STT3b)	<i>stt3b-1</i>	SALK_033391	At1g34130
α -Mannosidase Ia-2 (MANIa-2)	<i>manIa-2</i>	SALK_149737	At1g51590
α -Mannosidase Ib-1 (MANIb-1)	<i>manIb-1</i>	SALK_023251	At3g21160
α -Mannosidase I (MANI)	<i>manI</i>	Kreuzung aus SALK_149737 SALK_023251	Kreuzung aus At1g51590 At3g21160
N-Acetylglucosaminyltransferase I (GNTI, CGL1-T)	<i>cgl1-T</i>	SALK_073650	At4g38240
N-Acetylglucosaminyltransferase I (GNTI, C5)	C5	Punktmutation	At4g38240
N-Acetylglucosaminyltransferase I (GNTI, C6)	C6	Punktmutation	At4g38240
α -Mannosidase II (MANII)	<i>manII</i>	SALK_141821	At5g14950
N-Acetylglucosaminyltransferase II (GNTII)	<i>gnTII</i>	FLAG_394A11	At2g05320
Fucosyltransferase A (FUCTa)	<i>fucTa</i>	SALK_087481	At3g19280
Fucosyltransferase B (FUCTb)	<i>fucTb</i>	SALK_067444	At1g71990
Xylosyltransferase (XYLT)	<i>xylT</i>	SALK_042226	At5g55500
Fucosyltransferase C (FUCTc)	<i>fucTc</i>	FLAG_201C09	At1g71990
Cellulosesynthase A1 (CESA1)	<i>rsw1-1</i>	Punktmutation CS6554	At4g32410
Korrigan 1 (KORRIGAN1, KOR1)	<i>rsw2-1</i>	Punktmutation CS6555	At5g49720

2.2.3 Kreuzen von Arabidopsispflanzen

Gerade aufblühenden Blüten wurden unter dem Binokular (Olympus SZ61) die Antheren mit einer Pinzette entfernt und der freigelegte Stempel mit fremdem Blütenstaub bestäubt. Unbehandelte Blüten wurden entfernt und die bestäubten Blüten konnten abreifen. Die Samen wurden anschließend steril auf Agarplatten ausgesät und zur weiteren Analyse verwendet.

2.2.4 Phänotypuntersuchung von Arabidopsiswurzeln

Zur Charakterisierung der Arabidopsismutanten wurden die Wurzeln auf ihren Wuchs und die Wurzellänge untersucht. Dafür wurden vorgekeimte Arabidopsiskeimlinge von gleicher Größe auf Ara-MS-Hartagarplatten in einer Reihe nebeneinander gesetzt und die Platten unter Kurztagbedingungen horizontal aufgestellt. Nach fünf Tagen wurden Aufnahmen mit einer Digitalkamera (Nikon D100, AF NIKKOR Objektiv) gemacht und die Wurzellängen gemessen.

Ara-MS-Hartagarplatten: 0,44% MS-Salze, pH 5,7 (KOH)
3% Saccharose
1,5% Agar

2.2.5 Pflanzenanzucht von Tabakstecklingen

Für die Protoplasten-Isolierung wurden sterile Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Varietät Xanthi) herangezogen. Die Tabakpflanzen wurden über Kopfstecklinge in Magentabboxen auf Tabak-MS-Medium in Langtagbedingungen vermehrt.

Tabak-MS-Medium: 0,44% MS-Salze, pH 5,7 (KOH)
2% Saccharose
0,8% Agar

2.2.6 Protoplasten-Isolierung

Die obersten 3 Blätter von 3-4 Wochen alten Gewebekulturtabakpflanzen oder die Blätter steril angezogener Arabidopsispflanzen wurden unter sterilen Bedingungen geerntet, in eine Petrischale mit 5 ml Osmotikum überführt und die Blattspreite in ca. 1 mm breite Streifen geschnitten. Die geschnittenen Blattspreiten wurden dann zur Plasmolyse für 30-60 min in

20 ml Osmotikum gelegt. Nach Absaugen des Osmotikums und Zugabe von 12 ml Enzymlösung wurde die Petrischale mit Parafilm verschlossen und dunkel bei 22-25°C für 14-16 Stunden inkubiert. Um Scherkräfte zu minimieren wurden alle folgenden Pipettierschritte der Protoplastensuspension mit 10 ml Weithalspipetten, bzw. abgeschnittenen blauen Pipettenspitzen durchgeführt. Die Protoplastensuspension wurde durch eine Netzkombination mit 125 µm auf 63 µm Maschenweite filtriert und sowohl die Petrischale als auch die Netzkombination mit insgesamt 8 ml 0,2 M CaCl₂ gespült. Die Protoplastensuspension wurde anschließend in Schraubkappenröhrchen überführt und bei 60 xg für 5 min bei 15°C zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 6 ml Osmotikum und 3 ml 0,2 M CaCl₂. Die Protoplasten wurde in 10 ml W5-Medium (künstliches Seewasser) aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer die Protoplastenanzahl bestimmt. Nach 1 Stunde Inkubation auf Eis wurden die Protoplasten pelletiert und die Zellzahl auf 500.000/300 µl mit eiskalter MaMg-Lösung eingestellt. Für die nachfolgende Transformation wurde 20-35 µg Plasmid-DNA mittig in kleine Petrischalen (5 cm im Durchmesser) pipettiert, durch Auf- und Abpipettieren mit 300 µl Protoplastensuspension vermischt, mit 500 µl PEG-Lösung aus einer Höhe von ca. 5 cm betropft und 30 min inkubiert. Es folgte eine schrittweise Verdünnung der Protoplastensuspension mit zunächst 0,5 ml, 1 ml und 2 ml W5-Medium. Die gesamte Suspension wurde in Schraubkappenröhrchen überführt und die Petrischale mit 3 ml W5-Medium gespült. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 3 ml B5-Medium mit frisch zugesetzten Hormonen resuspendiert, in frische kleine Petrischalen überführt, mit Parafilm verschlossen und für mindestens 7 Stunden im Dunkeln bei 22-25°C inkubiert. Die Genexpression wurde zu verschiedenen Zeiten am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und analysiert.

Enzymlösung: 0,5 M Mannitol (0,45 M für Arabidopsis)
10 mM CaCl₂
1 % Cellulase
0,25 % Macerozyme
steril filtriert und bei -20°C gelagert

Osmotikum: 0,5 M Mannitol (0,45 M für Arabidopsis)

CaCl₂-Lösung: 0,2 M CaCl₂

MaMg-Lösung: 0,5 M Mannitol (0,45 M für Arabidopsis)
15 mM MgCl₂
0,1% MES
pH 5,7 (KOH), steril filtriert

W5 Medium: 145 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
5 mM Glucose
pH 5-6

Gamborg B5-Medium: 3,17 g/l Gamborg B5
0,5 M Glucose
pH 5,7 (KOH), steril filtriert und bei -20°C gelagert

vor Verwendung Hormone zugeben:

	Tabak	Arabidopsis
2,4-D (1 mg/ml H ₂ O)	0,1 mg/l	1 mg/l
BAP (1 mg/ml EtOH)	0,2 mg/l	0,15 mg/l
NAA (1 mg/ml DMSO)	1 mg/l	-

PEG-Lösung: 0,4 M Mannitol
0,1 M Ca(NO₃)₂
0,1% MES
pH 8 (KOH) 7-9 einstellen und auf 100 ml auffüllen
40 g PEG 6000 einrühren
steril filtriert und bei -20°C gelagert

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Bakterienstämme und Plasmide

Der folgenden Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme zu entnehmen.

Tab. 2.3: Liste der verwendeten Stämme von *Escherichia coli* (*E. coli*).

<i>E. coli</i> -Stamm	Genetische Charakteristika	Vertreiber	Referenz
XL1blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
DH5α	F ⁻ φ80d <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe	

Als Vektoren wurden verschiedene Plasmide eingesetzt, die für die jeweilige Anwendung unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Alle verwendeten Vektoren und ihre charakteristischen Eigenschaften sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Die Vektorkarten der XFP-Vektoren sind im Anhang aufgeführt (Kapitel 8.4).

Tab. 2.4: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Herkunft
pBluescript SK (-) (pBSK)	Klonierungsvektor mit blau/weiß-Selektion, Amp ^R , <i>lacZ</i> , ca. 3 kb	Stratagene, Heidelberg
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor mit blau/weiß-Selektion, T-Überhang, Amp ^R , <i>lacZ</i> , ca. 3 kb	Promega, Mannheim
pJET1/blunt	Klonierungsvektor für <i>blunt-end</i> Fragmente, Amp ^R , <i>eco47IR</i> (<i>lethal gene</i>), ca. 3,1 kb	Qiagen, Hilden
pGBKT7	Hefe-Proteinexpressionsvektor, c-Myc, TRP1, Gal4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, Kan ^R , ca. 7,3 kb	Clontech, Heidelberg

pGFP2ΔNcoI	GFP-Expressionsvektor, GFP2-Sequenz, Amp ^R , ca. 4,5 kb	AG von Schaewen (T. Meyer)
pYFP2ΔBamHI	YFP-Expressionsvektor, EYFP-Sequenz im pGFP2 Rückgrat, Amp ^R , ca. 4,5 kb	AG von Schaewen (T. Meyer)
pOFPΔNcoI (ursprüngliche Bezeichnung: pSY526)	OFP-Expressionsvektor, mRFP-Sequenz, Amp ^R , ca. 4,7 kb	Shaul Yalovsky (University Tel Aviv) modifiziert durch T. Meyer (AG von Schaewen)
pOFP2ΔΔNcoI	OFP-Expressionsvektor, mRFP-Sequenz im pGFP2 Rückgrat, Amp ^R , ca. 4,5 kb	diese Arbeit

2.3.2 Bakterienkulturen

Die für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen verwendeten Bakterienstämme wurden auf verschiedene Art und Weise kultiviert. Übernachtkulturen dienten zur Plasmidisolierung aus Bakterien sowie als Vorkultur für die Herstellung größerer Mengen von Flüssigkulturen. Zum Vereinzeln von Bakterienkulturen sowie zur Vermehrung aus Glycerinkulturen wurden Bakterien auf Agarplatten kultiviert. Glycerinkulturen dienten der Lagerung.

Übernachtkultur:

In einem Reagenzglas wurden 3-5 ml YT-Flüssigmedium mit dem gewünschten Bakterienstamm inokuliert. Die Bakterien konnten von einer Einzelkolonie auf einer Plattenkultur oder aber aus einer Glycerinkultur stammen und wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers übertragen. Bei 37°C erfolgte die Anzucht unter aeroben Bedingungen (Schüttler/Roller) für 16-18 h.

Plattenkultur:

Die Zellen wurden hierfür mit einer Impföse oder einem Drygalski-Spatel auf einer Platte mit YT-Festmedium ausgestrichen. Dabei variierte die Menge der ausplattierten Bakteriensuspension zwischen 10 und 200 µl. Wenn die vorhandene Flüssigkeit vollständig in die Platte eingezogen war, wurden die Agarplatten mit der Unterseite nach oben, um Kondenswasserablagerung auf dem Medium zu vermeiden, bei 37°C im Brutschrank 16-18 h inkubiert.

Glycerinkultur:

Flüssige Bakterienkulturen können mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 20 %) bei -70°C eingefroren und über mehrere Monate gelagert werden.

Alle Medien wurden vor der Verwendung steril autoklaviert (20 min, 121°C , 1 bar) und, wenn möglich, mit einem Selektionsmarker in Form eines Antibiotikums versetzt. Mit Hilfe der Selektionsmarker ist es möglich, Kontaminationen zu verhindern und auf die Anwesenheit eines Plasmids in den *E. coli*-Stämmen zu selektionieren.

YT-Medium: 8 g/l Tryptone, pH 7,0
 5 g/l Hefeextrakt
 2,5 g/l NaCl
 (15 g/l Agar für Festmedium)

2.3.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zellen, die in der Lage sind, DNA aufzunehmen, werden als kompetent bezeichnet. Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml ϕB -Medium mit 1 ml einer Übernacht-Kultur beimpft und bei 37°C aerob bis zu einer OD_{600} von 0,35 angezogen. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (2700 $\times\text{g}$, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 40 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 8 ml FSB-Puffer aufgenommen und mit 280 μl DMSO versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wird die gleiche Menge DMSO zugefügt und anschließend in 200 μl Aliquots aufgeteilt und bei -70°C eingefroren.

ϕB -Medium: 0,5% Hefeextrakt
 2% Trypton
 0,4% MgSO_4
 10 mM KCl

FSB-Puffer: 10 mM K-Acetat, pH 6,4
 100 mM KCl
 45 mM MnCl_2
 10 mM CaCl_2
 3 mM Hexamincobaltchlorid
 10% Glycerin

2.3.4 Transformation von *E. coli*-Zellen

Bei der Transformation wird freie, ringförmige DNA von einer Zelle aufgenommen.

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz oder anderer ringförmiger DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1-1,5 min, an den sich eine Inkubation von 1-2 min auf Eis anschloss. Zu den Zellen wurden dann 800 µl nicht selektives Flüssigmedium gegeben; die Zellen wurden zur Regeneration für 1 h bei 37°C aerob angezogen. Anschließend wurden Aliquots auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.3.5 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion hilft bei Klonierungen in Vektoren mit dem *lacZα*-Gen positive Transformanten zu identifizieren. Die *lacZ*-Untereinheit ist auf dem *E. coli*-Chromosom im Stamm XL1blue deletiert. Innerhalb der *lacZα*-Untereinheit befindet sich die Klonierungsstelle des Vektors. Erfolgt die Insertion eines DNA-Fragments in die Klonierungsstelle, kann keine Komplementation stattfinden und die *E. coli*-Zellen sind dadurch nicht in der Lage, das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) in Galactose und einen blauen Farbstoff zu spalten. Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) wird als molekularer Induktor des *lac*-Operons eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems können positive Transformanten anhand ihrer weißen Koloniefarbe identifiziert werden. Um diese Selektion durchführen zu können, wurden die Agarplatten ca. 1 h vor dem Ausplattieren mit 80 µl X-Gal (200 mg/ml) und 8 µl 20%igem IPTG vorbehandelt.

2.3.6 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) genutzt. Dazu wurden 1,5 ml Übernachtskultur für 2 min bei 5000 xg pelletiert und in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen und die Denaturierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 200 µl Puffer P2. Nach vorsichtigem Mischen durch 6-8-faches Invertieren wurde die Zellsuspension durch Zugabe von 200 µl Lösung P3 neutralisiert. Es folgte wiederum ein 6-8-faches Invertieren und eine Inkubation für 10 min auf Eis. Durch die Zugabe von Kaliumacetat fallen Proteine und chromosomale DNA als Salz-Detergenz-Komplexe aus, welche durch die nachfolgende Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 20000 xg abzentrifugiert wurden. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde durch

Zugabe von 450 µl Isopropanol gefällt und für 10 min bei 4°C und 20000 xg abzentrifugiert und, um Salze zu entfernen, nachfolgend mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde die pelletierte Plasmid-DNA unter der Sterilbank getrocknet und in 50 µl H₂O oder in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

Puffer P1: 50 mM Tris, pH 8
10 mM EDTA
0,1 mg/ml RNase

Puffer P2: 0,2 M NaOH
1% SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 (Essigsäure)

Zur Isolierung von besonders reiner Plasmid-DNA für Sequenzierungen oder Ligationen wurde das Plasmid Miniprep Kit der Firma peqLab verwendet. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoBond[®] Xtra Kits von Macherey & Nagel (Düren) gewonnen.

2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Zur Analyse von DNA auf genomischer Ebene (z. B. T-DNA-Insertionsanalyse) wurden aus dem Pflanzenmaterial mit einer Glaspasteurpipette zwei Blattscheiben ausgestanzt, in ein Reaktionsgefäß gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zum Auftauen mit 100 µl Extraktionspuffer überschichtet. Bei 65°C wird die Zellstruktur unter 10 minütigem alternierendem Schütteln (1 min 1400 rpm - 1 min Pause, Eppendorf Thermomixer) aufgebrochen. Dieser Aufschluss wird nach kurzem Abzentrifugieren noch zweimal wiederholt. Der Überstand enthält die genomische DNA und kann bei 4°C gelagert werden.

Extraktionspuffer: 10 mM Tris, pH 8
1 mM EDTA
50 µg/ml Proteinase K
0,5% Tween-20

2.4.2 Gesamt RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Nach der Methode von Logeman *et al.* (1987) wurde Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial gewonnen. Dazu wurde das Gewebe unter flüssigem Stickstoff gemörsert und ca. 1 g des Pulvers mit 5 ml Extraktionspuffer Z6 versetzt und 5 min kräftig auf dem Vortexer gemischt.

<u>Extraktionspuffer Z6:</u>	8 M Guanidium-HCl, pH 7,5
(DEPC-behandelt)	20 mM 2-(N-morpholino) ethansulfonat (MES)
	20 mM EDTA
	50 mM β -Mercaptoethanol, frisch zusetzen

Das Homogenat wurde zur Abtrennung von Zelltrümmern für 20 min bei 4000 xg in einer gekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert. Es folgte eine zweifache Phenol/Chloroform-Extraktion zur Trennung von lipophilen und amphipatischen Komponenten aus wässrigen Nukleinsäure-Lösungen. Dazu wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gut gemischt und zur Phasentrennung 10 min bei 4000 xg zentrifugiert. Die wässrige Oberphase enthält die Nukleinsäuren und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und wieder zur Phasentrennung zentrifugiert. Der Überstand wurde mit vorgekühlten 0,2 Vol. 1 M Essigsäure und 0,7 Vol. Ethanol versetzt, auf dem Vortexer gemischt und mindestens 30 min bei -20°C gelagert. Die selektiv ausgefällten Ribonukleinsäuren wurden 20 min durch Zentrifugation sedimentiert. Die Pellets wurden bei Raumtemperatur je zweimal mit 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und einmal mit 80%igem Ethanol gewaschen und abermals zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag für ca. 15 min bei Raumtemperatur unter einem Abzug getrocknet und in 100 μ l H₂O aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden durch erneutes Zentrifugieren abgetrennt. Die gelöste RNA wurde über Nacht mit 2 M LiCl (Endkonzentration) bei 4°C inkubiert, um selektiv RNA zu fällen. Nach Zentrifugation, Waschen mit 80 %igem Ethanol und Lufttrocknen des Pellets wurde die RNA in 50 - 100 μ l DEPC-Wasser gelöst.

2.4.3 Synthese von komplementärer DNA

Bei dieser Methode wird mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das dafür notwendige Enzym, die Reverse Transkriptase, wurde von den Firmen Invitrogen für Klonierungen (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Karlsruhe) und MBI Fermentas für

RT-PCR-Analysen (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, St. Leon-Rot) bezogen. Oligo-dT-Primer (PFL007, PFL008 und PFL009, siehe Tabelle 2.5) können an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Mit Hilfe des Enzyms entsteht ein erster Strang cDNA („*first-strand cDNA*“). Die Durchführungen erfolgten nach Herstellerangaben. Für die RT-PCR-Analyse der *cgII*-Mutationen wurde die RNA vorab mit DNase I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt, um eine Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA zu vermeiden.

2.4.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Amplifikation für die RT-PCR-Analyse der *cgII*-Mutationen wurde mit verschiedenen Primerkombinationen (10 µM pro Primer), 0,1 µl cDNA, 1 mM dNTP-Mix und BioTherm™ Taq-DNA Polymerase (Genecraft, Lüdinghausen) nach Herstellerangaben in einem TRIO-Thermoblock TB 1 (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Für die T-DNA-Insertionsmutantenanalyse und Amplifikationen für Klonierungen wurden die Reaktionen mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) nach Herstellerangaben angesetzt.

Tab. 2.5: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

A) Primer für die Analyse der *cgII*-Mutanten. B) Primer für die Untersuchung von T-DNA-Insertionen. C) Klonierungsprimer – die unterstrichenen Basen geben die Schnittstelle an. D) Einzelprimer, die im gleichen Verhältnis gemischt, den Oligo-dT-Primer für die RT-PCR ergibt. E) Primer für die cDNA-Bank-Analyse des Hefe-2-Hybrid-Screens.

	Name	Schnitt- stelle	Sequenz	
A	5'_F		GATCCACCGGTTTTGATCTGG	
	Ex3_R		ATGCTAACTTCATCTATGAGGCCTCGC	
	Ex6_F		CGTGCAGACTATCTTG	
	Ex12_R		CCATTATCATTCCATGATGAAGC	
	In14_F		GCATATGACTTCTGCTTTCTG	
	Ex18_R		GGAATTTCGAATTCCAAGC	
	3'_R		GCTGGTTGGAGAAGTACATGTTTTGC	
	Ex12/13_F		ATGATCCCT-ATGCGCTAT	
	Ex14/15_F		AGGTGAACAT-GGGTCTAGT	
	Ex16/17_R		TATAGTTTCC-CTCTGTCAGG	
	Ex17/18_R		CACACCATC-CTCCATTC	
	B	stt3a_F2		ATTGCAAGTGTCAGTGAACATCAAC

	stt3a_R2		CCTTGTCAGTCTTACCAGCAGAA
	gnTII_RP		AAATGTCGGTCCCTATCATCG
	gnTII_LP		TATGTGCATAATCGGCTCAG
	fucTc-LP		CACCCATTCCATACTGTTCTTC
	fucTc-RP		TGGTTATGACTTGATTTTTGTCC
	LBa1		TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
	LBb1		GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
	RBa1		GCTGATAGTGACCTTAGGCGAC
	FLAG-TAG		CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
	CESA1_F	EcoRI	NGAATTCCATGGAGGCCAGTGCCG
	CESA1_R	PstI	NNCTGCAGAGAAGATGGGATAGGCACCCACAC
C	AtCesA_H2G6_F	XhoI	ATACTCGAGATGGAGGCCAGTGCCG
	AtCesAloop_F	NdeI	GGAATTCCATATGCAGTTTCCCAAATGGTACCCC
	AtCesAloop_R	BamHI	CGGGATCCGGTGTGATATAAGCGATCCTCTCC
	AtCesA_F	SpeI	NNACTAGTCATGGAGGCCAGTGCCG
	AtCesA_short_R	XhoI	NNNCTCGAGGGGAGGCTCTTTCAATG
	AtCesA_full_R	XhoI	CTCGAGAAAGACACCTCCTTTGCGATTGAAG
	GnTI_laterne_F	XhoI	NNNCTCGAGATGAGAGGGAACAAGTTTTGC
	GnTI_laterne_R	NcoI	NNNCCATGGTGAGAGAGCTACTACTCTTCCTTGCTG
	AtCesA_full_C/Y_F	Sall	NNNGTCGACATGGAGGCCAGTGCC
	AtCesA_full_C/Y_R	XhoI	NNNCTCGAGCTAAAAGACACCTCCTTTGCC
	Kinesin_F	SpeI/ XhoI	NNNACTAGTCTCGAGATGCCAGCAATGCCAGGTC
	Kinesin_R	BamHI/ NcoI	NNNGGATCCCCATGGCGAACTTGAAACCGAGGCTG G
	Korrigan_full_F	XbaI	NNNTCTAGAATGTACGGAAGAGATCCATGG
	Korrigan_full_R	XhoI	NNNCTCGAGAGGTTTCCATGGTGCTGG
D	PFL007		OligoT ₍₃₅₎ -A
	PFL008		OligoT ₍₃₅₎ -C
	PFL009		OligoT ₍₃₅₎ -G
E	pACT_F		GCCTCCTCTAACGTTTCATGAT
	pACT_R		TTGAGATGGTGCACGATGCAC

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen dient die Agarose-Gelelektrophorese (SAMBROOK et al., 1989). Die gewählte Agarose-Konzentration richtete sich hierbei nach der Größe der aufzutrennenden Nukleotidfragmente. Die Agarose wurde durch kurzes Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf etwa 50°C wurden pro 100 ml Gel 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt und zum Erstarren in ein horizontales Gelbett (BIOzym, Modell ComPhor L Midi) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas) und auf das erstarrte Gel geladen. Als Größenstandard wurde *Pst*I-geschnittene Lambda-DNA oder die 100 bp-Ladder verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-100 Volt in 1x TAE-Laufpuffer.

50x TAE: 242 g/l Tris
 100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0)
 57,1 ml Eisessig

2.4.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zum Umpuffern oder zur Reinigung von DNA wurde die SureClean-Lösung (Bioline, Luckenwalde) oder das Cycle-Pure Kit (peqLab, Erlangen) verwendet oder eine DNA-Fällung durchgeführt. Bei Letzterer wird durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumina 100%igem Ethanol die DNA gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 20000 ×g, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation an der Luft getrocknet. Anschließend konnte es im gewünschten Volumen H₂O_{bidest} oder Puffer gelöst werden.

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten nach der Größentrennung durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden das Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraction Kit (peqLab, Erlangen) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.4.7 DNA-Restriktion

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) geschnitten werden. Gemeinsame Eigenschaft der Restriktionsenzyme

ist die Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz und das Schneiden der DNA. Hierbei können so genannte „klebrige“ Enden (*sticky ends*) oder „glatte“ Enden (*blunt ends*) durch das Enzym erzeugt werden. Durch die DNA-Restriktion wurden DNA-Fragmente und Vektoren für eine Ligation vorbereitet und Klonierungen analysiert. Das Schneiden linearer oder ringförmiger DNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers des Restriktionsenzymes (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt.

2.4.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um bei einer Ligation die Re-Ligation eines geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde die geschnittene, gereinigte Vektor-DNA durch Alkalische Phosphatase (CIAP, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) dephosphoryliert.

50 µl Ansatz: 30-50 ng Vektor-DNA
5 µl 1x CIAP-Puffer
0,015-0,025 U Alkalische-Phosphatase
X µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch 20 minütige Erhitzung auf 65°C gestoppt.

2.4.9 Anhängen eines Adenin-Überhangs an ein PCR-Fragment

Soll ein PCR-Fragment in einen Vektor mit Thymin-Überhang (z. B. pGEMT-easy) kloniert werden, wird am amplifizierten Fragment ein Adenin-Überhang (A-Überhang) benötigt. Dieser kann dann an den Thymin-Überhang (T-Überhang) des linearisierten Vektors binden. Taq-DNA-Polymerasen hängen durch ihre terminale Transferase-Aktivität automatisch ein Adenin an das 3'-Ende von glatten, doppelsträngigen PCR-Fragmenten. Mit *proofreading*-Polymerasen (wie z. B. Phusion-Polymerase) amplifizierten Fragmenten fehlt jedoch dieser A-Überhang und muss in einer zusätzlichen Reaktion angehängt werden.

100 µl Ansatz: 1 µg DNA-Fragment
1 µl dATP (20 mM)
2,5 U Taq-DNA-Polymerase
10 µl 10 × PCR-Puffer
auf 100 µl mit H₂O_{bidest} auffüllen

Der gut gemischte Reaktionsansatz wurde 30 min bei 72°C inkubiert.

2.4.10 DNA-Ligation

Durch die Ligation mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase werden doppelsträngige DNA-Fragmente miteinander verknüpft. Dabei werden „glatte“, oder „klebrige“ Enden von DNA-Fragmenten, die mit demselben Restriktionsenzym geschnitten wurden, durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-OH-Ende und dem passenden 5'-Phosphatende ligiert. So ist es möglich, in ein Plasmid ein DNA-Insert (z. B. eine für ein Gen kodierende Nukleotidsequenz) zu integrieren. Durch ein molares Verhältnis zwischen Vektor- und DNA-Insert-Molekülen von eins zu drei wird eine optimale Insertion erreicht, wenn beide Moleküle etwa gleich groß sind. Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Formel zur Berechnung der einzusetzenden Vektor- und Insert-Mengen für eine Ligation:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb "Insert"}}{\text{kb Vektor}} \times \frac{3}{1} = \mu\text{g "Insert"}$$

Durch die Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 min wurde die Ligasereaktion beendet und der Ligationsansatz konnte in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden.

2.4.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von DNA-Proben wurde nach Anleitung der Firma SeqLab (Göttingen) vorbereitet, per Post an diese geschickt und dort wurde die Sequenzierung durchgeführt.

2.5 Klonierungen

Im Folgenden werden die Klonierungen der Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, beschrieben. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.5 und die Vektoren im Anhang aufgeführt.

2.5.1 Klonierung eines CESA1-Vollängen-Klons

Bei verschiedenen Instituten können cDNA-Klone bestellt werden. Der EST (*expressed sequence tag*)-Klon H2G6 wurde über ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University, USA) bezogen. Zum Vollängenklon fehlen bei diesem EST-Klon die ersten 395 Basen. Die unvollständige cDNA ist in dem Vektor pBSK inseriert.

Der fehlende N-Terminus der cDNA wurde mit den Primern AtCesA_H2G6_F und AtCesA_short_R durch eine *proofreading*-Polymerase von cDNA aus einer RT-PCR

amplifiziert und nach Anhängen eines A-Überhanges in pGEM-T Easy kloniert. Aus diesem Klon wurde mittels Restriktion durch die Enzyme XhoI/AflIII ein 760 bp-Fragment herausgeschnitten. Das pBSK-H2G6-Plasmid wurde mit XhoI linearisiert und mit AflIII über einen Partialverdau geschnitten, so dass eine Vektorbande über ein Agarosegel gereinigt werden konnte, der ca. 400 bp fehlten. Nach Dephosphorylierung des Vektors, wurde das 760 bp-Fragment über die Schnittstellen XhoI/AflIII in den Vektor kloniert. Durch eine Sequenzierung konnte der N-Terminus als richtig und *in frame* zur folgenden cDNA-Sequenz ermittelt werden. Dieses Konstrukt pBSK-CESA1-full diente für die Klonierungen der folgenden fluoreszenzmarkierten CESA1-Konstrukte als Matrize für PCR-Reaktionen.

2.5.2 Klonierung des *bait*-Konstruktes für die Hefe-2-Hybrid-Analyse

Das pBSK-H2G6-Konstrukt diente als Matrize für die Amplifizierung des CESA1- *loop* mit den Primern AtCesAloop_F und AtCesA1loop_R. Die Länge des Amplifikates umfasst 1605 bp (964. Base bis 2568. Base des AtCesA1-Gens), was 535 Aminosäuren (322. Aminosäure bis 856. Aminosäure) entspricht. Der *loop* wurde über die Schnittstellen NdeI und BamHI in den Vektor pGBKT7 inseriert. Dieses Konstrukt pGBKT7-CESA-*loop* wurde als *bait* in dem Hefe-2-Hybrid-Screen eingesetzt.

2.5.3 Klonierung des N-Terminus von CESA1 an den N-Terminus des GFP

Mit den Primern AtCesA_F und AtCesA_short_R wurde eine PCR mit pBSK-CESA1-full als Matrize angesetzt, um das Konstrukt pGFP2-CESA1-short zu erstellen. Das entstandene Fragment wurde mit SpeI/XhoI geschnitten, so dass *sticky ends* entstanden. Dieses Fragment wurde N-terminal an das GFP im Vektor pGFP2 kloniert. Dazu wurde der pGFP2-Vektor mit XbaI/XhoI geöffnet, dephosphoryliert und mit dem geschnittenen Fragment ligiert. SpeI und XbaI erzeugen kompatible Überhänge, so dass die beiden Schnittstellen für eine Klonierung genutzt werden können. Das Fragment enthält die ersten 1104 Basen der CESA1-cDNA (368 Aminosäuren), die den N-Terminus und die beiden Transmembrandomänen beinhaltet. Dieses Konstrukt wird im Folgenden CESA1-short-GFP genannt.

2.5.4 Klonierung von CESA1 an den N-Terminus des GFP

Diese Klonierung erfolgte analog zu dem pGFP2-CESA1-short-Konstrukt. Das Insert entsprach hierbei der Vollängen-cDNA (1. – 3243. Base). Dieses Konstrukt trägt die

Bezeichnung CESA1-full-GFP. Parallel wurde das Insert auch in pGEMT-easy kloniert, um weitere Schnittstellen für die Klonierung von pGFP2-CESA1-Laterne zu erhalten.

2.5.5 Klonierung von CESA1 mit einer weiteren Transmembrandomäne an den N-Terminus des GFP

In dem Konstrukt CESA1-Laterne-GFP ist dem CESA1-full eine weitere Transmembrandomäne angefügt, an die das GFP geknüpft ist. Die zusätzliche Transmembrandomäne wird durch eine kurze Version von GNTI (N-Terminus, Transmembrandomäne und ca. 40 Aminosäuren der Halsregion) aus Kartoffel erzeugt.

pGFP2-CESA1-Laterne erforderte zwei aufeinander folgende Klonierungen. Zuerst wurde das GNTI-Fragment mit GnTI_XhoI_F und GnTI_NcoI_R von dem Plasmid pGFP2-A1-1/3 (von Prof. Antje von Schaewen zur Verfügung gestellt) amplifiziert. Über die Schnittstellen XhoI/NcoI in den Vektor pGFP2 kloniert und so das erste Konstrukt pGFP2-GNTI erzeugt. Das zweite Fragment CESA1-full wurde aus dem in Kap. 2.5.4 beschriebenen Klonierungsprodukt in pGEM-T Easy über die Schnittstellen SpeI/XhoI herausgeschnitten und in pGFP2-GNTI über XbaI/XhoI inseriert.

2.5.6 Klonierung von CESA1 an den C-Terminus des YFP

Für dieses Konstrukt wurde mit den Primern AtCesA_full_Y/C_F und AtCesA_full_Y/C_R von der Matrize pBSK-CESA1-full die cDNA von CESA1-full amplifiziert und über die Schnittstellen SalI/XhoI in den Vektor pYFP2ΔBamHI kloniert. Diese Klonierung schlug fehl, da das Fragment in der falschen Orientierung in den Vektor inserierte. Die beiden Restriktionsenzyme SalI/XhoI generieren kompatible Überhänge, so ist eine Insertion in den Vektor in beiden Richtungen möglich. Für die richtige Orientierung in den Vektor würde eine 50%ige Wahrscheinlichkeit vorliegen. Es konnte jedoch kein Klon mit dem Insert in richtiger Orientierung identifiziert werden. Ein Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit den Enzymen SacI/XhoI ermöglichen die Integration in den Vektor pYFP2ΔBamHI. SacI schneidet bei der 45. Base in der cDNA-Sequenz und das entstehende Fragment inserierte *in frame* an den C-Terminus der YFP-Sequenz. Dadurch fehlen dem CESA1-Protein die ersten 15 Aminosäuren, daher wurde das Konstrukt YFP-CESA1-full-Δ15 genannt.

2.5.7 Klonierung des KinesinLC an den N- und C-Terminus des OFP

KinesinLC (KLC) wurde in der Hefe-2-Hybrid-Analyse als möglicher Interaktionspartner von CESA1-*loop* gefunden. Für eine Co-Expression in Protoplasten wurde das KinesinLC N- und C-terminal an OFP (orange fluoreszierendes Protein) geknüpft. Das PCR-Produkt für beide Konstrukte wurde mit dem Primerpaar Kinesin_F und Kinesin_R aus cDNA einer RT-PCR amplifiziert. Das Amplifikat enthält die ganze cDNA-Sequenz von insgesamt 1826 Basen. Die Primer wurden so konzipiert, dass sie zwei Schnittstellen beinhalteten und die Inserts durch die Wahl der Restriktionsenzyme für die N-terminale bzw. C-terminale Fusionierung an das OFP im pOFP Δ NcoI-Vektor vorbereitet wurden. Das PCR-Produkt und der Vektor wurden für OFP-KLC (pOFP-KinesinLC-C-term) mit SpeI/BamHI geschnitten, während für KLC-OFP (pOFP-KinesinLC-N-term) die Restriktionsenzyme XhoI/NcoI gewählt wurden.

2.5.8 Klonierung des pOFP2 $\Delta\Delta$ NcoI-Vektors

Da bei dem pOFP Δ NcoI-Vektor nur die Möglichkeit besteht über XhoI, EcoRI und NcoI vor die Sequenz des Fluoreszenzproteins OFP zu fusionieren, wurde der Vektor pOFP2 $\Delta\Delta$ NcoI hergestellt. Dazu wurde die OFP-Sequenz aus pOFP Δ NcoI über NcoI/SacI herausgetrennt und im pGFP2-Vektor die GFP2-Sequenz gegen diese OFP-Sequenz ausgetauscht.

2.5.9 Klonierung von KORRIGAN an den N-Terminus des OFP

Mit dem neu erstellten pOFP2 $\Delta\Delta$ NcoI-Vektor wurde das KOR1-OFP-Konstrukt erzeugt. Als *template* für die Primer Korrigan_full_F und Korrigan_full_R diente ein KORRIGAN-full-Konstrukt in pYFP2 Δ BamHI (von Stephan Rips zur Verfügung gestellt). Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen XbaI/XhoI in pOFP2 $\Delta\Delta$ NcoI inseriert. Analog wurde das Konstrukt pGFP2 Δ NcoI-Korrigan-Full (KOR1-GFP) hergestellt, jedoch fand es in dieser Arbeit keine Verwendung.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 LewisA-Antikörper-Herstellung

Um einen Antikörper gegen eine Zuckerverbindung herzustellen, muss dieses Zuckermolekül an ein Protein gekoppelt werden, damit es in dem Antikörperproduzent auch richtig angeboten werden kann und als körperfremd erkannt wird.

Die Kopplung des Zuckermoleküls an das Trägerprotein BSA erfolgte wie in van Remoortere et al. (2000) beschrieben. In 100 µl Dioxan:Wasser (2:1) wurden 1 mg des Zuckermoleküls (Lacto-N-fucopentaoseII L6401, Sigma) und 1,86 µl Triethylaminlösung (1:10 verdünnt in Wasser) sowie 2,4 µmol NNNN-tetramethyl-succinimido)-uronium-tetrafluoroborat (TSTU) zugegeben und 30 min bei RT taumelnd inkubiert. Dann wurden 550 µl BSA-Lösung (2 mg/ml in 0,1 M Natriumborat, pH 8,5) zugegeben und weiterer 4 Stunden taumelnd inkubiert. Durch Zugabe von Hydroxylamin (Endkonzentration 25 mM) wurden die ungebundenen Succinimidoester abgesättigt. Das entstandene Glykoprotein wurde über eine PD-10-Säule gereinigt und in PBS eluiert.

Das gereinigte Glykoprotein wurde an die Firma Eurogentec (Belgien) geschickt, wo die Immunisierung der Kaninchen durchgeführt wurde.

PBS: 8 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄
 0,24 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4 einstellen

2.6.2 Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe

Pflanzenmaterial wurde frisch geerntet, gewogen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden mit zwei Teilen Extraktionspuffer auf ein Gewichtsteil versetzt und mit einer Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) mit einem kalten Metall-Pistill direkt im Reaktionsgefäß auf Eis gemörsert.

Extraktionspuffer: 50-100 mM HEPES, pH 7,5
 2 mM Natriumpyrosulfit
 1 mM PefablocSC

Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurden die Proben zentrifugiert (20000 xg, 15 min, 4°C). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet anschließend in äquivalenter Menge 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen, resuspendiert, 2x für 5 Minuten im Ultraschallbad inkubiert und erneut kurz abzentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde mit 6x SDS-Ladepuffer versetzt, bevor die Proben auf das SDS-Gel geladen wurden.

<u>6x SDS-Gelladepuffer:</u>	1,5 M TrisHCl, pH 6,8	14 ml
	30% SDS	22,4 ml
	0,15% Bromphenolblaulsg.	2,8 ml
	Glycerin	14 ml

Vor Gebrauch wurde auf 1 ml 6x Ladepuffer 50 µl β-Mercaptoethanol zugegeben.

2.6.3 Isolierung von Apoplasteneluat aus Blättern

Proteine, die sich im Apoplasten (in den Intrazellularen) der Pflanze befinden, können durch Flüssigkeitsinfiltration und Zentrifugation ausgeschwemmt werden. Die Blätter werden dazu vollständig in die Infiltrationsflüssigkeit getaucht und durch Unterdruck wird die Flüssigkeit in den Apoplastenraum gedrückt. Der Flüssigkeitseintritt kann durch eine dunklere Färbung der Blätter beobachtet werden. Wenn die Blätter mit Flüssigkeit infiltriert sind, werden sie vorsichtig möglichst ohne die Blattadern zu zerstören, aufgerollt und in eine Art Siebeinsatz für 50 ml Reaktionsgefäße gelegt. In einem Ausschwingrotor wurden die Proben bei 50 xg für 2 min abgedreht und das Apoplasteneluat im Reaktionsgefäß aufgefangen. Falls nicht genug Eluat gewonnen wird, kann die Zeit und g-Zahl erhöht werden.

<u>Infiltrationsflüssigkeit:</u>	5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5
	14 mM β-Mercaptoethanol
	0,1 mM PefablocSC

2.6.4 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)

Zu der Proteinlösung wurden 20 % des Probenvolumens einer 100 % TCA-Lösung zugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden abzentrifugiert (9000 rpm, 4°C, 30 min in SS34-Rotor) und das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und anschließend in der gewünschten Menge Puffer resuspendiert.

2.6.5 Behandlung der Proteinextrakte mit Peptid-N-Glycosidase F

Die Endoglycosidase Peptid-N-Glycosidase F spaltet N-Glykane von Glykoproteinen ab, die keine *core*-Fucose gebunden haben.

Das Pflanzenmaterial wurde mit NEP-Puffer im Verhältnis 1:1 mit einer Spatelspitze PVPP gemörsert. Von diesem Rohextrakt wurden 20 µl mit 10 %iger SDS-Lösung auf eine End-

konzentration von 1 % eingestellt und 10 Minuten gekocht. Durch Zugabe von 180 µl NEP-MT-Puffer (NEP-Puffer mit 1% β-Mercaptoethonal und 0,5% TritonX-100) wurde die SDS-Konzentration wieder verringert. Zu 120 µl Proteinextrakt wurde 1 Unit PNGaseF gegeben und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. 40 - 60 µl der behandelten Proteinextrakte wurden pro Spur auf ein SDS-Gel aufgetragen.

NEP-Puffer: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,8
 10 mM EDTA
 4 mM PefablocSC

2.6.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde nach der Methode von Bradford (1976) photometrisch bei 595 nm mit Hilfe einer Eichgrade bestimmt. Zur Erstellung einer Eichgrade wurde entfettetes Rinderserumalbumin (BSA, 0-20 µg) eingesetzt. Der Proteinbestimmungs-Ansatz wurde wie folgt zusammengesetzt, gut gemischt und nach ca. 10 min gemessen (als Referenzwert diente eine Probe ohne Protein):

X µl Probe mit H₂O_{bidest} auf 500 µl Endvolumen auffüllen
500 µl Bradford-Farbreagenz

Bradford-Farbreagenz: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250
 23,5 ml Ethanol
 53 ml *ortho*-Phosphorsäure (83%)
 ad 500 ml H₂O

2.6.7 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, abgekürzt SDS-PAGE (engl. Natrium: *sodium*) erfolgte in vertikalen Minigelen (Bio-Rad, München) mit 8 oder 10%igem Trenngel und 4%igem Sammelgel nach der Methode von Laemmli (1970).

Als Molekularmassenstandard diente der vorgefärbte Proteinmarker „Prestained Protein Ladder“ (MBI Fermentas, St-Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA/pro SDS-Gel in SDS-Laufpuffer.

SDS-Gele:

	Trenngel		Sammelgel
	8%	10%	4%
H₂O_{bidest}	10,74 ml	9,84 ml	4,8 ml
40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid	4,06 ml	4,96 ml	0,74 ml
1,5 M TrisHCl pH 8,8	5 ml	5 ml	-
0,5 M TrisHCl pH 6,8	-	-	1,87 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,075 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,1 ml	37,5 µl
TEMED	10 µl	10 µl	7,5 µl

SDS-Laufpuffer: 25 mM TrisHCl, pH 8,3
 192 mM Glycin
 4 mM SDS

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele zunächst 30 Minuten in Coomassie-färbelösung gefärbt und danach in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren.

Coomassiefärbelösung: 0,4% (w/v) Coomassiebrillantblue G-250
 9% (v/v) Essigsäure
 45,5% (v/v) Methanol
 45,1% (v/v) H₂O_{bidest}

Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure
 45% (v/v) Methanol
 45% (v/v) H₂O_{bidest}

2.6.8 Western-Blot-Analyse und Immundekoration

Zum qualitativen Nachweis von Proteinen dient die Western-Blot-Analyse. Hierbei werden durch das Anlegen einer Spannung die Proteine aus einer SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (Protean, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen.

Gel, Membran und Filterpapiere wurden für den Blot 10 min in Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurden Gel und Membran aufeinander gelegt und von beiden Seiten mit

2.6.8.2 Colorimetrische Entwicklung

Für die colorimetrische Entwicklung wurde der mit sekundärem Antikörper inkubierte Blot dreimal in Puffer (TBS – TBS-T – TBS) gewaschen. Anschließend wurde die Membran bis zum Erscheinen deutlicher Banden in Färbelösung inkubiert. Durch gründliches Waschen der Membran mit H₂O_{bidest} wurde die Peroxidasereaktion gestoppt.

Färbelösung: 25 ml TBS

20 mg 4-Chloro-1-Naphthol in 5 ml Methanol

15 µl Wasserstoffperoxid (37%ig)

2.6.8.3 Chemilumineszente Entwicklung

Bei dieser Methode wird ein Substrat durch die Meerrettichperoxidase umgewandelt und zerfällt, was die Emmission von Licht zur Folge hat (*ECL*: „*Enhanced Chemiluminescence*“). Das emittierte Licht kann durch eine lichtempfindliche Kamera aufgezeichnet werden. Für diese Methode ist eine geringere Konzentration (1:5000-10000) des primären sowie des sekundären Antikörpers (1:15000) notwendig. Das Waschen der Membran erfolgte wie bei dem immunologischen Nachweis durch Peroxidase. Für die ECL-Färbung wurde die Membran eine Minute in „*ECL*[™] *Western Blotting Detection Reagent*“ inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mittels einer sensitiven Kamera (GENE Gnome, Syngene Bio Imaging).

2.6.8.4 Ablösen eines gebundenen Antikörpers („strippen“)

Um einen bereits entwickelten Blot ein weiteres Mal mit einem anderen Antikörper zu untersuchen, kann der gebundene Antikörper abgewaschen werden („strippen“). Dazu wurde der Blot 30 Minuten bei 50°C in Strip-Puffer inkubiert und anschließend gründlich mit TBS gespült bevor mit dem Blockieren der Membran wieder begonnen werden konnte.

Strip-Puffer:

62,5 mM Tris, pH 6,7

2% SDS

100 mM β-Mercaptoethanol (frisch dazugeben)

2.6.8.5 „Dot-Blot“ – eine Variante des Western-Blots

Der Unterschied zum Western-Blot liegt darin, dass bei einem Dot-Blot die nachzuweisenden Proteine nicht über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet werden, sondern

die Proteinlösung direkt auf die Membran getropft wird. Nach dem Trocknen der Proteinlösung auf der Membran wird diese wie ein normaler Western-Blot behandelt.

Zur Analyse vieler Pflanzen-Proben wurde eine 96-well-Platte mit PVPP bestäubt, mit je 50 μ l Extraktionspuffer (für Proteinextraktion) befüllt, mit einem kleinen Blattstück bestückt und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben erneut zweimal eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellstrukturen zu zerstören. Auf die Nitrocellulosemembran wurden 5 μ l Proteinlösung aufgetragen und wie ein Western-Blot weiter behandelt.

2.6.9 Nachweis endständiger Mannosen mittels Concanavalin A

Concanavalin A (ConA) bindet an terminalen Mannose- und Glucosereste von Zuckerstrukturen. Dazu wurde der Proteinblot nach der PonceauS-Färbung und Entfärbung mit TBS-T für eine Stunde in TBS-T/M/C (TBS-T mit 1 mM MnCl_2 und 1 mM CaCl_2) blockiert und für eine Stunde mit ConA (3 μ l ConA-Lösung (25 mg/ml) auf 15 ml TBS-T/M/C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Blots für je 15 Minuten mit TBS-T/M/C folgte eine Inkubation mit 10 μ g Peroxidase in TBS-T/M/C eine Stunde unter Schütteln. Anschließend wurde der Blot 3 x 15 Minuten in TBS-T/M/C gewaschen und nach einmaligen Spülen in TBS chemilumineszent entwickelt.

2.6.10 Behandlung von geblotteten Proteinen und Proteinextrakten mit *jack bean-Mannosidase*

Für eine genauere Analyse der α -Mannosidase II wurden die Proteinextrakte direkt und die geblotteten Proteinextrakte mit der α -Mannosidase aus der Jackbohne (Sigma M-7257) behandelt.

Der blockierte Blot wurde 30 Minuten in 40 mM MES pH 4,6 equilibriert und nach Zugabe des Enzyms (1,36 Units in MES-Puffer und jeweils eine 1:10-Verdünnung bis 0,0013 Units) in Folie eingeschweißt und für eine Stunde bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Vor der Reaktion mit dem Antikörper und der Entwicklung wurde der Blot eine halbe Stunde in TBS gewaschen.

Für die Mannosidase-Behandlung des Rohextrakts wurden 250 μ g Proteinrohextrakt mittels TCA-Fällung gefällt, in 240 μ l MES-Puffer resuspendiert und 40 μ l Proteinrohextrakt mit den jeweiligen Enzymverdünnungen gemischt und eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben mit 6x SDS-Ladepuffer versetzt, gekocht und eine SDS-PAGE durchgeführt.

2.6.11 Glucoronidase-Aktivitätstest

Die Analyse der Doppelmutante C6 *stt3a-2* erfolgte über einen Glucoronidase (GUS)-Aktivitätstest. Pflanzen, die die T-DNA-Insertion in *stt3a-2* tragen, sind auch mit einem BiP (*binding protein*)-GUS-Konstrukt transformiert. Dadurch kann die *stt3a-2*-Mutation anhand der GUS-Aktivität ermittelt werden. Ein in einer Petrischale ausgelegtes Filterpapier wurde mit einem Raster versehen und mit der GUS-Färbelösung getränkt. Eine MS-Agarplatte wurde ebenfalls mit einem Gitternetz versehen. Von den zu untersuchenden Pflanzen wurden die Wurzelspitzen mit einem Skalpell abgeschnitten und auf das Raster des feuchten Filterpapiers gelegt und eine Stunde bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Pflanze wurde nach der Abtrennung der Wurzelspitze auf das entsprechende Raster der MS-Platte überführt, damit später positive Färbeergebnisse den richtigen Pflanzen zugeordnet werden konnten.

GUS-Stammfärbelösung: 5 mg X-GlcA in 100 µl Dimethylformamid lösen

GUS-Färbelösung: 10 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7
100 µl GUS-Stammfärbelösung
(Vor Licht schützen und immer frisch ansetzen)

2.7 Hefe-2-Hybrid-System

Das Hefe-2-Hybrid-System wird angewendet, um Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen (Bartel and Fields, 1997). Es basiert auf der Wiederherstellung eines Transkriptionsfaktors durch eine nichtkovalente Interaktion von zwei Domänen, die DNA-Bindedomäne, die für die spezifische Erkennung einer DNA-Sequenz (UAS = „*upstream activation sequence*“) verantwortlich ist, und einer Aktivierungsdomäne (AD), die die Transkription initiiert. Die getrennten Domänen des Transkriptionsfaktors können die Transkription des spezifischen Gens nur hervorrufen, wenn beide Domänen miteinander wechselwirken, d. h. sich räumlich sehr nahe kommen. Das hier verwendete System basiert auf dem GAL4-Promoter und den Reporter genen *lacZ* und *HIS3*. Die daraus resultierende Histidin-Auxotrophie und die β -Galactosidase-Aktivität ermöglichen eine schnelle Identifizierung positiver Klone. Die Fusionsproteine mit den Domänen des Transkriptionsfaktors werden durch Klonierung der entsprechenden DNA-Sequenzen in den Vektor pGBKT7 (Clontech, Heidelberg) bzw. der cDNA-Bank in den Vektor pACTII hergestellt. Die

Herstellung der cDNA-Bank ist in Kim et al. (1997) beschrieben und wurde von der AG Kudla (Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

2.7.1 Hefestamm und Wachstumsbedingungen

Für den Hefe-2-Hybrid-Screen wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* Y190 mit folgendem Genotyp verwendet:

MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52
leu2-3+ URA3::GAL=lacZ Lys2::GAL (AUS)=His2 cyh

Die Hefezellen wurden auf YPD-Medium angezogen. Die Glucoselösung wurde als 20%ige Stammlösung hergestellt, autoklaviert und dem Flüssigmedium vor Gebrauch oder dem Festmedium vor dem Gießen zugefügt.

Mit Plasmiden transformierte Hefen wurden auf SD-Medium angezogen.

YPD-Medium: 2% Pepton
 1% Hefeextrakt
 2% Glucose
 (2% Agar für Plattenmedium)

SD-Medium: 6,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
 single dropout-Medium (Menge ist abhängig vom verwendeten
 Dropout, QBiogene, Heidelberg)
 2% Glucose
 (2% Agar für Festmedium)

2.7.2 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation

Die Hefezellen wurden nach der Lithiumacetat-Methode transformiert (Gietz and Woods, 2002). Für die Herstellung der kompetenten Hefezellen wurden 5 ml YPD-Medium mit Hefezellen inokuliert und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler bei 150 rpm angezogen. 50 ml frisches YPD-Medium wurden mit $2,5 \times 10^8$ Zellen aus der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C für 5 min und 3000 xg geerntet und zweimal mit 2%iger Zuckerlösung gewaschen und in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Nach der Inkubation für 15 min bei 30°C wurden die

Zellen in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und 15 sec abzentrifugiert, um das Lithiumacetat zu entfernen. Die Hefezellen wurden in dem vorbereiteten Transformationsmix resuspendiert.

Transformationsmix für eine Transformation enthält:

240 µl PEG3350 50%	(50% (w/v) PEG3350 in Wasser)
36 µl LiAc 1 M	(1 M LiAc pH 7,5 in Wasser)
50 µl ssDNA	(1 mg/ml gescherte Lachssamen-DNA in Wasser gelöst, sterilfiltriert, vor Gebrauch 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt)
5 µl Plasmid-DNA	(100 ng/µl)
ad 350 µl H ₂ O	

Insgesamt können 500 ng Plasmid-DNA in eine Transformation eingesetzt werden. In Doppeltransformationen wurde die Menge an Plasmid-DNA proportional reduziert.

Der Hefe-Transformationsansatz wurde für 30 min bei 30°C inkubiert und dann bei 42°C einem Hitzeschock für 15 min ausgesetzt. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert und in 1 ml entsprechendem SD-Medium resuspendiert. 200 µl des Transformationsansatzes werden auf SD-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 3 Tage bebrütet.

2.7.3 Bestimmung der 3-amino-1,2,4-triazole-Konzentration zur Expressionsunterdrückung des Histidin-Gens

Da der Hefestamm Y190 eine Grundexpression des *HIS3*-Gens aufweist, die für die Zellen ausreichend ist auf SD-Medium ohne Histidin zu wachsen, muss für jedes BD-Konstrukt die Konzentration des Inhibitors für das Enzym, welches durch *HIS3* codiert wird, ermittelt werden. Dazu wurden die mit dem BD-Plasmid transformierten Hefezellen auf SD-Platten ohne Tryptophan (SD-Trp) mit einem steigenden 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT)-Gradienten (0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 mM 3-AT) ausplattiert. Es wurde die 3-AT-Konzentration gewählt, bei der die Hefen nur noch sehr kleine Kolonien bilden konnten.

2.7.4 Hefe-2-Hybrid-screen

Hefezellen, die das BD-Konstrukt enthielten, wurden in 200 ml SD-Trp-Medium 16 Stunden angezogen. Am nächsten Tag wurde mit dieser Übernachtskultur 1 l frisches SD-Trp-Medium mit 2×10^9 Zellen inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden

durch Zentrifugation (5000 xg, 10 min) geerntet und zweimal mit 100 ml 1x LiAc/TE gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml 1x LiAc/TE resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden dann 5 mg denaturierte ssDNA, 100 µg Plasmid-DNA der GAL4-AD-Bank, 24 ml PEG 50%, 3 ml 10x TE und 3 ml 1 M Lithiumacetat gegeben. Der gut gemischte Ansatz wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und 30 min bei 30°C geschüttelt (150 rpm). Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 min wurde der Transformationsansatz in 1 l vorgewärmtes YPD-Medium in einem 2 l-Kolben gefüllt und 1 Stunde bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min) geerntet und in 15 ml SD-His-Trp-Leu-Medium (ohne Histidin, Tryptophan, Leucin) resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer erneuten Zentrifugation (5000 rpm, 5 min) wurde das Pellet in 10 ml SD-His-Trp-Leu-Medium gelöst und in 150 µl-Aliquots auf SD-His-Trp-Leu-Platten (mit der für das Konstrukt ermittelten Menge 3-AT) ausplattiert und für 5 - 10 Tage bei 28°C inkubiert bis große Kolonien ($\varnothing > 1$ mm) zu sehen waren. Diese wurden auf frische SD-Platten ausgestrichen und mit dem Filter-Lift-Assay analysiert.

10x TE: 100 mM TrisHCl, pH7,5
10 mM EDTA

10x LiAc: 1 M LiAc, pH 7,5

1x LiAc/TE: 1 ml 10x LiAc
1 ml 10x TE
8 ml steriles H₂O

2.7.5 Filter-Lift-Assay zur Detektion der β -Galactosidase-Aktivität

Transformierte Hefekolonien wurden mit Hilfe der β -Galactosidase-Aktivität auf die Expression des *lacZ*-Gens untersucht. Dazu wurde ein Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schüll BA85) luftblasenfrei auf die Agarplatte mit den Hefekolonien gelegt. Die Orientierung des Filters wurde markiert und nachdem er sich mit Feuchtigkeit durchzogen hatte, wurde er vorsichtig abgezogen und mit der Kolonieseite nach oben in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Hefezellen aufzubrechen. Der Filter konnte bei Raumtemperatur auftauen, bevor er auf ein mit Z-Puffer/X-Gal durchtränktes Filterpapier in einer Petrischale gelegt wurde. Die Nitrocellulosefilter wurden über Nacht bei 30°C inkubiert bis eine Blaufärbung die β -Galactosidase-Aktivität anzeigte.

<u>Z-Puffer pH7:</u>	16,1 g/l Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O 5,5 g/l NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O 0,75 g/l KCl 0,246 g/l MgSO ₄ x7H ₂ O pH 7
<u>X-Gal:</u>	20 mg/ml X-Gal in DMF gelöst gelagert bei -20°C
<u>Z-Puffer/X-Gal:</u>	1,8 ml Z-Puffer 90 µl X-Gal 4,86 µl β-Mercaptoethanol

2.7.6 Plasmidisolierung aus Hefezellen und Kolonie-PCR

Um die Interaktionspartner eines Hefe-2-Hybrid-Versuches zu studieren, wurden aus den Hefekolonien, die im Filter-Lift-Assay eine Blaufärbung aufwiesen, die Plasmide isoliert und in *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte über die Ampicillin-Resistenz des AD-Plasmids. Von den resultierenden Transformanden wurden pro Transformation 5 Kolonien gepickt und mit einer Kolonie-PCR analysiert. Die Kolonie-PCR wurde wie eine Standard-PCR angesetzt, jedoch wurde als DNA-Template eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickt und direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Mit demselben Zahnstocher wurde noch eine ÜN-Kultur angeimpft, um mit positiven Kolonien eine Plasmidisolierung durchzuführen.

2.7.7 Mini-mating der möglichen Interaktionspartner mit dem leerem Vektor

Um mögliche falsch-positive Interaktionen ausschließen zu können, wurden die isolierten AD-Plasmide Kontrollpaarungen mit dem BD-Plasmid ohne Insert unterzogen. Dabei wurde das AD-Plasmid mit der möglichen interagierenden cDNA einmal mit dem BD-Plasmid mit dem *bait* und ein anderes Mal mit dem leeren BD-Plasmid in Hefezellen transformiert. Die so entstehenden Kolonien wurden mit dem Filter-Lift-Assay auf Interaktionen untersucht. Wenn die Kolonien mit dem leeren BD-Plasmid blau wurden, handelte es sich um falsch-positive Interaktionen. Falls dies nicht der Fall war, wurden die AD-Plasmide zur Analyse der enthaltenen cDNA sequenziert.

2.8 Mikroskopie

2.8.1 Confokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM)

Die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen von transformierten Protoplasten wurden mit Hilfe eines inversen confokalen Laser Scanning Mikroskops (DM IRE2 UV, Leica) mit einem 63x H₂O-Eintauchobjektiv (1.2 W corr.) in einer Bachhofer-Kammer (Deckglas am Boden) durchgeführt. Das inverse Mikroskop ist mit einem Fluoreszenzfilterrad mit folgenden Filtern zur Detektion von GFP (L5, Leica), OFP und YFP (beide AF Analysetechnik, Tübingen, Germany) ausgestattet.

Die Bildaufnahmen wurden mit verschiedenen Lasern durchgeführt (siehe Tabelle 2.6).

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Laser am cLSM.

Lasertyp	Wellenlänge (nm)
Argon/Argon-Krypton	458, 476, 488, 496, 514, 568, 647
Helium-Neon	543

Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei den verschiedenen Fluoreszenz-Konstrukten mit unterschiedlichen Wellenlängen, die in Tabelle 2.7 festgehalten sind. Die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls wurde bei 700 nm als Referenz aufgenommen.

Tab. 2.7: Anregungswellenlängen und Detektionsbereiche der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Konstrukten

Fluoreszenz-protein	Anregungs-Wellenlänge (nm)	Emissions-Wellenlänge (nm)	Laser-Anregung (nm)
YFP	514	527	514
GFP	489	508	488
OFP	~540	580-590	514 und/oder 543

Für Co-Expressionsversuchen wurde sowohl der Detektionsbereich als auch die Anregungsstärke so gewählt, dass ein Übersprechen oder ein „Durchbluten“ in den anderen Detektionskanal ausgeschlossen werden konnte.

2.8.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die jungen Arabidopsiskeimlinge wurden von den Agarplatten direkt in eine 10 %ige Ethanollösung überführt und das Wasser über einen steigenden Ethanolgradienten (30 – 50 – 70 – 90%) für jeweils eine Stunde bis hin zu 100%igem Ethanol gegen Alkohol ausgetauscht. Die entwässerten Proben wurden mit einem Kritisch-Gefrierpunkttrockner (Emitech K850, Ashford, UK) gewebeschonend getrocknet und mit Gold überschichtet (Emitech K550x, Ashford, UK). Die Rasterelektronenaufnahmen wurden mit dem Hitachi S-3000N bei 15 kV unter Hochvakuum aufgenommen.

2.9 Computerprogramme

Aus den Datenbanken EMBL und SWISSPROT sowie TAIR wurden DNA- und Proteinsequenzen importiert. Das Durchsuchen von Gendatenbanken nach ähnlichen Sequenzen (*BLAST*) und das Ausrichten von Sequenzen zueinander (*alignment*) wurde mit den Programmen WU-Blast 2.0 und CLUSTAL W durchgeführt, die auf der Internetseite www.expasy.org zu finden sind. Zum Übersetzen von DNA in Proteinsequenzen und die Berechnung von Molekulargewichten von Proteinen wurden die dort ebenfalls angebotenen Programme genutzt. Zur Dokumentation von chemilumineszent entwickelte Western-Blots wurden mit dem Programm GeneSnap (Version 6.00.16) bearbeitet.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Bereiche untergliedert. Der erste Teil befasst sich mit der Suche nach Protein-Protein-Interaktionspartner der Cellulosesynthase A1 aus *Arabidopsis thaliana*. Dafür wurden verschiedene Fusionsproteine bestehend aus einem Fluoreszenzprotein und der Cellulosesynthase A1 hergestellt, die eine mögliche Protein-Protein-Interaktion durch Co-Lokalisationsstudien bestätigen sollen. Der zweite große Teil beschäftigt sich mit der N-Glykosylierung im Sekretorischen System. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Schlüsselenzym der komplexen Glykosylierung, der N-Acetylglucosaminyltransferase I. Jedoch wurden auch weitere Enzyme dieses Stoffwechselweges in die Untersuchungen mit einbezogen.

Teil I

3.1 Cellulosesynthase A1 aus *Arabidopsis thaliana*

Die in dem Hefe-2-Hybrid-System ermittelten positiven Interaktionspartner der cytosolischen Domäne (*loop*) der Cellulosesynthase A1 (siehe Kapitel 3.2) sollten *in planta* bestätigt werden. Dazu wurden parallel zum Hefe-2-Hybrid-Versuch verschiedene XFP-Konstrukte von CESA1 hergestellt, um möglichst eine Fluoreszenz-markierte CESA1-Untereinheit zu erhalten, die wie das native Protein an der Plasmamembran lokalisiert. Mit diesem XFP-CESA1-Konstrukt sollten dann die möglichen Interaktionspartner, ebenfalls mit einem fluoreszierenden Protein markiert, in Protoplasten zur Bestätigung einer Interaktion auf ihre Co-Lokalisation untersucht werden.

3.1.1 Lokalisation der Cellulosesynthase A1 aus *Arabidopsis thaliana* in Protoplasten

Die Untereinheiten der Cellulosesynthasen bilden in der Plasmamembran sogenannte Rosettenkomplexe, die aus sechs CESA-Molekülen bestehen (Delmer, 1999). Um die Lokalisation der Cellulosesynthase in Protoplasten untersuchen zu können, wurden verschiedene Fusionsproteine der CESA mit Fluoreszenzmarkern hergestellt, die sich in der Position des XFP sowie der Anzahl an Transmembrandomänen unterschieden. Die Abb. 3.1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten XFP-Konstrukte als Tonnen-Modell einer einzelnen Untereinheit, um den unterschiedlichen Aufbau der Konstrukte zu veranschaulichen. Das Konstrukt CESA1-short-GFP ist eine verkürzte Fusion mit GFP und umfasst den N-Terminus, die zwei ersten Transmembrandomänen und 48 weitere Aminosäuren. Es besteht aus 368

Aminosäuren der CESA1, die N-terminal mit GFP fusioniert worden sind. Bei dem CESA1-full-GFP-Konstrukt sind alle 3243 bp (vom Start-ATG bis zum letzten codierenden Triplet) N-terminal an das GFP-Gen fusioniert worden. Dies entspricht 1081 Aminosäuren. Als Alternative ist das Konstrukt CESA1-Laterne-GFP konstruiert worden. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Konstrukten und YFP-CESA1- Δ 15-full wurde das Konstrukt CESA1-Laterne-GFP so konstruiert, dass nach erfolgter Überexpression und korrektem Einbau des Proteins in die Plasmamembran die Fluoreszenz extrazellulär vorliegt. Dafür wurde dem C-Terminus von CESA1-full eine weitere Sequenz, GnTI-short, angehängt. Die Sequenz von GnTI-short stammt aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und besteht aus dem cytosolischen Teil, einer Transmembrandomäne und einer 40 Aminosäure umfassenden Halsregion in Fusion mit GFP. Durch die weitere Transmembrandomäne soll das GFP auf der Lumenseite des sekretorischen Systems bzw. auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran liegen. Bei dem Konstrukt YFP-CESA1- Δ 15-full wurde CESA1 C-terminal an das Fluoreszenzprotein fusioniert. Dieses Konstrukt entspricht dem Vollängenklon bis auf eine Verkürzung des N-Terminus um die ersten 15 Aminosäuren.

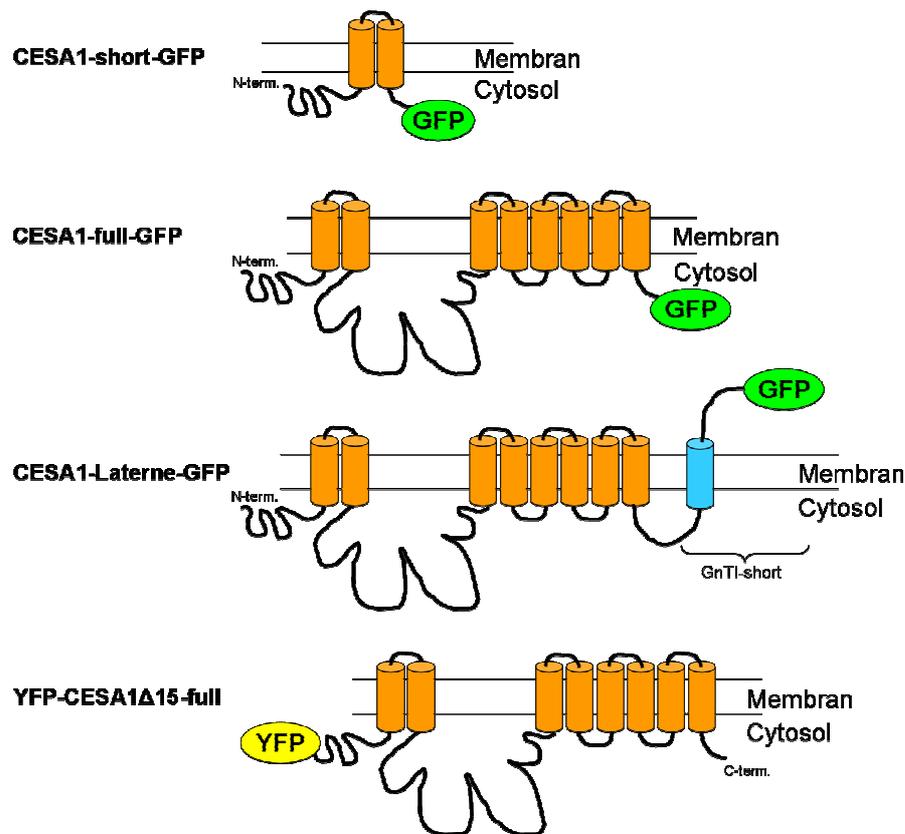


Abb. 3.1: Tonnen-Modelle und postulierte Membrantopologie der GFP/YFP-CESA1-Konstrukte. Bis auf YFP-CESA1 Δ 15-full, welches C-terminal an YFP fusioniert ist, sind alle Konstrukte mit GFP fusioniert. Die Transmembrandomänen sind durch die Tonnen dargestellt und würden in der Plasmamembran als zirkulärer Komplex vorliegen, der eine Pore bildet, durch die die neu synthetisierte Cellulosekette geschleust wird.

Alle Konstrukte wurden in Tabak-Protoplasten transformiert und die subzelluläre Lokalisation über die Fluoreszenz mittels cLSM analysiert. In Abb. 3.2 sind die Aufnahmen der Fluoreszenzverteilung der einzelnen Konstrukte gezeigt. Das linke Bild zeigt die Fluoreszenz des Fusionsproteins, in der Mitte ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls und rechts die Überlagerung der beiden vorherigen Aufnahmen dargestellt. Die kurze Version CESA1-short-GFP (in Abb. 3.2 oberste Spalte) zeigt eine netzartige Fluoreszenzverteilung, in der auch deutlich der Zellkern umrandet ist. Diese Art von Fluoreszenz deutet auf eine Lokalisation im ER hin, das die Zelle durchzieht und den Übergang zwischen Kern- und ER-Membran zeigt.

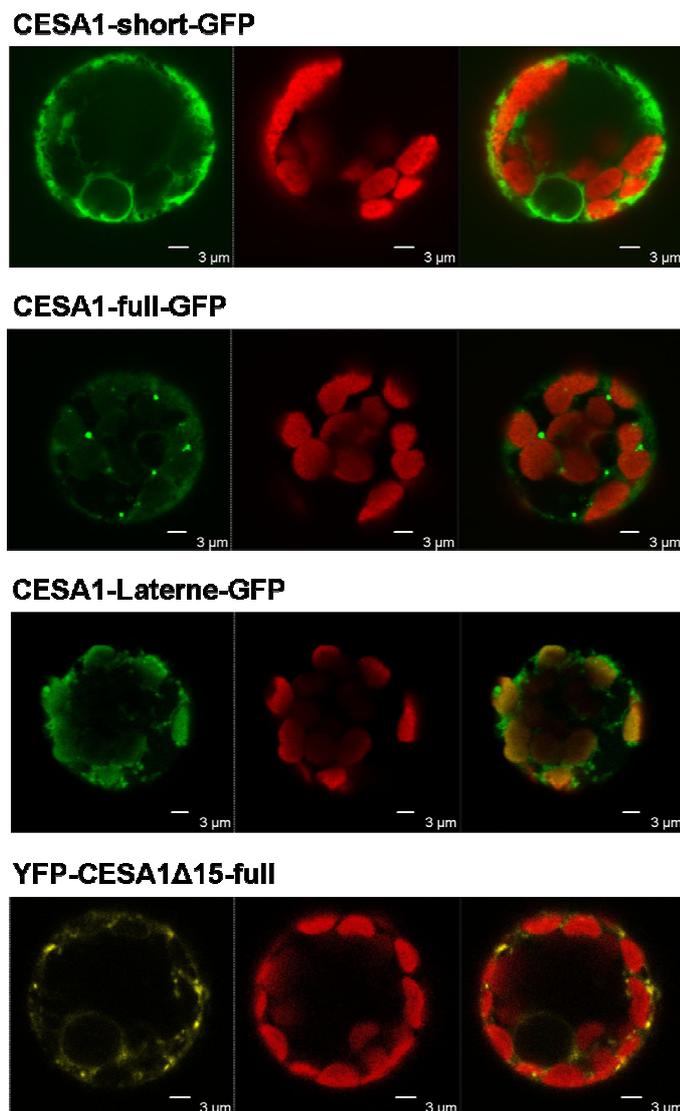


Abb. 3.2: cLSM-Aufnahmen zur Lokalisation der GFP/YFP-CESA1-Konstrukte in Arabidopsis-Protoplasten. Dargestellt sind jeweils die Aufnahmen eines medialen Schnittes durch einen Protoplasten. Die Fluoreszenz der CESA1-Konstrukte ist in grün bzw. gelb und die Eigenfluoreszenz der Plastiden in rot gezeigt. Das letzte Bild in der Reihe zeigt die Überlagerung der beiden ersten Bilder. Die Aufnahmen wurden 20-24 Stunden nach Transformation aufgenommen. Skala: 3 μ m

Die Expression von CESA1-full-GFP in Protoplasten führte zur Akkumulation des grünfluoreszierenden Proteins in punktförmigen Strukturen, die über die gesamte Zelle

verteilt waren. Zusätzlich zeigten sich auch die netzartigen Strukturen wie bei CESA1-short-GFP, jedoch war diese Fluoreszenz nicht so stark ausgeprägt. CESA1-full-GFP scheint damit im Sekretorischen System über das ER hinaus in den Golgi-Apparat zu gelangen, da die fluoreszierenden Punkte von Größe (ca. 1 μm im Durchmesser) und Verteilung auf den Golgi-Apparat schließen lassen. Außerdem zeigten diese Punkte die für den Golgi-Apparat typischen *stop-and-go*-Bewegungen (Nebenführ et al., 1999). YFP-CESA1- Δ 15-full zeigte ähnlich dem CESA1-full-GFP-Konstrukt netzartige und punktförmige Strukturen.

Die Fluoreszenz des CESA1-Laterne-GFP-Konstruktes sollte auf Grund der Konformation nach korrekter Integration in die Plasmamembran extrazellulär vorliegen. Es zeigte sich jedoch, dass die Fluoreszenz in Form von Punkten innerhalb der Zelle zu detektieren war (Abb. 3.2, Reihe 3 von oben). Zusätzlich wurde in allen transformierten Zellen eine Fluoreszenz der Plastiden, die nicht der Eigenfluoreszenz entsprach, detektiert. Eine solche Fluoreszenz deutet darauf hin, dass sich die Zelle in einem schlechten physiologischen Zustand befindet (Beobachtungen der Mitarbeiter der AG von Schaewen). Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte mit dem Konstrukt CESA1-Laterne-GFP nur eine sehr geringe Transformationseffizienz erreicht werden, wodurch von einer weiteren Untersuchung abgesehen wurde.

Innerhalb dieser Untersuchungen kann eine genaue Lokalisation der Fusionsproteine in der Zelle noch nicht zweifelsfrei geklärt werden, da die Protoplasten nicht zusätzlich mit einem Markerkonstrukt für bestimmte Zellorganelle, wie z. B. das ER, co-transformiert wurden. Die Ergebnisse solcher Co-Lokalisationsstudien sind in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

3.1.2 Lokalisations-Studien von CESA1 mit Markerkonstrukten für das Sekretorische System

Die Co-Expressionsstudien sollten die in Kap. 3.1.1 vermuteten Lokalisationen der CESA1-Konstrukte bestätigen. Als Markerkonstrukte wurden ein ER-Marker, ein Golgi-Marker und ein Marker für die Plasmamembran verwendet. Der ER- und Golgi-Marker wurde von Stephan Rips im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Antje von Schaewen hergestellt. Der ER-Marker setzt sich aus der ER-Signalsequenz einer vakuolären Chitinase aus *Arabidopsis thaliana* (Haseloff et al., 1997), der OFP-Sequenz und dem ER-Retentionssignal HDEL zusammen. Der Golgi-Marker ist ein Volllängen-Konstrukt der GNTI aus *Arabidopsis*, welches N-terminal an das OFP fusioniert wurde (CGL1-OFP). Stephan Rips konnte für diese Marker eine Lokalisation in den jeweiligen Kompartimenten bestätigen (Stephan Rips, Diplomarbeit 2005). Der Marker für die Plasmamembran setzt sich aus dem

Protein KORRIGAN, das N-terminal mit OFP fusioniert wurde, zusammen und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

In Abb. 3.3 sind die Co-Expressionen von CESA1-short-GFP mit dem ER- bzw. Golgi-Marker gezeigt. In den Abbildungen repräsentiert die grüne Fluoreszenz das CESA1-short-GFP, die orangefarbene Fluoreszenz (magentafarben dargestellt) den jeweiligen Marker für das Zellkompartiment und die rote Fluoreszenz die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls. Die letzten beiden Bilder der Reihe sind Überlagerungen der Einzelbilder, um eine Co-Lokalisation zu verdeutlichen. Eine Co-Lokalisation bzw. eine sehr nahe Lokalisation von zwei verschiedenfarbigen Fluoreszenzen, die maximal 150 nm voneinander entfernt auftreten, werden durch die Software des Mikroskops als weiße Pixel angezeigt. In Abb. 3.3A sind die Ergebnisse der Co-Expression von CESA1-short-GFP mit dem ER-Marker dargestellt. Im linken Bild ist die Fluoreszenz von CESA1-short-GFP zu sehen, die sich netzförmig durch die Zelle zieht und auch um den Zellkern zu detektieren ist. Das mittlere Bild in der Reihe zeigt die Fluoreszenz des ER-Markers und befindet sich in den Bereichen der Zelle, in der auch das CESA1-Signal detektiert wurde. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale bestätigt eine Co-Lokalisation der beiden Konstrukte, was anhand der im Bild entstehenden weißen Bereiche deutlich zu sehen ist. Es gab jedoch auch einzelne Bereiche, in denen nur ER- oder CESA1-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte.

In Abb. 3.3B ist die Co-Expression von CESA1-short-GFP mit dem Golgi-Marker gezeigt. Die Expression des Golgi-Markers (Abb. 3.3B mittleres Bild) in Protoplasten führte zur Akkumulation des grünfluoreszierenden Proteins in punktförmigen Strukturen, die über die gesamte Zelle, aber meist in direkter Nähe zum ER, verteilt waren. Das CESA1-short-GFP-Konstrukt zeigte wieder eine netzförmige Struktur der Fluoreszenz (linkes Bild). Durch die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale konnte keine Co-Lokalisation der beiden Proteine festgestellt werden.

Das CESA1-full-GFP-Konstrukt wurde ebenfalls mit dem ER- und Golgi-Marker co-exprimiert (Abb. 3.4). Dabei zeigte CESA1-full-GFP sehr unterschiedliche Lokalisationen in der Zelle. So stellte sich die GFP-Fluoreszenz in Co-Expression mit dem ER-Marker sowohl als netzartige als auch als punktförmige Strukturen dar. Die netzartigen Strukturen zeigten mit dem ER-Marker weitgehend Übereinstimmung, während die grünfluoreszierenden Punkte keine Co-Lokalisation mit dem ER-Marker aufwiesen (Abb. 3.4A). Bei der Co-Expression mit dem CGL1-OFP wird eine Co-Lokalisation von CESA1-full-GFP mit den Golgi-Stapeln deutlich. Es gab jedoch auch einzelne orangefluoreszierende Punkte, die Golgi-Stapel darstellten, die aber keine grünfluoreszierenden Proteine enthielten (Abb. 3.4B).

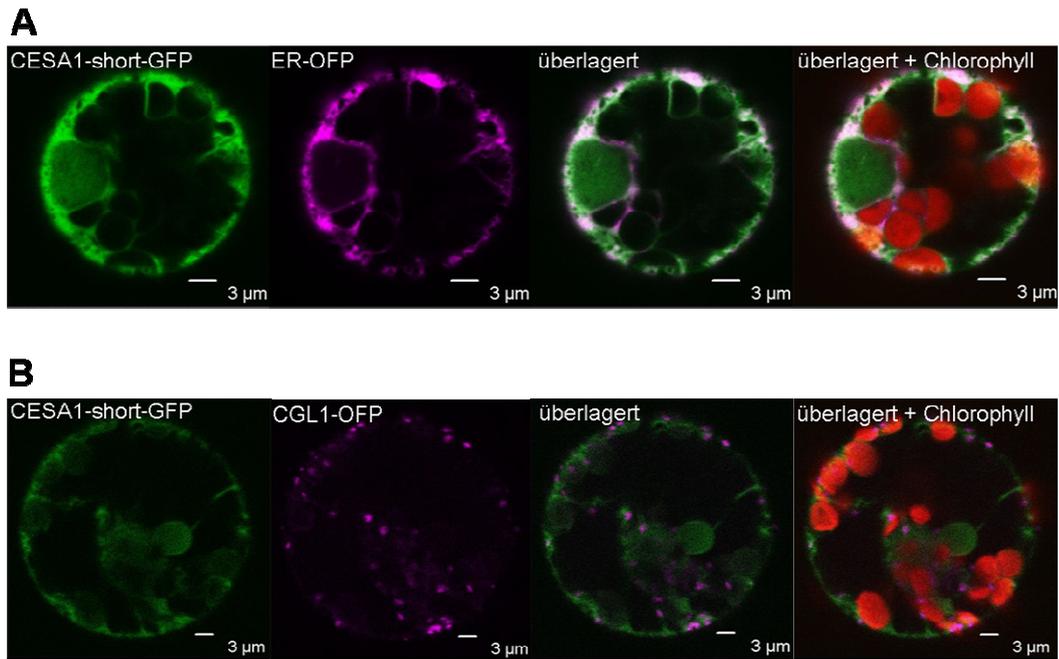


Abb. 3.3: Co-Expression von CESA1-short-GFP mit ER-OFP (A) und CGL1-OFP (B) in Tabak-Protoplasten. Dargestellt sind die Aufnahmen eines Schnittes durch einen Protoplasten und die Überlagerungen der Einzelaufnahmen. In die letzte Aufnahme ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls (rot) mit einbezogen. Die Fluoreszenz von CESA1-short-GFP ist in grün und die des Markers in magenta gezeigt. Co-Lokalisation wird durch die Software des Mikroskops als weiße Pixel angedeutet. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transformation aufgenommen. Skala: 3 µm

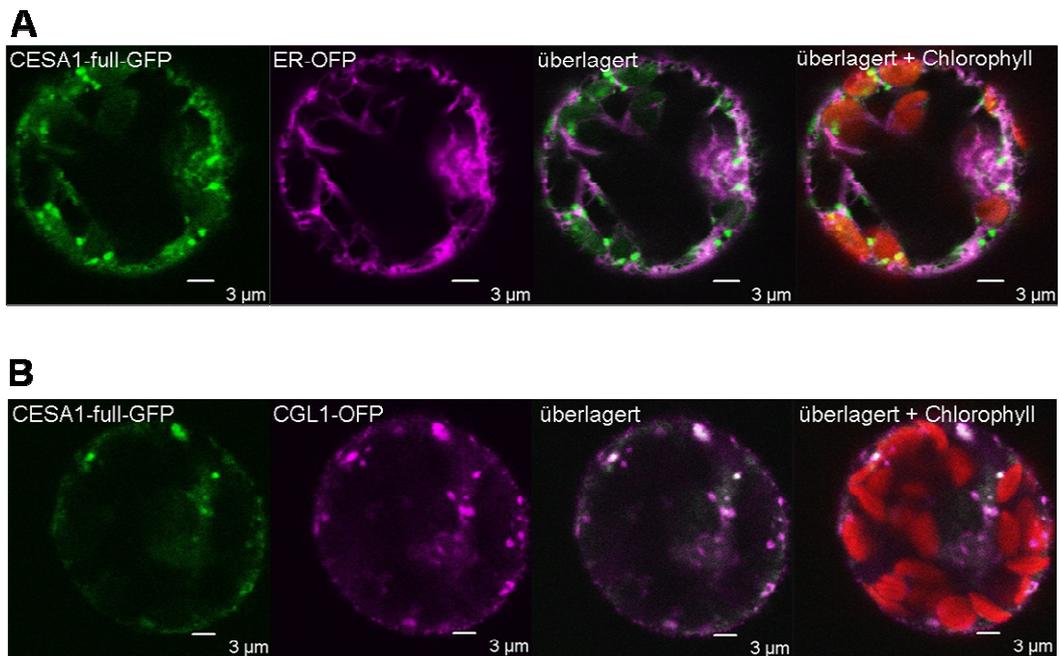


Abb. 3.4: Co-Expression von CESA1-full-GFP mit ER-OFP (A) und CGL1-OFP (B) in Tabak-Protoplasten. Dargestellt sind die Aufnahmen eines medialen Schnittes durch einen Protoplasten und die Überlagerungen der Einzelaufnahmen. In die letzte Aufnahme ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls (rot) mit einbezogen. Die Fluoreszenz von CESA1-full-GFP ist in grün und die des Markers in magenta gezeigt. Co-Lokalisation wird durch die Software des Mikroskops als weiße Pixel angedeutet. Die Aufnahmen wurden 48 Stunden nach Transformation aufgenommen. Skala: 3 µm

Als Plasmamembran-Marker wurde das Fusionsprotein von KORRIGAN (KOR1) und OFP herangezogen. KOR1 ist ein membranverankertes Enzym, das bei der Zellwandsynthese eine

wichtige Rolle spielt. Peng et al. veröffentlichten 2002 die mögliche Funktion dieser Endoglucanase, die für die Weiterreichung des Glucose-Primers an die Cellulosesynthase zuständig sein soll. Die Cellulosesynthase nutzt den Primer, um diesen zu verlängern und so die Cellulosekette synthetisieren zu können. Im Kapitel 3.1.1 ist die Lokalisation der CESA1-Konstrukte in Protoplasten beschrieben und keines dieser CESA1-Konstrukte scheint in detektierbarer Menge an die Plasmamembran zu gelangen.

Bei der Co-Expression von CESA1-short-GFP mit KOR1-OFP konnte keine Co-Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Das KOR1-OFP-Signal war an der Peripherie der Zelle zu detektieren, ebenso das CESA1-short-Konstrukt, jedoch kam es zu keiner Co-Lokalisation, was durch die Trennung der Fluoreszenzen in der Überlagerung deutlich wird. KOR1-OFP ist als fluoreszierender Rand bei dem medialen Schnitt durch den Protoplasten zu sehen, während die GFP-Fluoreszenz von CESA1-Short zwar ähnliche Strukturen aufwies, aber weiter innen in der Zelle lokalisierte. Eine deutliche Trennung der beiden Fluoreszenzfarben ist zu beobachten.

Das KOR1-OFP-Konstrukt wurde auch mit CESA1-full-GFP co-exprimiert (Abb. 3.6) und dort zeigten sich ähnliche Ergebnisse. CESA1-full-GFP zeigt in der Abb. 3.6A eine netzartige Fluoreszenz mit vereinzelt Punkten außerhalb der netzartigen Struktur. KOR1-OFP ist hauptsächlich peripher lokalisiert, es wird aber auch innerhalb der Zelle Fluoreszenz detektiert. In Abb. 3.6B ist die Aufsicht auf einen Protoplasten dargestellt und hier wird ersichtlich, dass KOR1-OFP außen an der Plasmamembran vorliegt, wohingegen die grüne Fluoreszenz von CESA1-full-GFP innerhalb der Zelle anzutreffen ist. An wenigen Stellen könnte eine Co-Lokalisation vorhanden sein, welche durch weiße Pixel zu erkennen ist.

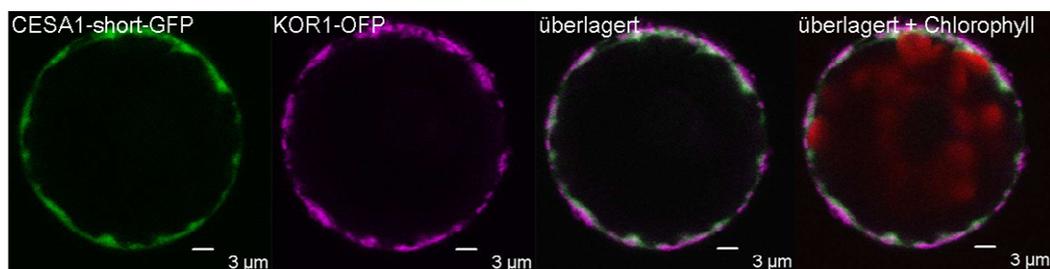


Abb. 3.5: Co-Expression von CESA1-short-GFP und KOR1-OFP in Tabak-Protoplasten. Dargestellt sind die Aufnahmen eines medialen Schnittes durch einen Protoplasten und die Überlagerungen der Einzelaufnahmen. In die letzte Aufnahme ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls (rot) mit einbezogen. Die Fluoreszenz von CESA1-short-GFP ist in grün und KOR1-OFP in magenta gezeigt. Co-Lokalisation wird durch die Software des Mikroskops als weiße Pixel angedeutet. Die Aufnahmen wurden 48 Stunden nach Transformation aufgenommen. Skala: 3 µm

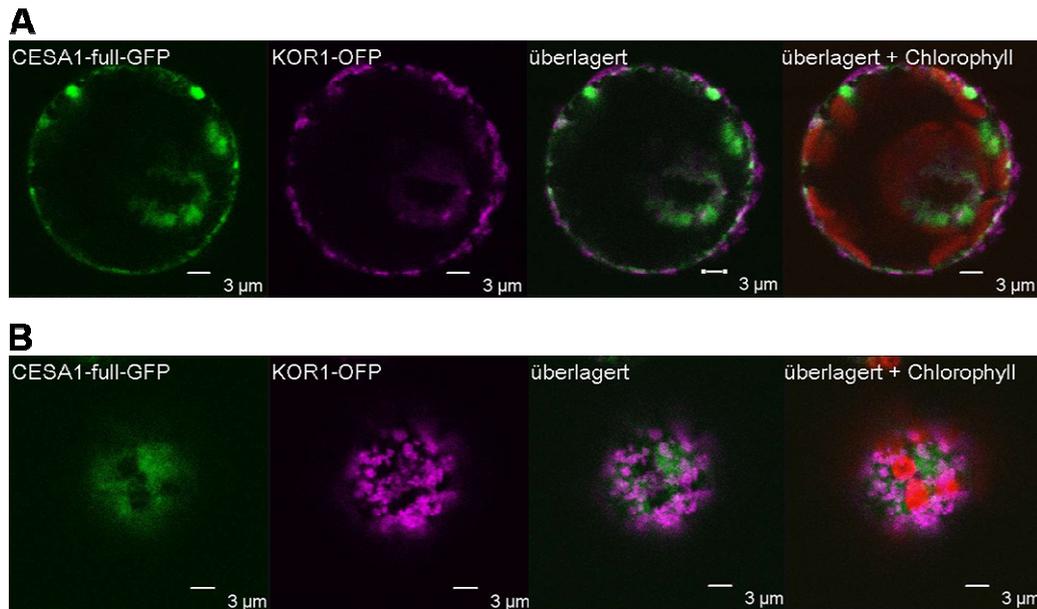


Abb. 3.6: Co-Expression von CESA1-full-GFP und KOR1-OFP in Tabak-Protoplasten. Dargestellt sind die Aufnahmen eines Schnittes durch einen Protoplasten (A) und die Aufsicht auf einen Protoplasten (B). In die letzten Aufnahmen ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls (rot) mit einbezogen. Die Fluoreszenz von CESA1-short-GFP ist in grün und KOR1-OFP in magenta gezeigt. Co-Lokalisation wird durch die Software des Mikroskops als weiße Pixel angedeutet. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transformation aufgenommen. Skala: 3 µm

3.2 Hefe-2-Hybrid-Analyse mit der cytosolischen Domäne der Cellulosesynthase A1

Das Hefe-2-Hybrid-System ermöglicht die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren (in diesem Fall der GAL4-Transkriptionsfaktor) aus zwei diskreten und physisch trennbaren Domänen bestehen: einer DNA-Bindedomäne (BD) und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Durch Fusion des cytosolischen *loops* der Cellulosesynthase A1 mit der Bindedomäne (*bait*) und einer cDNA-Bank mit der Aktivierungsdomäne (*prey*) konnten Interaktionspartner aus dem gesamten Pool der exprimierten Arabidopsisgene identifiziert werden. Interagieren die Fusionsproteine miteinander, kann durch die Wiederherstellung des Transkriptionsfaktors eine positive Interaktion der Proteine durch Wachsen auf selektivem Medium und mittels Blaufärbung der Hefekolonien nachgewiesen werden. In dieser Arbeit erfolgte der *screen* gegen eine cDNA-Bank aus Arabidopsis (drei Tage alte, etioliert angezogene Keimlinge), die in den Vektor pACT integriert wurde (Kim et al., 1997).

Die Sequenz des cytosolischen *loops* (mit einer Länge von 269 Aminosäuren) wurde über die Schnittstellen NdeI und BamHI in den Vektor pGBKT7 inseriert, in den Hefestamm Y190 transformiert und die Transformanten auf Agar-Platten ohne Tryptophan selektioniert. Die optimale 3-AT-Konzentration wurde für das Konstrukt pGBKT7-CESA-*loop* mit 20 mM

ermittelt (siehe Kapitel 2.7.3). Bei dieser 3-AT-Konzentration wurde der Histidin-Promotor, der eine Restaktivität zeigte, erfolgreich unterdrückt, so dass die Selektion auf Histidin nur durch eine Interaktion möglich war.

Für den *screen* wurden die Hefezellen, die mit dem Konstrukt pGBKT7-CESA-*loop* bereits transformiert waren, kompetent gemacht und mit der cDNA-Bank co-transformiert. Positive Hefeklonen wurden auf selektiven Platten angezogen (siehe Kapitel 2.7.4). Letztlich wurden aus den primären Klonen 51 Klone identifiziert, die nach dem Filter-Lift-Assay (Wiederherstellung des Transkriptionsfaktors aktiviert eine Galactosidase, die X-Gal in einen blauen Farbstoff umwandeln kann) eine positive Interaktion vermuten ließen. In Abb. 3.7A ist ein solcher Filter exemplarisch dargestellt. Die Kolonien 1, 4, 6, 7, 8 und 9 zeigen mögliche positive Interaktionen der beiden Proteine, was durch die Blaufärbung der Hefekolonien sichtbar wird. Des Weiteren sind drei Beispiele der Kolonie-PCR gezeigt, die mit den isolierten AD-Plasmiden durchgeführt wurden (Abb. 3.7B). Dafür wurden die AD-Plasmide aus den Hefezellen isoliert und in *E. coli*-Zellen transformiert. Mit den *E. coli*-Kolonien wurde eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar pACT_F+pACT_R durchgeführt, um auf die Anwesenheit eines cDNA-Fragmentes im AD-Vektor zu testen.

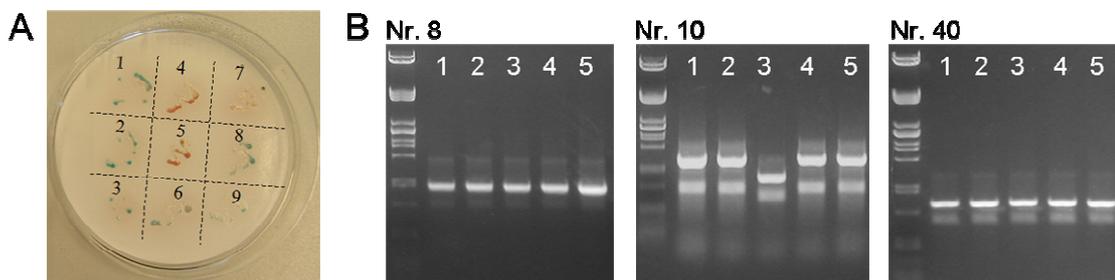


Abb. 3.7: Beispiele der Auswertung der Hefe-2-Hybrid-Analyse mit pGBKT7-CESA1-*loop* als *bait*. A) Filter eines Filter-Lift-Assays auf dem die Blaufärbung der aufgebrochenen Hefezellen auf eine mögliche Interaktion schließen lässt. B) Kolonie-PCR der *E. coli*-Zellen, die mit den aus Hefen isolierten AD-Plasmiden transformiert wurden. Bei der Nummer 10 sind verschiedene AD-Plasmide in die Hefe aufgenommen worden, daher zeigt 10.3 eine andere Insertgröße als die vier anderen Plasmide.

Zudem ist es möglich, dass Hefezellen mehr als ein Plasmid bei der Transformation aufnehmen. Daher wurden mehrere *E. coli*-Kolonien für die Kolonie-PCR gewählt, um auszuschließen, dass nur ein Plasmid untersucht wird, obwohl zwei Plasmide ursprünglich in der Hefezelle vorhanden waren. Bei Klon Nr. 10 wird sichtbar, dass die Hefezelle mehr als ein AD-Plasmid aufgenommen hatte, denn das Plasmid aus der *E. coli*-Kolonie 10.3 enthält eine andere Insertgröße als die anderen Kolonien (10.1-2 und 10.4-5). Da es sich um eine Kolonie-PCR handelt, sind neben den Hauptbanden auch noch andere schwächere

Nebenbanden zu beobachten, die jedoch nicht weiter beachtet wurden, da sie bei allen PCR auftraten.

Die primär positiven 51 Kolonien wurden mit der Methode des *Mini-matings* weiter untersucht. So zeigte sich bei der Analyse durch das *Mini-mating* bei der Kolonie 10.3 mit dem Filter-Lift-Assay keine Blaufärbung mehr. Somit war die Blaufärbung der Hefekolonie 10 auf das AD-Plasmid, das z. B. durch die *E. coli*-Kolonie 10.1 repräsentiert wird, zurückzuführen. Die Ergebnisse der anschließenden Sequenzierung der AD-Inserts sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Sequenzen der Klone wurden mit dem Programm BLAST analysiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Tab. 3.1: Ergebnis der 51 möglichen Interaktionspartner eines Hefe-2-Hybrid-screens mit dem CESA1-loop nach Mini-mating und Sequenzierung. Angegeben sind die Anzahl der identifizierten Klone, die Beschreibung des Proteins und die Identifikationsnummern der Gene.

Funktion im Stoffwechsel	Identifikationsnummer	Anzahl der Klone
Motorprotein	<i>kinesin light chain-related</i> - At4g10840	23
Regulationsfaktor	<i>general regulation factor 3</i> (GRF3) - At5g38480	2
Kohlenhydrat-Degradierung	<i>dark inducible 10</i> (DIN10) - At5g20250 (Raffinosesynthase)	2
Apoptose-Signalweg	<i>Bcl-2-associated athanogene 1</i> (BAG1) - At5g52060	1
Apoptose-Signalweg	<i>Bcl-2-associated athanogene 3</i> (BAG3) - At5g07220	1
	positive Reaktion mit dem leeren BD-Vektor	5
	keine Reaktion mehr im Mini-Mating	13
	kein eindeutiges Signal bei der Sequenzierung	4

Diese Ergebnisse zeigen fünf mögliche Interaktionspartner der Cellulosesynthase. Das *kinesin light chain-related*-Protein (KLC) wurde im Folgenden genauer analysiert, da dieses Protein 23-mal identifiziert wurde. Weiterhin wurden ein Regulationsfaktor (GRF3), zwei an der Apoptose beteiligten Proteine (BAG1/BAG3) und ein dem Zuckerstoffwechsel zugeordnetes Protein als mögliche Interaktionspartner von CESA1 ermittelt. Von den primär positiven Kandidaten zeigten 17 keine positiven Ergebnisse im Filter-Lift-Assay oder bei der Sequenzierung. Fünf Klone konnten eindeutig als falsch-positive Interaktionspartner identifiziert werden, da sie mit dem leeren BD-Vektor schon eine Blaufärbung beim Filter-Lift-Assay offenbarten.

3.2.1 Lokalisationsstudien von KinesinLC und CESA1

Die Häufigkeit des Auftretens einer Interaktion in den Hefe-2-Hybrid-Analysen zwischen KLC und CESA1-loop in der Hefe-2-Hybrid-Analyse war auffällig, und es wurden weitere Untersuchungen dieser Interaktion durchgeführt. Zur Bestätigung der möglichen Interaktion wurden Lokalisationsstudien der Proteine CESA1 und KLC mit Hilfe von XFP-Fusionsproteinen durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob KLC und CESA1 *in vivo* im gleichen Zellkompartiment nachzuweisen sind.

Verschiedene Vorhersageprogramme konnten die Lokalisation von KLC auf Basis der Aminosäuresequenz in der Zelle nicht eindeutig zuordnen. Das Programm Predator (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) trifft keine genaue Vorhersage (79% für „nicht definiert“, 19% für Chloroplasten, 2% für Mitochondrien und 1% für ER), eine Lokalisation in Chloroplasten wird von dem Programm chloroP vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) und das Signalpeptid mit einer Länge von 65 Aminosäuren angegeben.

Auf Grund dieser ungenauen Vorhersage wurde KLC sowohl N-terminal als auch C-terminal mit OFP fusioniert. Dieser Ansatz diente dazu, ein mögliches Signalpeptid nicht zu behindern. Eine Überexpression von KLC-OFP bzw. OFP-KLC in Tabakprotoplasten zeigt in beiden Fällen eine Lokalisation im Cytosol der Zelle und im Zellkern (Abb. 3.8).

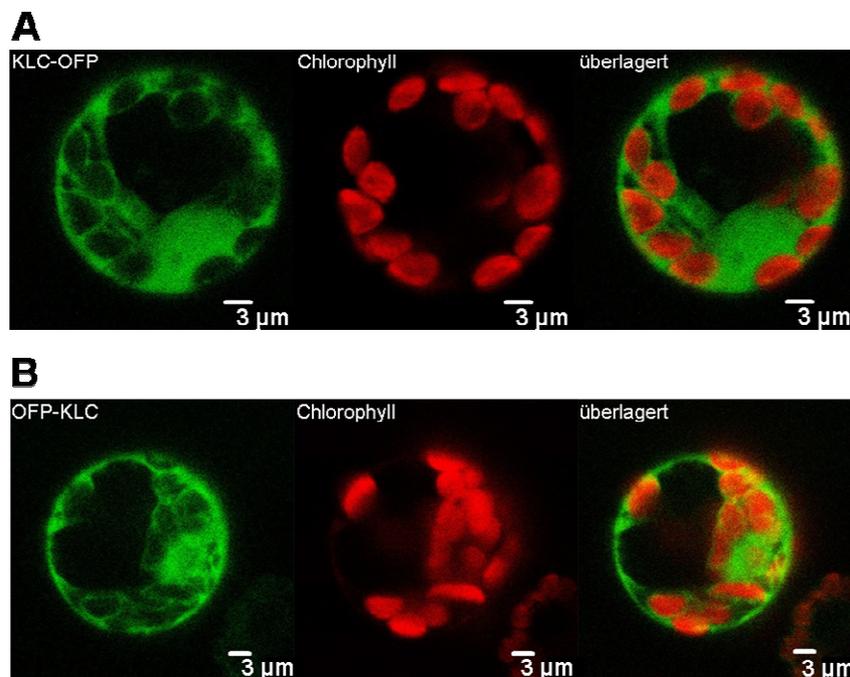


Abb. 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von KLC-OFP (A) und OFP-KLC (B) in Tabak-Protoplasten. Dargestellt sind die Aufnahmen eines Schnittes durch einen Protoplasten. Das erste Bild zeigt die Fluoreszenz des KLC-Konstruktes (grün), mittig die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls (rot) und zuletzt die Überlagerung der beiden ersten Bilder. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transformation gemacht. Skala: 3 µm

Da beide KLC-Konstrukte eine gleichmäßige Verteilung im Cytosol zeigten, wurde ein Co-Expressionsversuch durchgeführt, um evtl. eine Veränderung der Lokalisation zu beobachten, wenn KLC zusammen mit CESA1 in einer Zelle überexprimiert wird. Diese Co-Expressionsversuche wurden mit beiden KLC-Konstrukten und mit CESA1-full-GFP sowie YFP-CESA1- Δ 15-full durchgeführt. Die Ergebnisse beider CESA-Konstrukte zeigten keinen Unterschied, so dass nur eine Aufnahme exemplarisch gezeigt wird (Abb. 3.9). Die Fluoreszenz des CESA1-Konstruktes verteilte sich in netzartigen Strukturen und lokal auch in Punkten innerhalb der ganzen Zelle (ER und Golgi-Apparat). KLC war wie schon in den Versuchen ohne Co-Expression im Cytosol und im Zellkern lokalisiert. Die Überlagerung der beiden Kanäle ergab auch keine Co-Lokalisation der beiden Proteine.

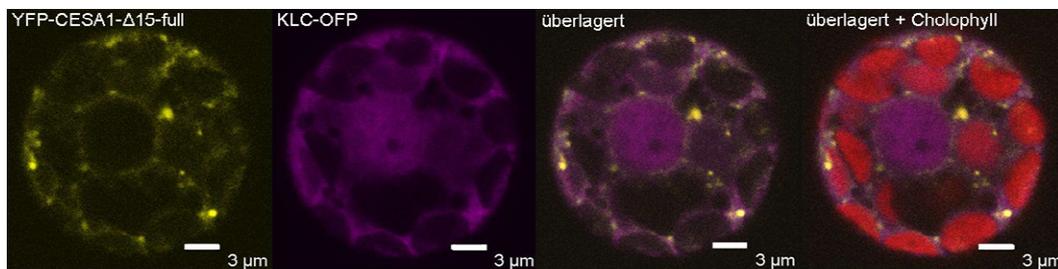


Abb. 3.9: Co-Expression von YFP-CESA1- Δ 15-full mit KLC-OFP in Tabak-Protoplasten. Dargestellt sind die Aufnahmen eines Schnittes durch einen Protoplasten und die Überlagerungen der Einzelaufnahmen. In die letzte Aufnahme ist die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls (rot) mit einbezogen. Die Fluoreszenz von YFP-CESA1- Δ 15-full ist in gelb und von KLC-OFP in magenta gezeigt. Co-Lokalisation wird durch die Software des Mikroskops als weiße Pixel angedeutet. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transformation gemacht. Skala: 3 μ m

Teil II

3.3 *cgli*-Mutanten und die Kreuzung in *stt3a-2*

Die Mutation im *cgli*-Gen ruft eine Unterbrechung der komplexen Glykosylierung im Golgi-Apparat hervor. Findet diese Unterbrechung früher, also im ER (z. B. durch Ausschalten der Oligosaccharyltransferase (OST)) statt, hat dies weitaus drastischere Ausmaße, denn die Pflanzen sind nicht lebensfähig. Die Mutation in der katalytischen OST-Untereinheit *stt3* (zwei Isoformen A und B) bewirkt nur eine ineffiziente Glykosylierung der Proteine und wirkt sich daher nicht tödlich auf die Pflanzen aus (Koiwa et al., 2003).

3.3.1 Mutationen in den *cgli*-Linien C5, C6 und *cgli-T*

Erste Mutanten der N-Acetylglucosaminyltransferase I in *Arabidopsis* wurden in von Schaewen et al. (1993) beschrieben. Die Identifikation der EMS (Ethylmethansulfonat)-Mutationslinien C5 und C6 erfolgte durch einen Antikörper der gegen komplexe Glykane (*cgly*-Antikörper; *cgly* – *complex glycan*) gerichtet ist und speziell die *core*-Fucose bzw. *core*-Xylose in pflanzlichen Glykanen erkennt. Die Untersuchung auf das Fehlen oder Vorhandensein der *core*-Zucker Xylose und Fucose wird im Folgenden als *nonstainer*-Test bezeichnet. Wenn der Antikörper nicht an den Glykanen binden kann, kann auf dem Blot durch den sekundären Antikörper keine Farbreaktion stattfinden, was zu keiner Färbung (*nonstaining*) führt. EMS erzeugt Punktmutationen in der DNA, meist wird dabei die Base Guanin (G) gegen die Base Adenin (A) ersetzt. In der C5-Linie hat diese Mutation in Exon 8 an der 1231. Base stattgefunden (Strasser et al., 2005; wurde aber auch unabhängig in unserer AG von Heidi Kaulfürst-Soboll gezeigt). Die C6-Mutante trägt die Punktmutation im 14. Intron, dort ist das 3'-Spleißsignal >gu...ag< in >gu...aa< mutiert. Die Mutation der C6-Mutante betrifft die Base 2556.

Die T-DNA-Insertionsmutante *cgli-T* wird im Kapitel 3.3.1.1 näher beschrieben. Sie zeigte, wie C5 und C6, keine Reaktion mit dem *cgly*-Antikörper (Abb. 3.11).

Den *Arabidopsis cgli*-Mutanten konnte erstmalig ein Phänotyp unter Salzstress zugeordnet werden (Kang et al., 2008). Bei Salzstress kam es zu reduziertem Streckungswachstum und gleichzeitig zum radialen Anschwellen der Wurzelspitze. Den gleichen Phänotyp wies auch die *stt3a-2*-Mutante unter Salzstress auf. Es wurde eine Kreuzung der *cgli*-Mutanten mit der *stt3a-2*-Mutante durchgeführt, um eine mögliche Verstärkung der Einzeleffekte mit oder ohne Salzstress zu erzielen.

3.3.1.1 Identifizierung der *cgl1-T*

Die Analyse der Arabidopsis-Mutante *cgl1-T* erfolgte zuerst über den *nonstainer*-Test. Durch diese Vorauswahl war homozygotes Saatgut vorhanden und es wurde nachträglich eine Analyse auf genomischer DNA-Ebene durchgeführt. Die Samen der Mutante (Ökotyp Columbia) werden im SALK-Institut unter der Bezeichnung SALK_073650 geführt. In der Abb. 3.10B ist das Ergebnis der PCR-Analyse dargestellt. Mit den genspezifischen Primern, die in der 5'- bzw. 3'-Region des Gens binden (siehe Abb. 3.10A), konnte nur ein Produkt in der WT-Kontrolle mit einer Größe von 3267 bp amplifiziert werden.

Die PCR mit den T-DNA-Primern ergeben bei den Wildtyp-Kontrollen kein Amplifikat. Die Primerkombination CGL1_F+RBa1 und CGL1_R+LBa1 zeigen als einzige Kombinationen ein Produkt mit Matrize *cgl1-T* mit den Größen von 2400 bp bzw. 1800 bp. Damit kann auch die genaue Orientierung der einfach inserierten T-DNA gezeigt werden.

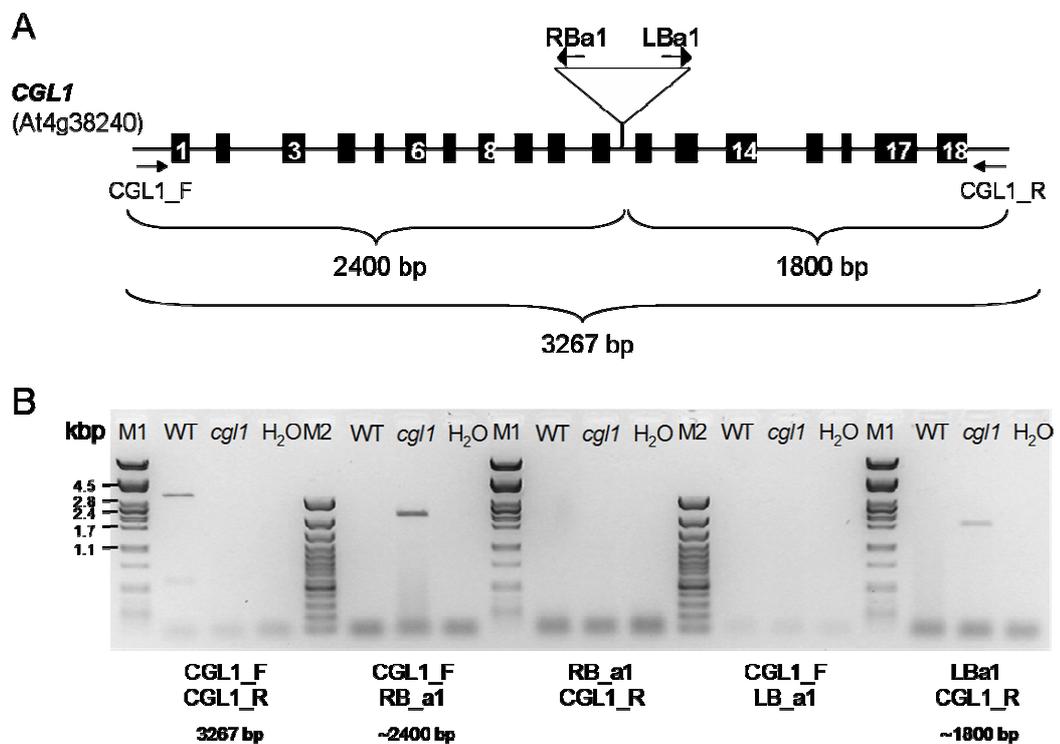


Abb. 3.10: Analyse der homozygoten *cgl1-T*-Mutante. A) Schematische Darstellung des *cgl1*-Gens mit den Primerbindestellen und der T-DNA-Insertion im 11. Intron. Die schwarzen Rechtecke stehen für Exons. Das Gen besteht aus 17 Introns und 18 Exons. B) PCR-Analyse mit den spezifischen Genprimern (links) und mit den genspezifischen Primern und den T-DNA-bindenden LBa1- bzw. RBa1-Primer (rechts).

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente ergab, dass die T-DNA-Insertion an der 1792. Base nach dem Start-ATG inseriert. Diese Stelle liegt im 11. Intron des Gens.

3.3.2 Kreuzung der *cgl1*-C6-Mutante in *stt3a-2*

Die Kreuzung der C6-Mutante erfolgte mit einer *stt3a-2*-Linie, in der ein BiP-GUS-Konstrukt vorhanden war. Das Konstrukt enthält ein Promotorfragment des *binding protein* (BiP), welches bei der *unfolded protein response* (UPR) durch Stress im ER induziert wird. Die Mutation in *stt3a-2* ruft eben diese UPR hervor (Koiwa et al., 2003) und bietet dadurch eine schnelle und einfache Identifizierung der *stt3a-2*-Mutation nach einer Kreuzung. Für diese Kreuzung wurden blühende C6-Pflanzen mit Pollen der *stt3a-2*-Pflanzen bestäubt und bis zur Samenreife kultiviert. In der folgenden Analyse der F1-Generation wurde ein Dot-Blot von Blattextrakten durchgeführt. Bei allen Individuen, die mit dem Antikörper reagierten, konnte so der Nachweis einer erfolgreichen Einkreuzung von *stt3a-2* in die C6-Pflanzen gezeigt werden. Diese Pflanzen durften selbst und die Samen wurden nach Sterilisierung auf MS-Medium angezogen. Wurzeln der sich aus diesen Samen entwickelnden Pflanzen wurden auf die Mutation im *stt3a*-Allel untersucht (GUS-Test). Die positiv getesteten Pflanzen wurden zusätzlich noch mit dem *cgly*-Antikörper analysiert, um neben der GUS-Aktivität, die homozygote *cgl1*-Mutation nachzuweisen. Von 64 positiv getesteten GUS-Pflanzen zeigten 12 beim *nonstainer*-Test keine Färbung. Um abschließend zu kontrollieren, ob die *stt3a-2*-Mutation ebenfalls homozygot vorliegt, wurde genomische DNA der 12 *nonstainer*-Pflanzen isoliert und mittels PCR die *stt3a-2*-T-DNA-Insertion nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass 4 der 12 *nonstainer*-Pflanzen homozygot für *stt3a-2* waren. Somit waren 4 Pflanzen aus 64 positiv homozygot für beide Mutationen, was der Erwartung entsprach.

Die Doppelmutanten C5 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* wurden durch Kreuzung der Einzelmutanten in den Laboren von Prof. Hisashi Koiwa erzeugt.

3.3.3 Immunologische Analyse der *cgl1*-Mutanten und der *cgl1 stt3a-2*-Doppelmutanten

Die *cgl1*-Mutanten sind nicht in der Lage komplexe Glykane zu synthetisieren, wodurch der *cgly*-Antikörper, mit dessen Hilfe komplexe Glykane in Pflanzenextrakten nachgewiesen werden können, keine Immunreaktion bei diesen Proben zeigte. In Abb. 3.11 sind neben der WT-Kontrolle (Col) die *cgl1*-Einzelmutanten aufgetragen. Alle Mutanten konnte keine Immunreaktion mit dem *cgly*-Antikörper nachgewiesen werden. Die Mutation in der OST-Untereinheit STT3a bewirkt eine Unterglykosylierung der Proteine im ER (Koiwa et al., 2003). Bei der Kreuzung von *stt3a-2* in die *cgl1*-Linien wurde daher erwartet, dass auch die Doppelmutanten weiterhin keine komplexen Glykane mehr bilden können.

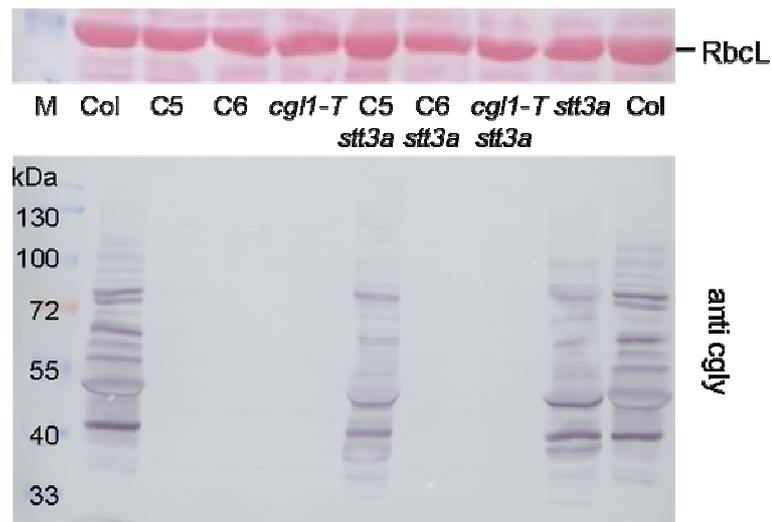


Abb. 3.11: *nonstainer*-Test der Einzel- und Doppelmutanten. Oben: PonceauS-Färbung des Blots (es ist nur die große Untereinheit der RubisCO (RbcL) dargestellt). Unten: Colorimetrische Blotentwicklung mit cgly-Antikörper. M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas), Col: Wildtyp Columbia, C5, C6: EMS-Mutanten der N-Acetylglucosaminyltransferase I, *cgl1-T*: T-DNA-Insertionslinie der N-Acetylglucosaminyltransferase I, *stt3a-2*: OST Untereinheit STT3a, und die jeweiligen Kreuzungen.

Während die Doppelmutanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2*, wie erwartet, mit dem cgly-Antikörper nicht reagierten und nicht in der Lage sind komplexe Glykane zu bilden, war bei der C5 *stt3a-2*-Doppelmutante jedoch eine deutliche Immunreaktion nachweisbar. Diese entsprach in Stärke und im Bandenmuster der Immunreaktion der *stt3a-2*-Elternpflanze, was auf Durchlässigkeit der *cgl1-C5*-Mutation in *stt3a-2* hindeutet (vergleiche Abb. 3.11) Spuren mit C5 *stt3a-2* und *stt3a-2*). Die Mutation in der *cgl1-C5*-Mutante generiert eine neue Glykosylierungsstelle im Protein.

Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Doppelmutante C5 *stt3a-2* anders und somit die *cgl1-C5*-Einzelmutanten in ihrer biochemischen Eigenschaft mit den anderen beiden *cgl1*-Mutanten nicht vergleichbar ist.

3.3.4 Phänotyp der *cgl1*-Mutanten und der *cgl1 stt3a-2*-Doppelmutanten

Da die Mutationen im *cgl1*-Gen keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, wurden die Doppelmutanten auf einen möglicherweise auftretenden Phänotypen untersucht. Die Samen wurden oberflächensterilisiert und nach dem Auskeimen auf Hartagarplatten umgesetzt, um die Keimlinge dann in vertikaler Position weiter anzuziehen.

In Abb. 3.12A ist eine Übersicht der Wuchsform der Pflanzen gezeigt. Hier sehen die Einzelmutanten und die C5 *stt3a-2*-Doppelmutante noch dem Wildtyp ähnlich. Die Doppelmutanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* zeigen jedoch einen Unterschied. Diese beiden Doppelmutanten haben ein verkürztes Wurzelwachstum und die Wurzeln weisen mehr

Verzweigungen auf. Die Wurzellängen der untersuchten Einzel- und Doppelmutanten sind in Form eines Diagramms zusammengefasst (Abb. 3.12B). Es konnte eine signifikante Reduktion der Wurzellänge um 10 - 15 mm (entspricht ca. 40%; mit Sternchen markiert) bei den beiden Doppelmutanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* nachgewiesen werden.

Bei den Detailaufnahmen der Wurzelhaarzone (Abb. 3.12C) zeigen sich weitere Unterschiede. Die Doppelmutanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* besitzen deutlich dünnere, dichtere und längere Wurzelhaare. Dies ist ansatzweise auch bei den Einzelmutanten C6 und *cgl1-T* zu beobachten, während die Wurzelspitze der C5 und *stt3a-2*-Mutanten eine dem Wildtyp ähnliche Form aufweisen.

Zur detaillierteren Analyse wurden die Keimlinge mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) untersucht (Abb. 3.13). Dafür wurden Keimlinge vom WT, *stt3a-2*, *cgl1-T* und *cgl1-T stt3a-2* mittels aufsteigender Ethanol-Reihe getrocknet und mit Gold beschichtet. Die Aufnahmen des REM bestätigen die Ergebnisse der Detailaufnahmen und zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen der Wurzelspitze mit den Wurzelhaaren des Wildtyps und der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2*, die eine abweichende Wurzelhaaranatomie aufweist. Beim Vergleich der Keimlinge in der Übersicht, zeigt die Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* eine gedrungenerere Wuchsform, vor allem im Bereich der Wurzel erscheint der Keimling kürzer. Die Blattoberfläche und der Sprossvegetationspunkt zeigen keine Unterschiede zum WT. Auch konnten keine Unterschiede der Trichome nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Aufnahmen wird bestätigt, dass die Doppelmutante eine größere Anzahl von Wurzelhaaren aufweist und diese dünner und länger sind als die Wurzelhaare beim WT.

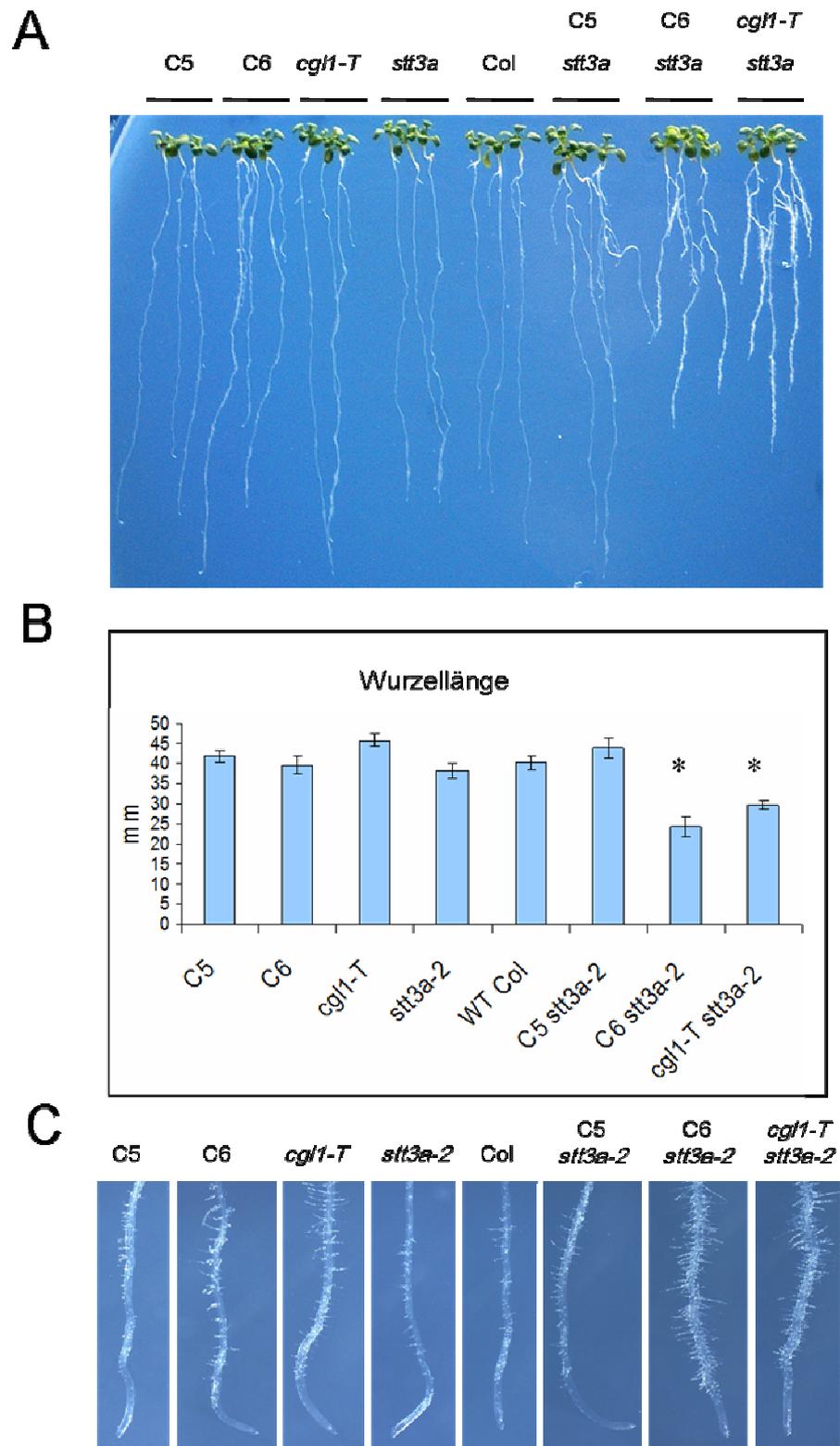


Abb. 3.12: Wurzelphänotyp der Arabidopsis Einzel- und Doppelmутanten. A) Keimlinge nach 5 Tagen auf Hartagarplatten. B) Säulendiagramm der Wurzellänge nach 5 Tagen Wachstum (n=9), signifikante Wurzellängenreduktion der beiden Doppelmутanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* sind mit Sternchen markiert. C) Detailaufnahmen der Hauptwurzelspitzen, der auf Hartagarplatten angezogenen Keimlinge.

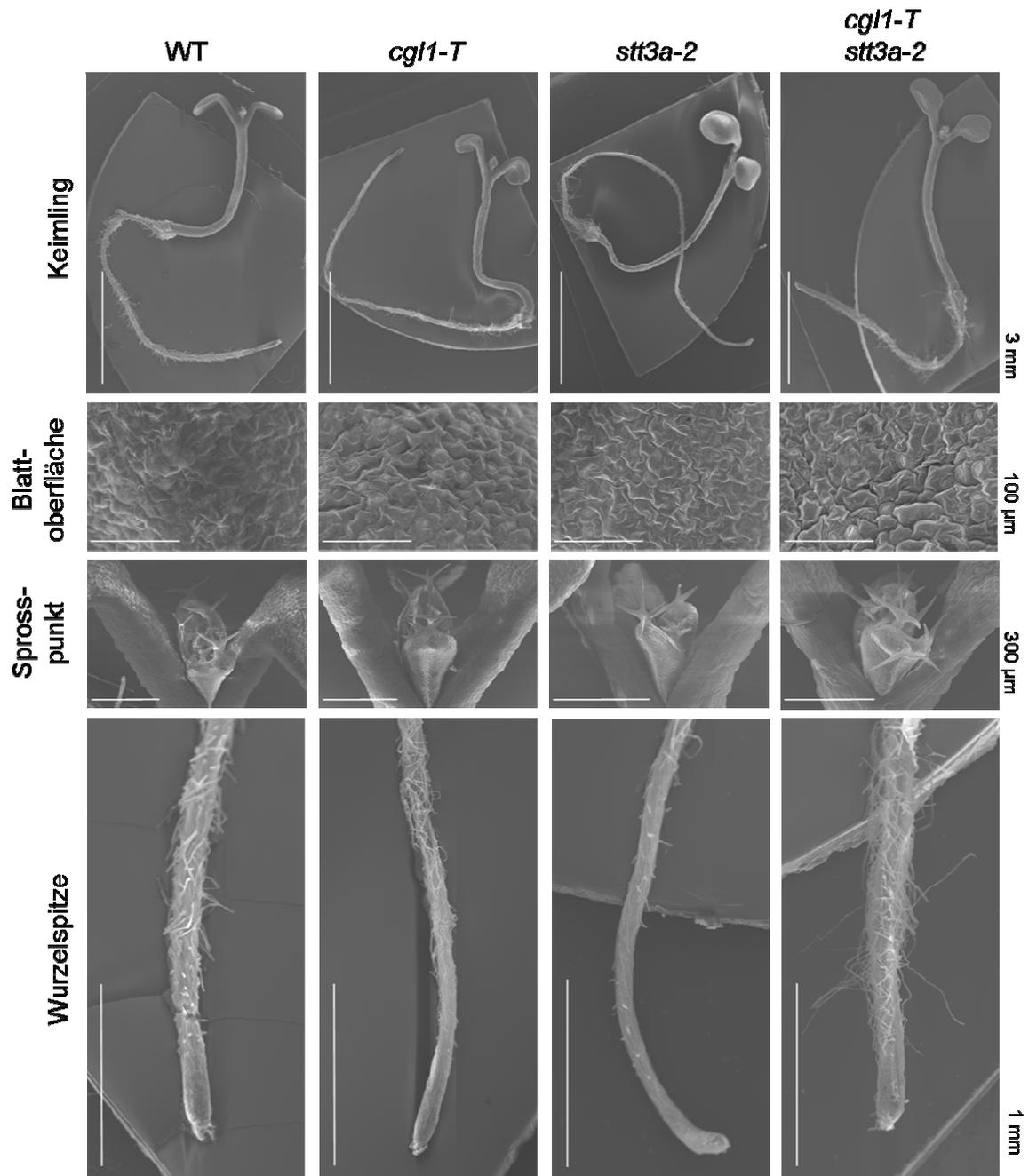


Abb. 3.13: REM-Aufnahmen der Arabidopsis-Einzelmutanten *cgl1-T* und *stt3a-2* und der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* sowie des Wildtyps. Abgebildet sind jeweils die ganzen Keimlinge und daraus die Vergrößerungen der Blattoberfläche, des Sproßvegetationspunktes mit den ersten Trichomen und der Wurzelspitzen.

3.3.5 mRNA-Analyse der *cgII*-Mutanten

Durch das überraschende Ergebnis, dass die C5 *stt3a-2*-Doppelmutante *stainer* ist, war zur genaueren Charakterisierung der *cgII*-Einzelmutanten die Analyse auf mRNA-Ebene sinnvoll. Durch Wenderoth und von Schaewen (2000) konnte in den EMS-Mutanten *cgII*-mRNA nachgewiesen werden. Auch in der *cgII-T* ist *cgII*-mRNA detektierbar. Die T-DNA-Insertion im 11. Intron wird durch Spleißen nicht entfernt, da mit T-DNA-Primern (binden auf der *left border* bzw. *right border* der T-DNA: LBa1 und RBa1) und spezifischen *cgII*-Primern (binden im UTR: 5' _F und 3' _R) ein PCR-Produkt entsteht, wenn cDNA als Matrize genutzt wird (Abb. 3.14). Das PCR-Produkt der Primerkombination RBa1 und 5' _F hat eine Größe von ungefähr 1130 bp. Diese Größe ist auf das Stück cDNA mit 770 bp (vom 5'-Primer bis zur T-DNA-Insertionsstelle) und 360 bp der T-DNA (vom Beginn der T-DNA bis zum T-DNA-Primer) zurückzuführen. Bei der Primerkombination LBa1 und 3' _R entspricht die Bande in der Größe von 1180 bp dem cDNA-Stück (735 bp, vom 3'-Primer bis zur T-DNA-Insertionsstelle) und dem T-DNA-Stück (440 bp, vom Beginn der T-DNA bis zum T-DNA-Primer). Durch diese Größen ist eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen, da die PCR-Banden sonst, aufgrund des Vorhandenseins von mehreren Introns, größer ausfallen würden.

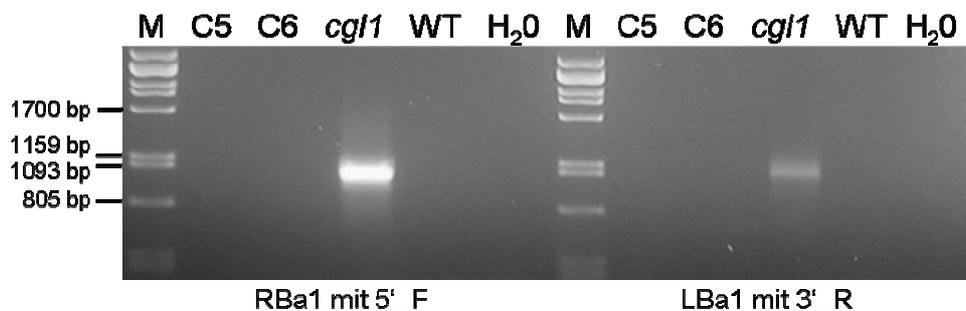


Abb. 3.14: RT-PCR mit T-DNA-bindenden Primern (RBa1 und LBa1) und *cgII*-Primern. Mit T-DNA-Primern amplifizierte DNA-Fragmente auf cDNA der *cgII-T*-Mutante. C5, C6: EMS-Mutationslinien der N-Acetylglucosaminyltransferase I, *cgII*: *cgII-T*, T-DNA-Insertionslinie der N-Acetylglucosaminyltransferase I. M: Größenstandard λ DNA/PstI (MBI Fermentas)

Des Weiteren wurden RT-PCR mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt, mit denen gezeigt werden konnte, dass in allen Mutanten *cgII*-mRNA vorhanden ist (Abb. 3.15).

Als Kontrolle für eine erfolgreiche RT-Reaktion diente eine RT-PCR mit *CESA1*-Primern (Abb. 3.15, unten), die in den einzelnen Proben ein einheitliches Produkt ergab.

Zur Verdeutlichung der Primerkombinationen und ihre Lage auf der cDNA in den RT-PCR-Untersuchungen ist in Abb. 3.15 oben die genomische Struktur des *CGLI*-Gens aufgezeigt. Die Primerkombination, die vor der *cgII-T*-DNA-Insertion binden (*CGLI1_F+Ex3_R*),

offenbaren, dass in den Mutanten und im WT 5'-mRNA vorhanden ist. Eine die Insertionsstelle flankierende Primerkombination (Ex6_F+Ex12_R) konnte für C5, C6 und WT eine Bande amplifizieren. Bei *cgl1-T* konnte jedoch kein PCR-Produkt amplifiziert werden, auch nicht nach verlängerter Extensionszeit und unter Zuhilfenahme anderer Taq-Polymerasen.

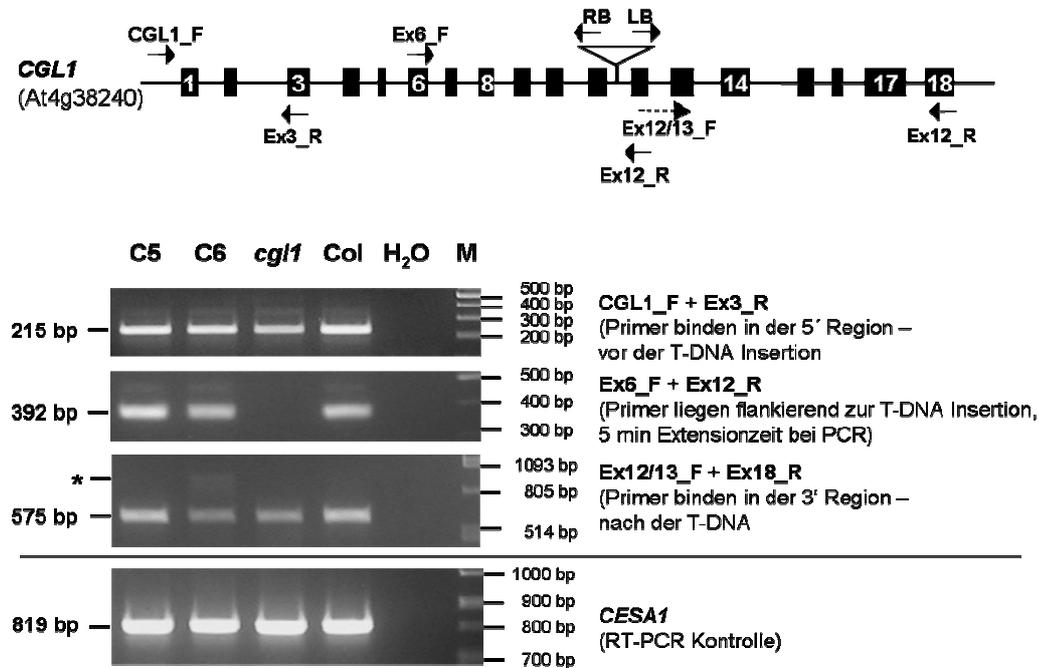


Abb. 3.15: RT-PCR Analyse der *cgl1*-Mutanten. Oben ist die genomische Struktur von *CGL1* mit den in den PCR-Ansätzen verwendeten Primern und darunter die mit RT-PCR amplifizierten Banden auf einem Agarosegel dargestellt. Als Kontrolle der RT-Reaktion diente eine RT-PCR mit *CESA1*-Primern, dessen Amplifikate in der untersten Zeile zu sehen sind. C5, C6: EMS-Mutationslinien der *CGL1* (codiert für N-Acetylglucosaminyltransferase I), *cgl1*: *cgl1-T*, T-DNA-Insertionslinie in *CGL1*. M: Größenstandard (MBI Fermentas)

Weiter konnte gezeigt werden, dass in allen Mutanten der 3'-Bereich der *cgl1*-mRNA vorhanden ist (Primerkombination Ex12/13_F+Ex18_R in Abb. 3.15). Allerdings erscheint das Produkt bei C6 und *cgl1-T* schwächer als bei C5 und WT. In der Probe C6 ist zusätzlich zur 575 bp-Bande auf Höhe von ca. 900 bp eine weitere, unscharfe Bande zu sehen, die in der Abb. 3.15 mit einem Sternchen markiert ist.

Mit dem Intron 14-Primer (In14_F) konnte in den Proben C5 und WT kein Produkt gewonnen werden (Abb. 3.16), somit ist in der mRNA von C5 und WT das Intron 14 nicht vorhanden. In den beiden Mutanten C6 und *cgl1-T* erscheinen aber, je nach Primerkombination, eine Vielzahl von Banden.

Mit der Primerkombination In14_F+Ex18_R sind oberhalb einer Hauptbande bei 534 bp noch weitere Banden zu sehen. Durch Verwendung von Exon-überspannenden Primern (Ex16/17_R und Ex17/18_R) konnte diese unscharfe Bande weiter aufgelöst werden. Mit der

Primerkombination In14_F+Ex16/17_R sind zwei Banden bei ca. 249 bp und 324 bp zu erkennen. Wird der Antisense-Primer um ein weiteres Intron in Richtung 3'-Bereich verlegt (Kombination In14_F+Ex17/18_R), dann zeigt sich eine zusätzliche Bande bei den Proben C6 und *cgll-T*, mit einer Größe von 594 bp.

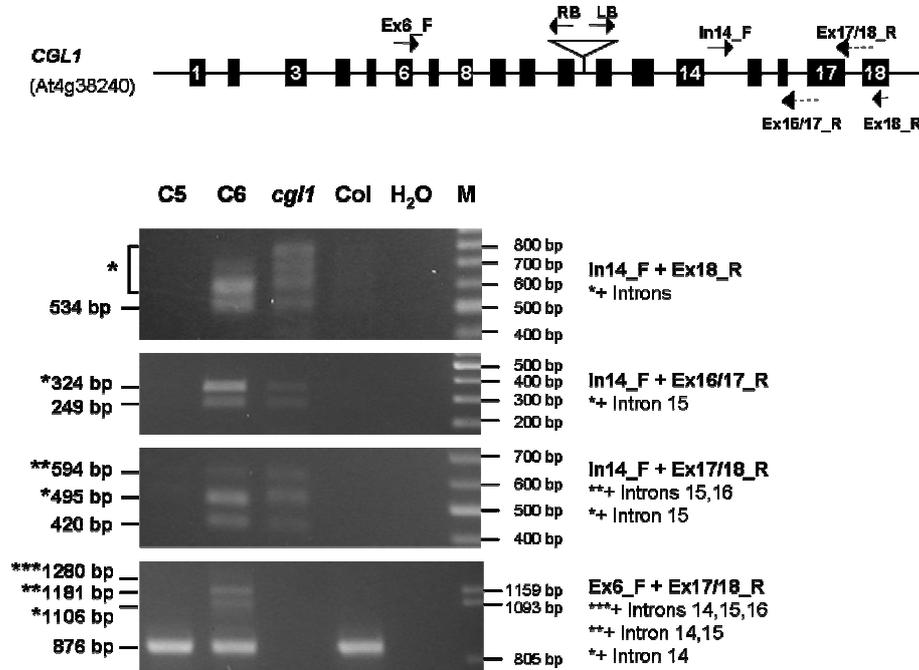


Abb. 3.16: RT-PCR Analyse der *cgll*-Mutanten mit dem Intron 14-Primer und verschiedenen Antisense-Primern. Oben ist die genomische Struktur von *CGL1* mit den in den PCR-Ansätzen verwendeten Primern und darunter die RT-PCR-Proben auf einem Agarosegel gezeigt. C5, C6: EMS-Mutationslinien der *CGL1* (codiert für N-Acetylglucosaminyltransferase I), *cgll*: *cgll-T*, T-DNA-Insertionslinie in *CGL1*. M: Größenstandard (MBI Fermentas)

Ganz unten in Abb. 3.16 ist das Ergebnis einer weiteren RT-PCR dargestellt, bei der Primer genutzt wurden, die bei C6 ein PCR-Produkt amplifizieren, das alle drei Introns (14.-15. Intron) innerhalb des Genabschnittes enthält. Bei der *cgll-T*-Mutante entsteht kein Produkt, da die Amplifikationszeit für die inserierte T-DNA zu kurz ist. Die Produkte der Proben C5 und WT entsprechen der erwarteten cDNA-Größe ohne Introns von 876 bp. Bei der Probe C6 entstehen mit diesem Primerpaar mehrere Banden. Jede Bande entspricht dabei der cDNA, die jeweils ein weiteres Intron enthält (mit Sternchen markiert).

3.3.5.1 Alternatives Spleißen der C6-mRNA

In Abb. 3.16 konnte mit dem Primerpaar Ex6_F+Ex17/18_R eine Hauptbande bei C6, die auf Höhe der WT-Bande liegt, amplifiziert werden. Wie in Kap. 3.3.1 gezeigt werden konnte, ist innerhalb der genomischen DNA der C6-Linie eine Mutation im Spleißsignal des 14. Introns von *CGL1* vorhanden. Um zu überprüfen, ob dieses cDNA-Fragment die Sequenz der WT-

cDNA aufweist, wurde diese Bande extrahiert und in den pBSK-Klonierungsvektor (Stratagene) kloniert. Die Sequenzierung des cDNA-Fragmentes ergab eine Rasterverschiebung um +1 (Sequenzierdaten im Anhang). Die Mutation in der C6-Linie liegt im 14. Intron und ändert das 3'-Spleißsignal >gu....ag< in >gu....aa<. Da in der Sequenz jedoch nach dem mutierten Adenin wiederum ein Guanin folgt, welches als alternatives Spleißsignal genutzt wird, kann das Intron erfolgreich gespleißt werden. Doch durch die Rasterverschiebung endet die Translation des C6-Proteins dann nach 13 zusätzlichen Aminosäuren in einem Stopp-Codon.

3.3.6 Lokalisationsstudien von KOR1 in *cgl1-T*, *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2*

Der Wurzelphänotyp der *cgl1*- und *stt3a-2*-Mutanten unter Salzstress gleicht auffällig dem *radial swelling*-Phänotyp von isolierten *rsw*-Mutanten, die direkt oder indirekt an verschiedenen Schritten der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. Das betroffene Gen in der Mutante *rsw1* codiert für die Untereinheit der Cellulosesynthase 1 (CESA1) und in der Mutante *rsw2* für KORRIGAN (KOR1) (Arioli et al., 1998, Nicol et al., 1998). Eine weitere *rsw*-Mutante betrifft die Glucosidase II, ein ER-Membranprotein, das an der Qualitätskontrolle beteiligt ist und kurz nach OST wirkt. Da wir unser Augenmerk auf Ereignisse der Glykosylierung gelegt hatten die im Golgi-Apparat stattfinden, wurde die Mutation der Glucosidase II nicht berücksichtigt. CESA1 ist kein Glykoprotein (Gillmore et al., 2002) und so konzentrierten sich meine Analysen auf die membranständige Endoglucanase KOR1, deren Aminosäuresequenz acht mögliche N-Glykosylierungsstellen aufweist, die für die katalytische Funktion wichtig sein sollen (Mølhøj et al., 2001).

Die Frage war nun, ob eine abweichende Glykosylierung die Faltung behindert und einen Abbau des Glykoproteins nach sich zieht oder aber das Glykoprotein zwar richtig gefaltet wird und auch durch das Sekretorische System an seinen Bestimmungsort kommt, dann aber in der Funktionalität gestört ist. Zur Klärung der Lokalisation innerhalb der Zelle wurde eine GFP-Fusion mit KOR1 (KOR1-GFP) hergestellt und dieses Konstrukt wurde mittels Protoplasten-Transformation in den jeweiligen Mutantenzellen überexprimiert.

In Wildtypzellen gelangt KOR1-GFP über das Sekretorische System an die Plasmamembran. Abb. 3.17 zeigt deutlich, dass die GFP-Fluoreszenz außen an der Zelle zu detektieren ist und die Plastidenfluoreszenz (hier magenta) darunter liegt. Die GFP-Fluoreszenz stellt sich in der Aufsicht als gefleckt bis vernetzt dar. In der Schnittebene wird ein dicker Rand um den Protoplasten deutlich. In allen drei Mutanten zeigen sich diese äußeren Strukturen. Es ist jedoch eine Abstufung zu beobachten (alle Aufnahmen wurden 24 Stunden nach

Transformation aufgenommen). Bei *cgl1-T* sind deutlich mehr KOR1-GFP-Proteine an der Peripherie der Zelle sichtbar als bei *stt3a-2* (analog zum WT vgl. Abb. 3.5 und 3.6 mit KOR1-OFP).

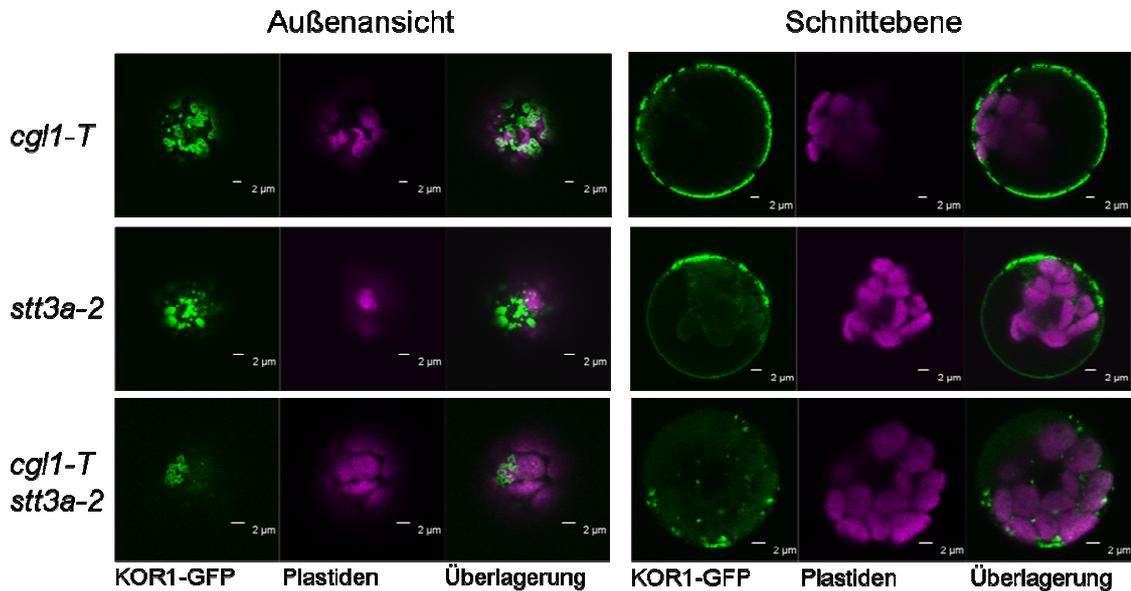


Abb. 3.17: Überprüfung der Lokalisation von KOR1-GFP in Protoplasten der Mutanten. Dargestellt ist links eine Aufsicht auf die mit KOR1-GFP transformierten Protoplasten. Rechts ist ein Schnitt durch einen Protoplasten gezeigt. Die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls ist in Magenta und die GFP-Fluoreszenz in Grün abgebildet. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transformation aufgenommen. Skala: 2 µm

Bei der Doppelmutante ist die Ausbildung dieser äußeren vernetzten Struktur nur in sehr geringem Maße sichtbar, was darauf schließen lässt, dass der Prozess noch nicht abgeschlossen ist oder es Probleme bei der Plasmamembranlokalisierung gibt. Auch in den Schnittebenen durch den Protoplasten zeigen sich Unterschiede. In der *cgl1-T*-Mutante ist KOR1-GFP außen um den Protoplasten angeordnet, während bei *stt3a-2* die Verteilung der Fluoreszenz von KOR1-GFP an der Plasmamembran weniger stark zu detektieren war. Einzig bei der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* sind grüne Strukturen innerhalb des Protoplasten und kaum Fluoreszenzen im äußeren Bereich zu sehen. Die kleinen Punkte in der Zelle bewegen sich zum Teil in einer *stop-and-go*-Bewegung, die typisch für den Golgi-Apparat ist.

3.3.7 REM-Aufnahmen der *cgl1-T stt3a-2*-Doppelmutante mit den Zellwandmutanten *rsw2-1* und *rsw1-1*

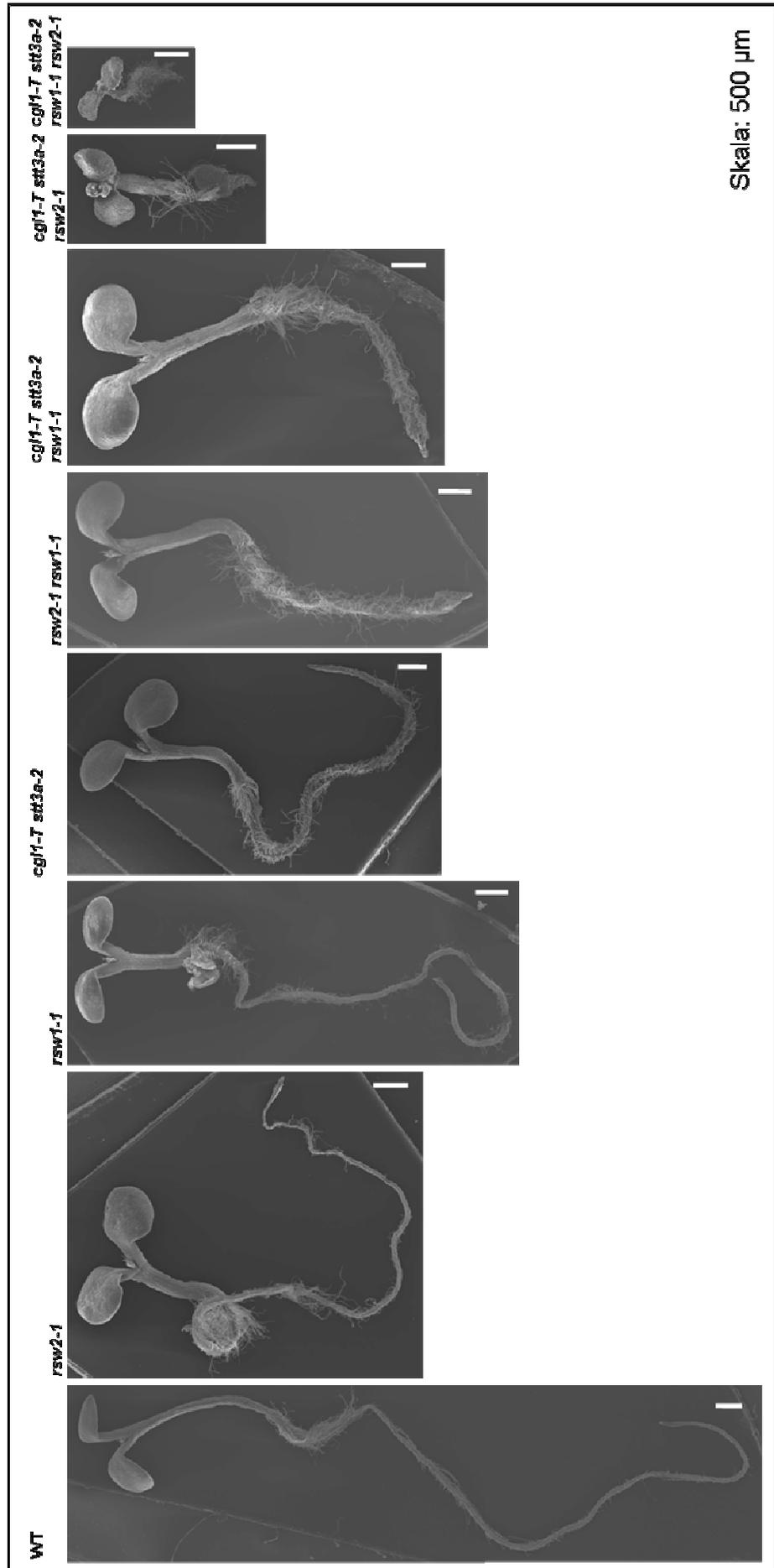
Um die biologische Signifikanz der abweichenden N-Glykosylierung von KORRIGAN in der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* zu ermitteln, wurden genetische Interaktionen zwischen dieser Doppelmutante mit *rsw2-1* (= KOR1) und *rsw1-1* (= CESA1) analysiert.

Während *cgl1-T* keinen Phänotyp zeigt, besitzt die Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* einen gestauchteren Wuchs und auch eine dickere Wurzel sowie längere und dünnere Wurzelhaare im Vergleich zum Wildtyp (vgl. REM-Aufnahmen in Abb. 3.13).

Die beiden *rsw*-Mutanten (*rsw2-1* und *rsw1-1*) sehen sich sehr ähnlich (Abb. 3.18A). Sie zeigen beide ein leicht reduziertes Längenwachstum im Vergleich zum WT. Die Doppelmutante *rsw2-1 rsw1-1* ist in ihrem Wuchs noch gedrungener als die Einzelmutanten *rsw1-1* und *rsw2-1*. Durch das Einkreuzen von *rsw1-1* in die Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* wurde ein Phänotyp ähnlich dem von *rsw2-1 rsw1-1* erzeugt. Wenn jedoch *rsw2-1* in die Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* eingekreuzt wird, resultiert daraus eine gestauchtere Wuchsform, die über eine Keimlingsgröße von 1-2 mm nicht hinauswachsen kann (Abb. 3.18B). Bei dieser Dreifachmutante *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1* ist auffallend, dass die Trichome eine unverzweigte und blasige Form aufweisen (Vergrößerung in Abb. 3.18B). Trichome von WT-Pflanzen weisen Verzweigungen auf und somit mehrere Spitzen. Im direkten Vergleich der beiden Tripelmutanten ist der Phänotyp mit *rsw2-1* (KOR1) deutlich stärker ausgebildet als der mit *rsw1-1* (CESA1).

Bei der Quadrupelmutante *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1 rsw1-1* scheinen die Zellen des gesamten Keimlings in sich zusammengefallen und wirken wie kollabiert. Diese Kreuzung ruft die nachhaltigsten Einschränkungen hervor. Die Keimlinge wurden alle gleich behandelt, so dass der Unterschied an der Struktur der Zellen/Zellwand liegen müssen und nicht an der Probenvorbereitung.

A



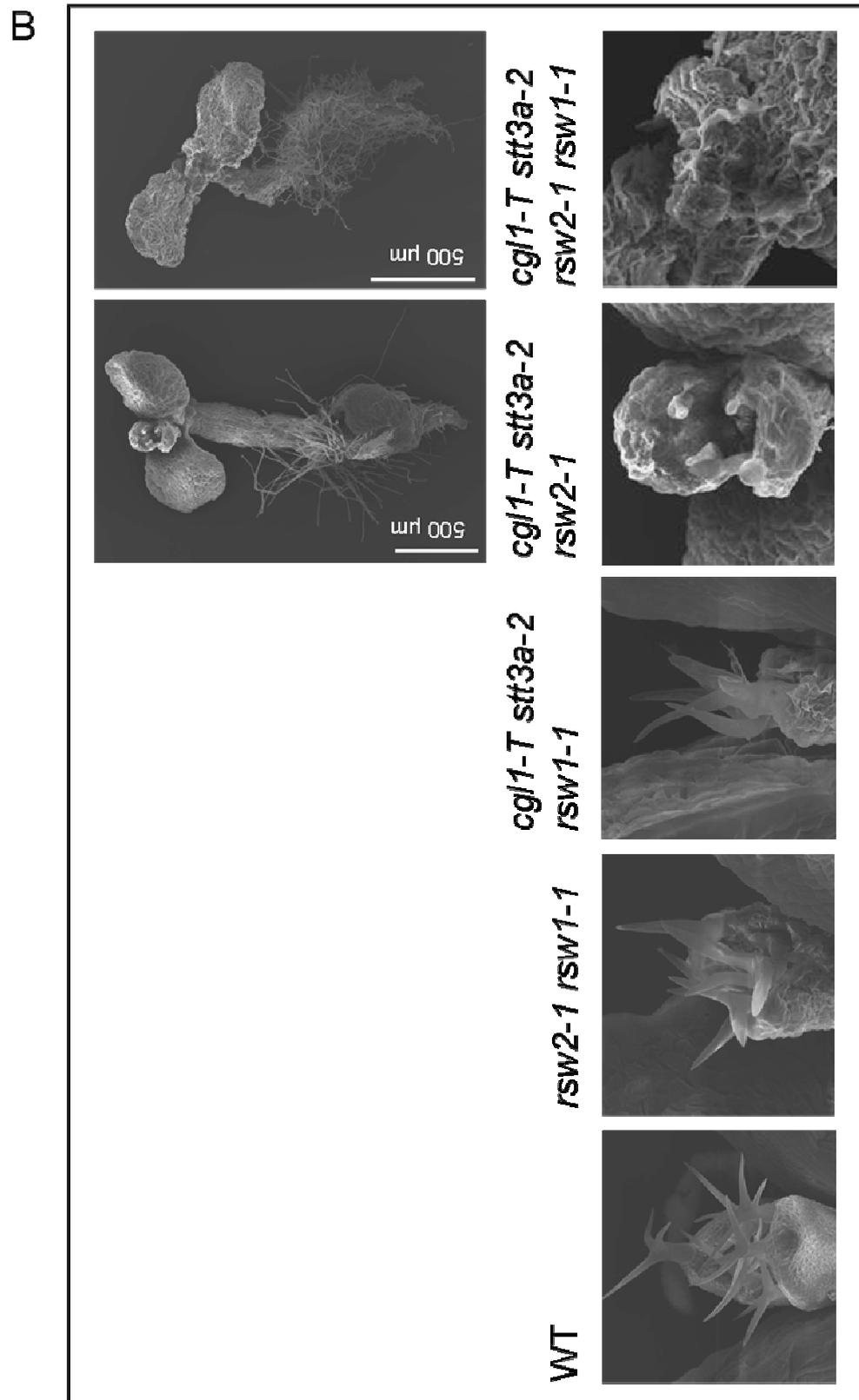


Abb. 3.18: REM-Aufnahmen von *cgl1-T stt3a-2*, *rsw2-1*, *rsw1-1* und *rsw2-1 rsw1-1* sowie Kreuzungen aus diesen Mutanten. A) Übersichtsaufnahmen der Keimlinge *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1* und *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1 rsw1-1*. B) Nahaufnahmen des Sproßvegetationspunktes mit Trichomen der beiden Kreuzungen und des WT. *cgl1-T*: N-Acetylglucosaminyltransferase I, *rsw2-1*: Korrigan1, *rsw1-1*: Cellulosesynthase A1, *stt3a-2*: Untereinheit STT3a der Oligosaccharyltransferase. Skala 500 µm

3.4 Glykosylierungsmutanten

Zur Untersuchung der N-Glykosylierungen in Pflanzen war es sinnvoll, möglichst alle an der Glykosylierung beteiligten Glykosidasen und Glykosyltransferasen in die Untersuchung mit einzubeziehen. Dazu wurden SALK- bzw. FLAG-Linien genutzt, in denen die Gene dieser Glykosidasen und Glykosyltransferasen ausgeschaltet sind. Die Charakterisierung der T-DNA-Linien und auch verschiedene Kreuzungen aus diesen Linien erfolgten zum Großteil in den Laboren von Prof. Hisashi Koiwa (Texas, USA). Eine Liste der *knock-out*-Linien und die aus diesen Linien hervorgegangenen Kreuzungen sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

3.4.1 Identifizierung von Arabidopsis-T-DNA-Mutanten

Bei T-DNA-*knock-out*-Mutanten ist eine T-DNA in das entsprechende Gen inseriert und schaltet es funktionell aus. Zur Identifizierung von homozygoten Pflanzen wurde mittels PCR auf genomischer DNA-Ebene auf die T-DNA-Insertion geschaut. Dazu wurden genspezifischen Primer unter Angabe der SALK- oder FLAG-Identifikationsnummer mit einem Primer-Design-Programm (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) erstellt. Die T-DNA-Insertion liegt zwischen diesem Primerpaar und kann mit einem auf der T-DNA bindenden Primer (FLAG-Tag oder Lba1 bzw. Rba1) identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die T-DNA-Mutanten von *gntII* und *fucTc* verifiziert.

3.4.1.1 Identifizierung einer homozygoten *gntII*

Die *gntII*-Mutante wurde aus Samen, die beim Institut INRA in Frankreich käuflich erworben wurden, identifiziert. Es handelt sich um *Arabidopsis thaliana*-Samen des Ökotyps Wassilewskija (Ws) mit der Identifikationsnummer FLAG_394A11.

Zuerst wurde die genomische DNA von mehreren Pflanzen aus dem Samenpool mit den genspezifischen Primern *gntII*_LP und *gntII*_RP untersucht. Bei WT- und heterozygoten Pflanzen wird eine Bande mit einer Größe von 930 bp erwartet. Trägt die Pflanze in beiden Allelen die T-DNA-Insertion, ist kein PCR-Produkt zu erwarten (Abb. 3.19B).

Homozygote Pflanzen wurden zuerst auf Abwesenheit eines Amplifikates mit der Primerkombination LP+RP ermittelt. In den Pflanzen Nr. 5 und 7 konnte keine Bande mit dieser Primerkombination amplifiziert werden. Als Kontrolle zeigt der Wildtyp die erwartete Bande von 930 bp. Eine Kombination von einem der beiden genspezifischen Primern mit dem FLAG-Tag-Primer ermöglichen die Amplifikation eines Fragmentes, wenn die Insertion nur einmal vorliegt.

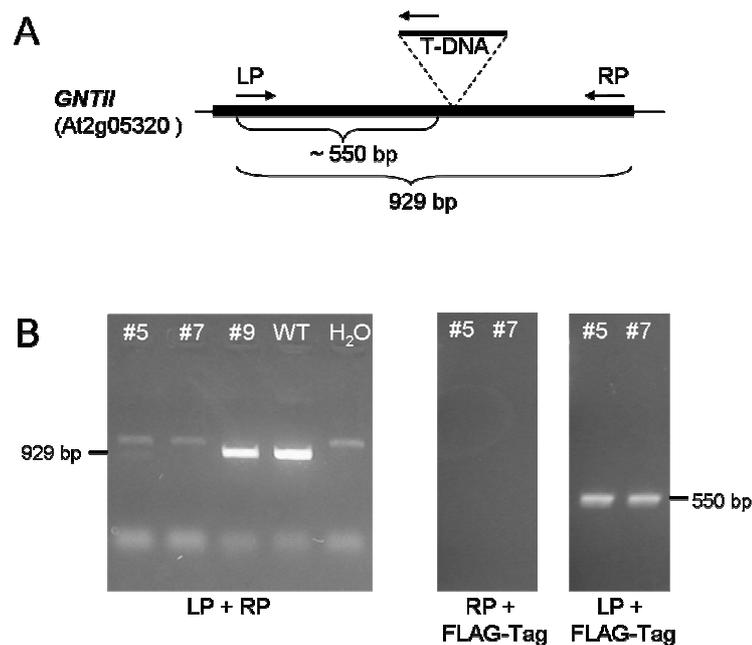


Abb. 3.19: Identifizierung der *gnTII*-T-DNA-Mutante (FLAG-Linie). A) Schematische Darstellung der Primerbindestellen auf der genomischen DNA und die erwarteten Fragmentgrößen nach Amplifikation mit Hilfe einer PCR. Das schwarze Rechteck steht für das einzige Exon. B) PCR-Analyse mit den genspezifischen Primern (links) und mit einem genspezifischen Primer und dem auf der T-DNA-bindenden FLAG-Tag-Primer (rechts). LP: *left primer*, RP: *right primer*

Das PCR-Produkt wurde in pBSK (Stratagene) kloniert und der Übergang der T-DNA zur Gensequenz durch Sequenzierung ermittelt. Die Insertionsstelle liegt zwischen der 903./904. Base nach dem Start-ATG (das A vom ATG ist die 1. Base). Da das *gnTII*-Gen aus nur einem Exon besteht, muss die Insertion in einem Exon liegen. Die für *GNTII* homozygoten Pflanzen Nummer 5 und 7 konnten abreifen und wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

3.4.1.2 Identifizierung einer homozygoten *fucTc*

Die Identifizierung der *fucTc* -Mutante erfolgte in vergleichbaren Schritten wie für die *gnTII*-Mutante beschrieben. Die Linie wird unter der Identifikationsnummer FLAG_201C09 im Institut INRA geführt. Beim WT wird mit der Primerkombination LP+RP eine Bande mit einer Größe von 910 bp amplifiziert (Abb. 3.20A). Pflanze Nummer 7 und 10 sind homozygot (Abb. 3.20B), denn mit den genspezifischen Primern kein PCR-Produkt entsteht. Da nur mit der Primerkombination LP+FLAG-Tag ein Fragment entsteht, kann davon ausgegangen werden, dass die T-DNA nur einmal inseriert ist. Wenn jedoch beide Primerkombinationen, LP mit FLAG-Tag sowie RP mit FLAG-Tag, zur Amplifikation eines Fragmentes führen, bedeutet es, dass zwei Kopien der T-DNA in invertierter Orientierung inseriert sind. Dies war der Fall bei einer SALK-Linie (SALK_067444, Daten nicht gezeigt), die auf Grund dieser Tatsache nicht weiter verwendet wurde. Es kann vorkommen, dass die T-DNA-Insertionen

durch die invertierte Orientierung der T-DNA als intronartige Sequenzen behandelt werden und bei Spleißvorgängen herausgeschnitten werden, womit das Gen eventuell nicht vollständig ausgeschaltet werden würde. Daher wurde zur Sicherheit die FLAG-Linie herangezogen, denn diese Linie zeigte nur bei der Kombination LP+FLAG-Tag ein Amplifikat, was zeigt, dass die T-DNA nur einmal inseriert ist.

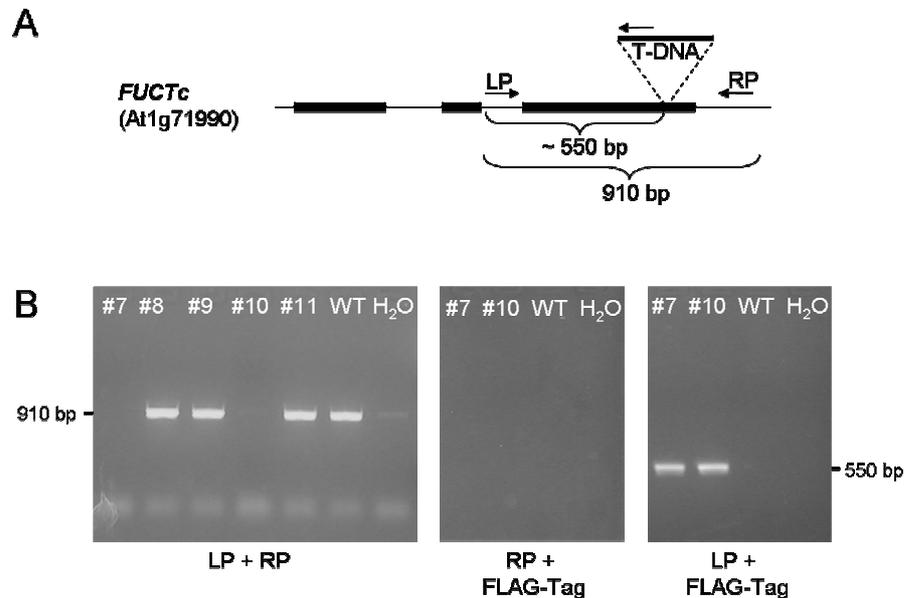


Abb. 3.20: Identifizierung der *fucTc*-T-DNA-Mutante (FLAG-Linie). A) Schematische Darstellung der Primerbindestellen auf der genomischen DNA und die erwarteten Fragmentgrößen nach Amplifikation mit Hilfe einer PCR. Die schwarzen Rechtecke stehen für Exons. B) PCR-Analyse mit den spezifischen Genprimern (links) und mit den genspezifischen Genprimern und dem T-DNA-bindenden FLAG-Tag-Primer (rechts). LP: left primer, RP: right primer

Die Sequenzierung ergab, dass die Insertionsstelle zwischen der 1707./1708. Base nach dem Start-ATG liegt. Somit inseriert die T-DNA im 3. und letzten Exon des Gens, es handelt sich also um eine Exonlinie.

3.4.2 Proteinmuster der Glykosylierungsmutanten

Bei der Untersuchung der Glykosylierungsmutanten stellt sich die Frage, ob eine falsche oder unvollständige Glykosylierung Glykoproteinen andere Eigenschaften verleihen. Dazu wurden Proteinextrakte aus Blättern der Glykosylierungsmutanten hergestellt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Das Proteinmuster unterscheidet sich auf den ersten Blick nicht in den einzelnen Mutanten (Abb. 3.21). Auffällig ist eine Bande im Proteinextrakt des Wildtyps Columbia bei ca. 78 kDa. Diese Bande ist in der *stt3a*- und *manI*-Mutante nicht mehr nachweisbar. Bei der Mutante *manI* hingegen erscheint eine weitere Bande auf Höhe von ca. 85 kDa. In der *fucTc*-Mutante scheint diese Proteinbande von 78 kDa auch nicht mehr

nachweisbar zu sein. In Ermangelung an reinen Ws-Wildtyppflanzen wurde für das SDS-Gel eine andere Insertionslinie mit Ws-Hintergrund gewählt, deren ausgeschaltetes Gen aber nicht in den Glykosylierungsweg involviert ist. Es handelte sich dabei um eine Isoform der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

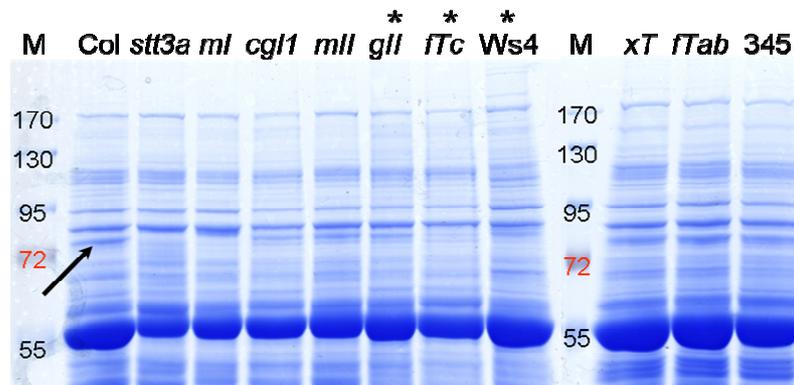


Abb. 3.21: SDS-PAE und Coomassie-Färbung der löslichen Blattohextrakte der Glykosylierungsmutanten aus *Arabidopsis thaliana*. Es sind 30 µg Gesamtprotein aus löslichem Proteinextrakt pro Spur auf einem 8% SDS-Gel aufgetragen. Sterne markieren FLAG-Linien mit dem Wildtyp Hintergrund Wassilewskija. Col: Wildtyp Columbia, *stt3a*: Untereinheit STT3a der Oligosaccharyltransferase, *ml*: Mannosidase I, *cgl1*: *cgl1-T* N-Acetylglucosaminyltransferase I, *mlI*: Mannosidase II, *gII*: N-Acetylglucosaminyltransferase II, *fucTc*: Fucosyltransferase C, Ws4: Wassilewskija T-DNA-Insertionslinie in *G6PD4*, *xT*: Xylosyltransferase, *fTab*: Doppelmutante aus Fucosyltransferase A/B, 345: Tripelmutante aus Fucosyltransferase A/B und Xylosyltransferase, M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas)

Die in Abb. 3.21 mit dem Pfeil markierte Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und einer Massenspektrometrieanalyse unterzogen (AG Hippler, Universität Münster). Dabei handelt es sich um die β -Thioglucosid Glucohydrolase (TGG1), die auch als Myrosinase bezeichnet wird (Andréasson et al., 2001). Koiwa et al. (2003) zeigten ebenfalls, dass dieses Protein in WT-Proteinextrakten vorkommt, in *stt3a-1*-Proteinextrakten aber nicht mehr anzutreffen war. Myrosinasen sind an der Abwehr gegen Insekten, Bakterien oder Pilze beteiligt (Barth and Jander, 2006) und können Glucosinolate in toxische Abbauprodukte spalten, wenn die Myrosinase nach Freisetzung aus der Vakuole auf ihr Substrat trifft.

TGG1 besitzt eine berechnete Größe von 61 kDa und in der Aminosäureabfolge sind neun mögliche N-Glykosylierungsstellen identifizierbar (Abb. 3.22). Durch diese neun möglichen Glykane, läuft das Protein im SDS-Gel höher, als die reine Proteingröße von ca. 61 kDa erwarten lässt.

TGG1

```

1 MKLLMLAFVF LLALATCKGD EFVCEENEPEF TCNQTKLFNS GNFEKGFIFG
51 VASSAYQVEG GRGRGLNVWD SFTHRPEKKG GADLGNQDIT CDSYTLWQKD
101 IDVMDELMST GYRESIAWSR LLPKGKRSRG VNPGAIKYYN GLIDGLVAKN
151 MTPFVTLFHW DLPQTLQDEY NGFLNKTIVD DFKDYADLCF ELFGDRVKNW
201 ITINQLYTPV TRGYALGTDA PGRCSPKIDV RCPGGMSSTE PYIVAHNQLL
251 AHAAAVDVYR TKYKDDQKGM IGPVMITRWF LPFDHSQESK DATERAKIFF
301 HGWEMGPLTE GKYPDIMREY VGDRLPEFSE TEAALVKGSY DFLGLNYYVT
351 QYAQNNQTIV PSDVHTALMD SRTTLTSKNA TGHAPGPPFN AASYYYYPKGI
401 YYVMDFYKTT YGDPLIYVTE NGFSTPGDED FEKATADYKR IDYLCSHLCF
451 LSKVIKEKNV NVKGYFAWSL GDNYEFCNGF TVRFGLSYVD FANITGDRDL
501 KASGKWFQKF INVTDEDSTN QDLLRSSVSS KNRDRKSLAD A*

```

Abb. 3.22: Sequenz der Myrosinase (TGG1). Als Ergebnis der Massenspektrometrie aus der WT-Bande von 78 kDa konnte das Protein TGG1 identifiziert werden. Die neun möglichen N-Glykosylierungsstellen sind fett markiert. Die Glykosylierungsmotive sind unterstrichen.

3.4.3 Immunologische Analyse der Glykosylierungsmutanten

Die immunologische Analyse der Glykosylierungsmutanten wurde mit dem cgly-Antikörper durchgeführt. In Abb. 3.23 ist dies bei der Identifizierung von *fucTa*-, *fucTb*-, *xylT*-Einzelmutanten, der Doppelmutante *fucTa/b*, sowie der Tripelmutante *fucTa/b/xylT* dargestellt. Die genomische Identifizierung der Einzelmutanten und die Kreuzungen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Hisashi Koiwa in Texas durchgeführt (für *fucTa/b* und *fucTa/b/xylT* analog zu Strasser et al., 2004).

Die Fucosyltransferase-Einzelmutanten *fucTa* und *fucTb* zeigen keinen Unterschied zum Wildtyp in Bezug auf die Detektion der Antikörperreaktion. Da es zwei Fucosyltransferasegene gibt, scheint eine ausgeschaltete Fucosyltransferase von der anderen ersetzt zu werden (Strasser et al., 2004), wodurch keine Unterscheidung durch den cgly-Antikörper möglich ist. Erst bei der *fucTa/b*-Doppelmutante ist eine leicht schwächere Färbung auf dem Blot zu erkennen. Die Detektion der *xylT*-Mutante mit dem cgly-Antikörper ist sehr schwach, jedoch sind Proteinbanden im Vergleich zu der *nonstainer*-Kontrolle *cglI-T* nachzuweisen. Damit zeigt sich erneut, dass der cgly-Antikörper verstärkt die Xylose, als die Fucose erkennt (Faye et al., 1993).

Die Tripelmutante *fucTa/b/xylT* verhält sich, wie *cglI-T*, wie ein echter *nonstainer*. Dies konnte Strasser et al. (2004) ebenfalls mit einem HRP-Antikörper (*Horse Radish Peroxidase*, Meerrettichperoxidase) zeigen. Dieser Antikörper erkennt wie der cgly-Antikörper die *core*-Fucose und -Xylose, jedoch für beide Zuckerreste mit ähnlicher Intensität.

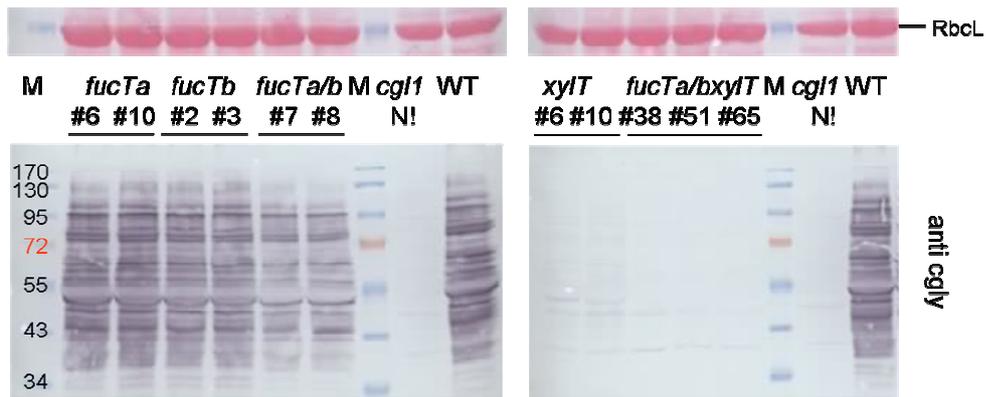


Abb. 3.23: nonstainer-Test der Mutanten *fucTa*, *fucTb*, *fucTa/b*, *xylT* und *fucTa/b/xylT*. Oben: PonceauS-Färbung des Blots (es ist nur die große Untereinheit der RubisCO dargestellt). Unten: Colorimetrische Blotentwicklung mit cgly-Antikörper. *fucTa*: Fucosyltransferase A, *fucTb*: Fucosyltransferase B, *fucTa/b*: Kreuzung Fucosyltransferase A/B, *cgl1*: *cgl1-T*, N-Acetylglucosaminyltransferase I, WT: Wildtyp Columbia, *xylT*: Xylosyltransferase, *fucTa/b/xylT*: Tripelmutante aus Fucosyltransferase A/B und Xylosyltransferase, M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas), N!: positive Kontrolle für *nonstainer*. Die Nummern geben die Mutantenlinien an, die auf diesem Blot getestet wurden.

Dies zeigt sich auch in der *nonstainer*-Analyse weiterer Glykosylierungsmutanten in Abb. 3.24. Dort sind Blattextrakte verschiedener Mutanten nebeneinander aufgetragen.

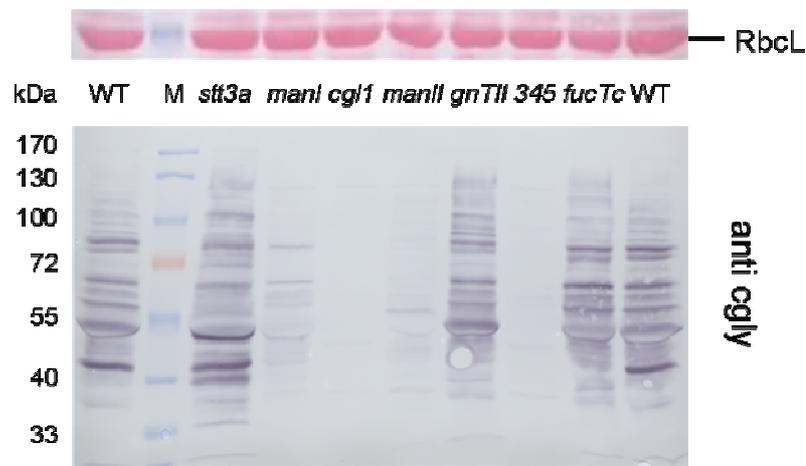


Abb. 3.24: nonstainer-Test von Glykosylierungsmutanten. Oben: PonceauS-Färbung des Blots (es ist nur die große Untereinheit der RubisCO dargestellt). Unten: Colorimetrische Blotentwicklung mit cgly-Antikörper. WT: Wildtyp Columbia, *stt3a*: Untereinheit STT3a der Oligosaccharyltransferase, *manI*: Mannosidase I, *cgl1*: *cgl1-T*, N-Acetylglucosaminyltransferase I, *manII*: Mannosidase II, *gntII*: N-Acetylglucosaminyltransferase II, 345: Tripelmutante aus Fucosyltransferase A/B und Xylosyltransferase, *fucTc*: Fucosyltransferase C, M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas)

Bei *gntII* und *fucTc* fehlt eine markante Bande bei ca. 43 kDa. Jedoch basieren diese beiden Linien auf dem Wassilewskija-Hintergrund und nicht wie die anderen Mutanten auf Columbia. Dadurch ist eine zweifelsfreie Aussage, ob das Fehlen dieser Bande auf Grund der Mutation zustande kommt, nicht möglich. Als *nonstainer*-Mutanten sind auf diesem Blot die *cgl1-T*- und *fucTa/b/xylT*-Mutanten eindeutig zu identifizieren. Des Weiteren fällt auf, dass die beiden Mannosidase-Mutanten (*manI* und *manII*) eine schwache Reaktion mit dem cgly-

Antikörper zeigen. Beruht dies nur auf einer „unspezifischen“ Reaktion oder darauf, dass der Antikörper doch mit einer *core*-Fucose oder einer *core*-Xylose reagieren kann? In der *manI*-Spur könnte etwas von dem *stt3a-2*-Proteinüberstand übergelaufen sein, denn in anderen Blots, zeigte die *manI*-Mutante keine Reaktion mit dem *cgly*-Antikörper (vergleiche Abb. 3.25 und 3.27). Um einen möglichen Anhaltspunkt zur Klärung der Frage, ob der *cgly*-Antikörper mit den *manII*-Glykanen reagieren kann, zu bekommen, wurden zum einen Blattextrakte und zum anderen auch die geblotteten Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit einer Mannosidase aus der Jack- oder Riesenbohne (*jack bean, Canavalia ensiformis* L.) inkubiert, um mögliche Mannose-Reste der *high-mannose*-Glykane zu entfernen, damit der Antikörper eine bessere Angriffsfläche an die *core*-Zuckerreste bekommt.

Die auf der Nitrocellulosemembran fixierten Proteine wurden wie folgt mit der Mannosidase behandelt. Die Proteinrohextrakte wurden mittels SDS-PAGE getrennt, geblottet und nach Vorequilubrieren der Membran im Mannosidasepuffer mit verschiedenen Enzymmengen inkubiert (Abb. 3.25). Durch die PonceauS-Färbung ist eine gleichmäßige Beladung der Spuren gezeigt, so dass die Antikörperfärbung gut miteinander vergleichbar ist.

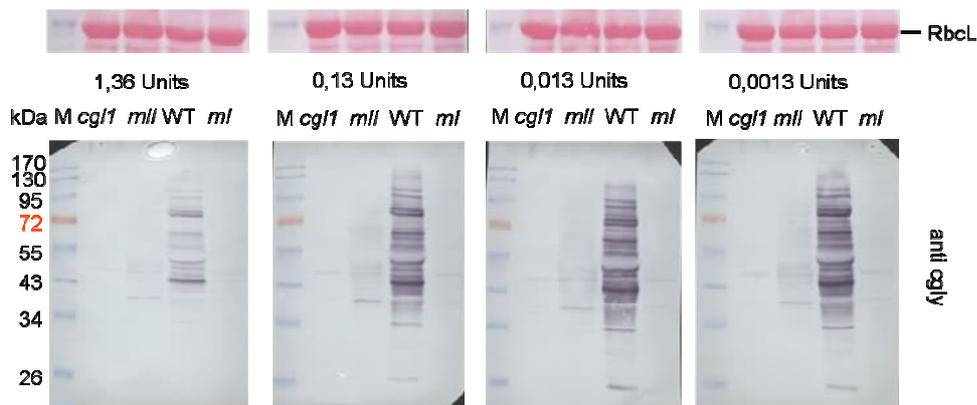


Abb. 3.25: α -Mannosidase-Behandlung von Arabidopsis-Glykosylierungsmutanten (geblottete Blatt-Extrakte). Lösliche Blattextrakte wurden nach SDS-PAGE und Blot-Transfer mit Mannosidase auf dem Blot inkubiert. Oben: PonceauS-Färbung des Blots (es ist nur die große Untereinheit der RubisCO dargestellt). Unten: Colorimetrische Blotentwicklung mit *cgly*-Antikörper. M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestaind Protein Ladder, MBI Fermentas), *cgl*: *cgl1-T*, N-Acetylglucosaminyltransferase I, *mll*: *manII*, Mannosidase II, *ml*: *manI*, Mannosidase I, WT: Wildtyp (Col)

Die nachträgliche Blotbehandlung mit 1,36 Units Mannosidase bewirkte eine allgemein schwächere Immunfärbung mit den *cgly*-Antikörpern. Der erhoffte Effekt, dass die *manII*-Mutante nach der Mannosidase-Behandlung eine deutlichere Färbung aufweist, blieb aus. Auch unter diesen Bedingungen reagierte der Antikörper etwas stärker mit der *manII*-Mutante als die *nonstainer*-Kontrolle *cgl1-T*. Da der Versuch der Mannosidase-Behandlung keinen signifikanten Unterschied zeigte, wurde ein alternativer Ansatz durchgeführt (Abb. 3.26). Dazu wurden die Proteinrohextrakte mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und in

Reaktionspuffer resuspendiert. Zu diesen resolubilisierten Proteinen wurden verschiedene Mengen Mannosidase gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und geblottet. Das Ergebnis der cgly-Antikörperentwicklung des Blots ist in Abb. 3.26 dargestellt. Die PonceauS-Färbung zeigt, dass in allen Spuren eine gleichmäßige Proteinmenge aufgetragen wurde. In den drei Spuren, die mit 1,36 Units behandelt wurden, erscheinen zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 70 kDa und 50 kDa. Jedoch veränderte sich die Antikörperfärbung mit dem cgly-Antikörper durch die Behandlung mit Mannosidase nicht und weist auch keine Abhängigkeit von der Konzentration des Enzyms, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ersten drei Spuren in Abb. 3.26) auf.

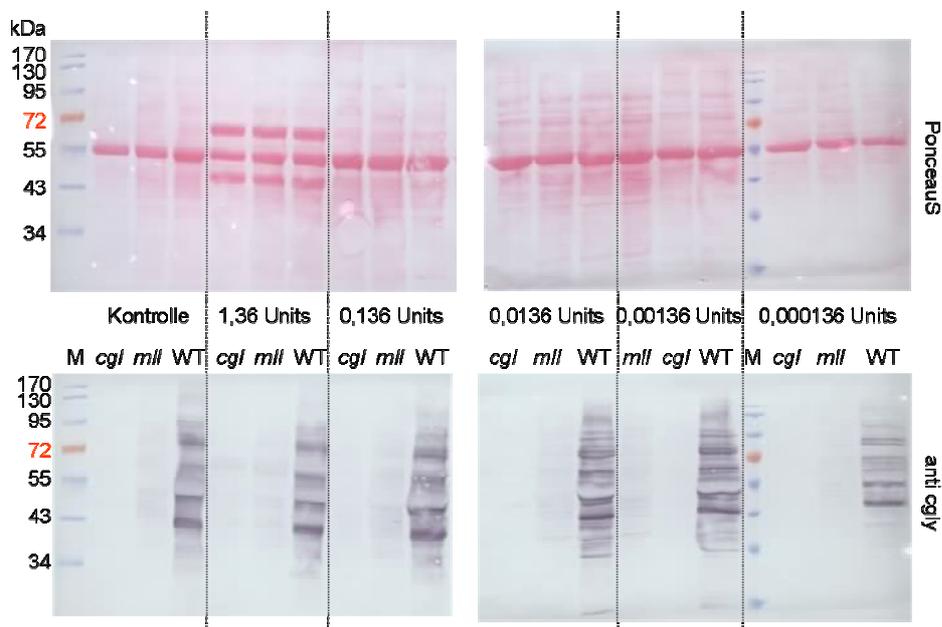


Abb. 3.26: α -Mannosidase-Behandlung von Arabidopsis-Glykosylierungsmutanten (TCA-gefällte Blattextrakte). SDS-PAGE von je 30 μ g Blattextrakten. Oben: PonceauS-Färbung des Blots. Unten: Colorimetrische Blotentwicklung mit cgly-Antikörper. M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas), *cgl*: *cglI-T*, N-Acetylglucosaminyltransferase I, *mll*: *manII* Mannosidase II, WT: Wildtyp (Col)

Wie die Zuckerstrukturen der Glykosylierungsmutanten aufgebaut sind, kann durch weitere Analysen untersucht werden. Durch Behandlung der Proteinrohextrakte mit der Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) können Rückschlüsse auf die Glykanstruktur gezogen werden. PNGaseF ist eine Amidase, die zwischen dem inneren GlcNAc und dem Asparaginrest von *high-mannose*-, Hybrid- und (bedingt) komplexen Zuckerresten spalten kann. Eine Abspaltung des Zuckerrestes ist jedoch nicht möglich, wenn das proximale GlcNAc mit einer α -1,3-Fucose dekoriert ist.

In Abb. 3.27 sind die Glykosylierungsmutanten mit und ohne PNGaseF-Behandlung aufgetragen. Die PonceauS-Färbung zeigt die große Untereinheit der RubisCO (RbcL) und bestätigt einen gleichmäßigen Proteinauftrag. Die Entwicklung des Blots mit dem cgly-Antikörper verdeutlicht, welche Mutanten eine *core*-Fucose besitzen. Die PNGaseF konnte bei den WT-Varianten (Col und Ws), sowie den Mutanten *stt3a-2*, *gntII* und *fucTc* die Zuckerstrukturen nicht vollständig abtrennen. Daraus ist abzuleiten, dass diese Pflanzen Glykane mit einer *core*-Fucose besitzen. Bei den *nonstainer*-Mutanten kann mit Hilfe des cgly-Antikörpers keine genauere Aussage getroffen werden. Bei *fucTa/b* zeigt sich ein Unterschied zwischen der Behandlung mit und ohne PNGaseF. Der cgly-Antikörper kann nach der PNGaseF-Behandlung nicht mehr binden, die Zuckerstruktur ist abgespalten worden, da dieser Mutante auch die Enzyme für die Verknüpfung der *core*-Fucose fehlt. Bei den Mutanten *manI*, *cglI-T*, *manII*, *xylT* und der Tripelmutante *fucTa/b/xylT* kann der cgly-Antikörper schon vor der PNGaseF-Behandlung nicht binden. Dies hat sich auch durch die PNGaseF-Behandlung nicht geändert.

Das Lektin Concanavalin A (ConA) hat die Eigenschaft unter Anwesenheit von Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen an terminale α -D-Mannose- und α -D-Glucosereste zu binden. Diese Eigenschaft kann z. B. zur Reinigung von Glykoproteinen genutzt werden. Der Blot, der mit ConA inkubiert und mittels HRP chemilumineszent entwickelt wurde, ist in Abb. 3.27 unten dargestellt.

So ist in jeder Spur, die nicht mit PNGaseF (gekennzeichnet durch das „-“, oberhalb der Spuren) behandelt wurde, eine Reaktion mit ConA zu sehen. Dies weist in den Proteinrohextrakten Glykane mit endständigen Mannosen nach. Die Doppelmutante *fucTa/b* und die Tripelmutante *fucTa/b/xylT* zeigen jedoch eine recht schwache Reaktion mit ConA im Vergleich zum Wildtyp oder zu *cglI-T*. Alle Proben der Spuren, die mit PNGaseF inkubiert wurden, zeigen keine Reaktion mit ConA, bis auf die *manII*-Mutante und ganz schwach die *xylT*-Mutante. Dies deutet darauf hin, dass die Glykane in *manII* (und auch in *xylT*) noch ungetrimmte Mannose-Reste auf dem α -1,6-Arm tragen (siehe Glykanstrukturen unterhalb des Blots in Abb. 3.27). Doch auch die Glykane der Mutanten *manI* und *cglI-T* haben endständige Mannosen. Diese Glykane können jedoch von der PNGaseF abgetrennt werden, da keine *core*-Fucose vorhanden ist.

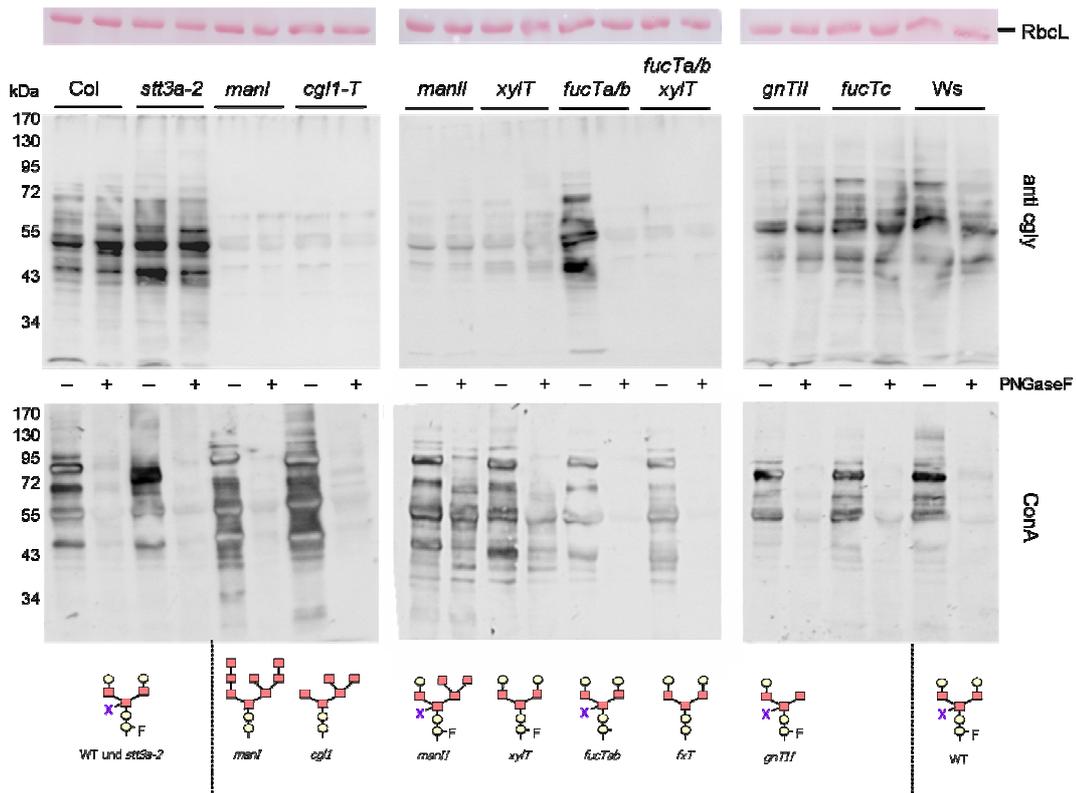


Abb. 3.27: PNGaseF-Analyse von Arabidopsis-Glykosylierungsmutanten. Oben: PonceauS-Färbung des Blots (es ist nur die große Untereinheit der RubisCO dargestellt). Mitte: Chemilumineszente Blotentwicklung zur Detektion des cgly-Antikörpers. Unten: Chemilumineszente Blotentwicklung mit ConA. Zur Veranschaulichung sind die Glykanstrukturen, wie sie in den Mutanten auftreten, dargestellt. Col: Wildtyp Columbia, Ws: Wildtyp Wassilewskija, *stt3a-2*: Untereinheit STT3a der Oligosaccharyltransferase, *manI*: Mannosidase I, *cgl1-T*: N-Acetylglucosaminyltransferase I, *manII*: Mannosidase II, *xylT*: Xylosyltransferase, *fucTa/b*: Doppelmutante aus Fucosyltransferase A und B, *fucTa/b/xylT*: Tripelmutante aus Fucosyltransferase A/B und Xylosyltransferase, *gnTII*: N-Acetylglucosaminyltransferase II, *fucTc*: Fucosyltransferase C, M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestaind Protein Ladder, MBI Fermentas)

3.4.4 Untersuchung der Glykomutanten mit KOR1-spezifischen Antikörpern

Durch den *rsw*-Phänotyp wurde KORRIGAN 1 (KOR1) als möglicher Auslöser des Phänotyps in den salzgestressten *stt3a-2*- und *cgl1*-Mutanten vermutet, da *rsw2*-Pflanzen (EMS-Mutation im *KOR1*) einen ähnlichen Phänotypen aufweisen und es sich bei KOR1 um ein Glykoprotein handelt. KOR1 ist ein integrales Typ II-Membranprotein mit acht möglichen N-Glykosylierungsmotiven. Für immunologische Analysen wurde uns von Herman Höfte (INRA, Versailles, Frankreich) Antikörper (KOR1-Antikörper) gegen die cytosolische Domäne von KOR1 zur Verfügung gestellt.

Durch die acht möglichen Glykosylierungsstellen von KOR1 ist es möglich einen Unterschied in der Laufhöhe bei den Mutanten auf einem Blot zu detektieren, der mit KOR1-Antikörpern behandelt wurde. Die nachgewiesenen Molekulargewichte der Glykane fallen in den Mutanten unterschiedlich aus, da durch das Ausschalten der Glykosyltransferasen der

Syntheseweg an verschiedenen Stellen unterbrochen wird. In Abb. 3.28 sind einige der Glykosylierungsmutanten nach Western-Blot gezeigt, der mit KOR1-Antikörpern inkubiert wurde. Da KOR1 ein Membranprotein ist, wurde die Pelletfraktion untersucht. Nach Extraktion und Zentrifugation befinden sich die unlöslichen Proteine (Membranproteine) im Pellet und werden durch eine halbstündige Inkubation mit 1x SDS-Ladepuffer bei RT und kurzer Ultraschallbehandlung aus den Membranen gelöst und konnten auf das SDS-Gel aufgetragen werden.

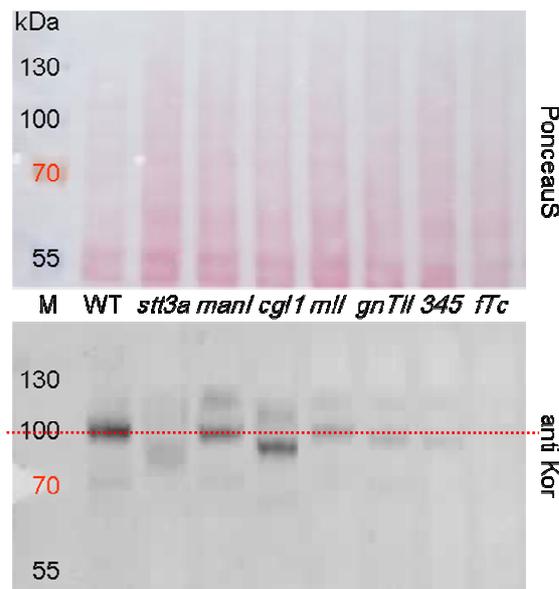


Abb. 3.28: Analyse der Glykosylierungsmutanten mit Hilfe des KOR1-Antikörpers. Oben: PonceauS-Färbung der Pelletfraktion (30 µg pro Spur). Unten: Chemilumineszente Entwicklung nach Inkubation mit KOR1-Antikörpern. M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas), WT: Wildtyp Columbia, *stt3a*: OST Untereinheit STT3a, *manI*: Mannosidase I, *cglI*: *cglI*-T, N-Acetylglucosaminyltransferase I, *mlI*: Mannosidase II, *gnTII*: N-Acetylglucosaminyltransferase II 345: Tripelmutante aus Fucosyltransferase A/B und Xylosyltransferase, *fTc*: *fucTc*, Fucosyltransferase C.

Das stärkste Signal wird in der WT-Spur detektiert. Das Korrigansignal im WT läuft knapp unter der 100 kDa-Markerbande, was an der Art der gewählten Aufarbeitungsmethode liegt (Pelletfraktion, nicht gekocht). In der Spur mit der Pelletfraktion der *stt3a*-2-Mutante ist eine schwache Detektion von Korriganproteinen zu sehen. Jedoch besteht das Signal nicht aus einer deutlichen Bande, sondern zieht sich über einen Bereich von 15 - 20 kDa.

In den beiden folgenden Spuren mit den Proteinextrakten von *manI* und *cglI*-T ist dagegen ein deutliches, aber im Vergleich zum WT, schwächeres Signal von KOR1-Antikörpern detektiert worden. Das Korriganprotein in *manI* verläuft ungefähr auf der Höhe von KOR1 im WT. Im *cglI*-T-Hintergrund ist das Korrigansignal deutlich detektiert, weist aber im Vergleich zu den anderen Mutanten eine geringere Größe von ca. 80 kDa auf. Die nächsten Spuren auf dem Blot zeigen Proteinextrakte von *manII*, *gnTII* und der Tripelmutante *fucTa/b/xylT* sowie von *fucTc*. Die Mutanten *manII*, *gnTII* und *fucTa/b/xylT* weisen ein

schwaches Signal auf und bei der Mutante *fucTc* ist kein Signal zu detektieren, obwohl der PonceauS-Abgleich einen gleichmäßigen Proteinauftrag zeigt. Auf anderen Korrigan-Blots (hier nicht gezeigt) war bei *fucTc* oft kein oder auch nur ein sehr schwaches Signal zu sehen. Wenn ein schwaches Signal detektiert wurde, zeigte es eine Größe zwischen den Korrigansignalen von *gntII* und *manII* (annähernd WT-Größe). In der Tripelmutante *fucTa/b/xylT* verläuft das Signal von KOR1 zwischen den Signalen von *cglI-T* und *gntII*.

Die mit Hilfe des KOR1-Antikörpers detektierte Bande zeigte auf den Western-Blots bei den WT-Proteinextrakten eine Größe von ca 100 kDa, was im Gegensatz zu in der Literatur angegebenen Größe von KOR1 von 75 kDa steht. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass dieser Größenunterschied durch die verwendete Aufschlußmethode begründet ist, wurden die Proben zum Vergleich wie in Robert et al. (2005) beschrieben, aufgearbeitet.

An der PonceauS-Färbung in Abb. 3.29 kann die aufgetragene Proteinmenge abgeschätzt werden. Die Spuren der Überstände mit verschiedenen aufgearbeiteten Rohextrakten sind mit fast der gleichen Menge an Protein beladen, ebenso zeigen die Pellet-Spuren eine recht einheitliche Beladung mit Protein. Der KOR1-Antikörper detektiert in beiden Spuren mit den Extrakten des Hochsalzextraktionspuffer (TEDP) Banden.

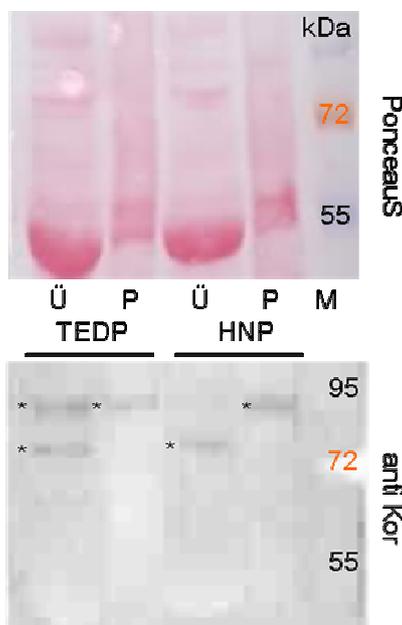


Abb. 3.29: Detektion von KORRIGAN aus Blattrohextrakten mit dem KOR1-Antikörper im Vergleich verschiedener Extraktionspuffer. Extraktionspuffer TEDP abgewandelt nach Robert et al. (1 M TrisHCl pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1x Proteaseinhibitorcocktail) und HNP (100 mM HEPES pH 7,5, 2 mM Na₂S₂O₅, 1x Proteaseinhibitorcocktail). Aufgetragen sind Überstand- (Ü) und Pelletfraktionen (P) der Proteinextraktionen. Oben: PonceauS-Färbung des Blots. Unten: Chemilumineszente Blotentwicklung mit KOR1-Antikörper. M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas)

In der Überstand-Spur (Ü) sind zwei Banden, eine bei 95 kDa und die andere oberhalb von 72 kDa zu sehen. In der Pelletaufarbeitung ist nur die obere Bande (95 kDa) detektiert worden. Die Antikörperreaktion der Proteinextraktion aus dem HNP-Extraktionspuffer zeigt jedoch in beiden Spuren (Überstand und Pellet) nur jeweils eine Bande. Im Überstand zeigt die Bande eine Größe von 72 kDa, also auf gleicher Höhe wie im Überstand mit dem Hochsalzpuffer. Bei der Pelletfraktion mit dem HNP-Puffer ist nur eine Bande mit ungefähr 95 kDa zu sehen, die ebenfalls der detektierten Bande der Pelletfraktion des Hochsalzpuffers entspricht.

3.5 Herstellung eines Antikörpers gegen das LewisA-Epitop

Der cgly-Antikörper reagiert mit komplexen Glykanen, speziell mit der *core*-Fucose und *core*-Xylose. Für die weiterführenden Untersuchungen der Glykanzusammensetzung in den Mutanten wurde ein Antikörper gegen das LewisA-Epitop hergestellt. Dazu wurde ein käuflich erworbenes Glykan (Lacto-N-fucopentaose II; L6401, Sigma) mit den LewisA-Zuckern α -1,4-Fucose und β -1,3-Galactose chemisch an das Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt (nach van Remoortere et al., 2000) und in Kaninchen injiziert.

In Abb. 3.30 ist die erfolgreiche Kopplung des Glykans an BSA gezeigt. BSA erhält durch die Kopplung des Glykans eine größere Masse und ist dadurch im SDS-Gel mit einer Masse von ca. 70 kDa nachweisbar. Weder BSA alleine noch mit LewisA gekoppeltes BSA reagieren mit dem cgly-Antikörper (Abb. 3.30C).

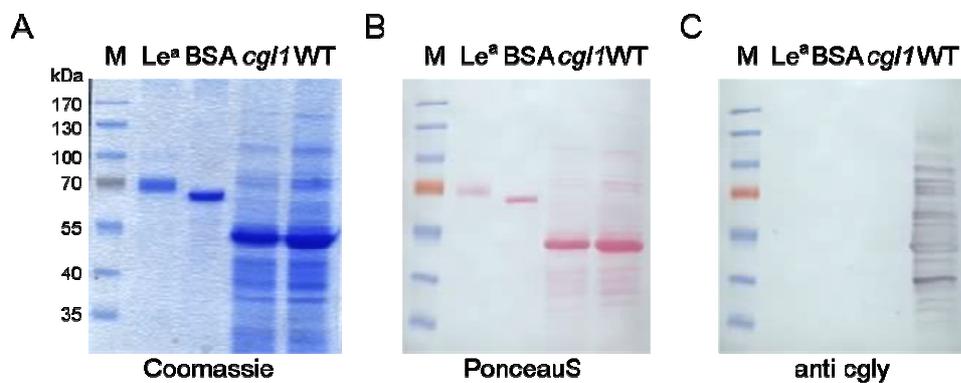


Abb. 3.30: Kopplung eines LewisA-Glykans an das Trägerprotein BSA. A) Coomassiegefärbtes SDS-Gel. B) PonceauS-Färbung des Western-Blot und C) Entwicklung des Western-Blots nach Inkubation mit cgly-Antikörper. M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestaind Protein Ladder, MBI Fermentas), WT: Wildtyp Columbia, *cgl1*: *cgl1*-T, N-Acetylglucosaminyltransferase I, BSA: Rinderserumalbumin, Le^a: BSA mit gekoppeltem LewisA-Glykan.

Für den Test der verschiedenen Blutseren des hergestellten Antikörpers (1.-5. Blut) wurden Blattextrakte von verschiedenen Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabaccum*, *Lycopersicum esculentum*, *Solanum tuberosum*) mittels Western-Blot auf Nitrocellulosemembran fixiert und mit den Aliquots der Immunsereen getestet. Die Blotentwicklung des 4. Blutes ist in Abb. 3.31 dargestellt. Die colorimetrische Färbung zeigt, dass der Antikörper sein Antigen (Le^a) gut erkennt, jedoch auch das Trägerprotein BSA. Der Antikörper reagiert jedoch mit BSA im Verhältnis weniger, da die doppelte Menge an BSA aufgetragen wurde als vom Antigen und das BSA-Signal schwächer ist. Für weitere Untersuchungen ist es daher sinnvoll den Antikörper gegen BSA zu verarmen, um seine Spezifität zu erhöhen.

In allen Pflanzenspezies detektiert der LewisA-Antikörper eine oder mehrere Banden bzw. einen bestimmten Bereich. Auffällig ist die Doppelbande unterhalb von 35 kDa bei Tabak und

Kartoffel (Überstand und Pellet) und etwas schwächer bei Tomate (Überstand). Diese Banden werden in Arabidopsis nicht detektiert. Der Antikörper reagiert in allen Pflanzen mit Proteinen im Bereich von 55 kDa und etwas undeutlicher im Bereich von 70 kDa, jedoch ist die Reaktion mit Arabidopsis-Proteinen sehr schwach.

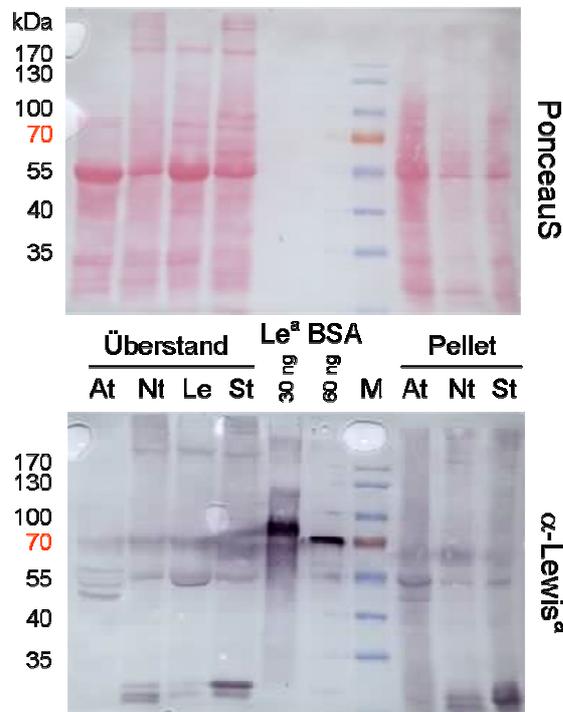


Abb. 3.31: Test des LewisA-Antikörpers auf Blattextrakten von Arabidopsis, Tabak, Tomate und Kartoffel. Oben: PonceauS-Färbung des Blots. Unten: Colorimetrische Entwicklung nach Inkubation mit LewisA-Antikörper (4. Blut). M: Molekularmassenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas), At: *Arabidopsis thaliana*, Nt: *Nicotiana tabacum*, Le: *Lycopersicon esculentum*, St: *Solanum tuberosum*, BSA: Rinderserumalbumin, Le^a: BSA mit gekoppeltem LewisA-Glykan.

In einem Blot mit den Glykosylierungsmutanten waren in allen Spuren diese beiden Banden durch den LewisA-Antikörper detektiert worden (Daten nicht gezeigt), jedoch war kein Unterschied zwischen *cgli-T* und WT oder anderen Mutanten zu sehen. Durch die frühzeitige Unterbrechung der Glykosylierung in der *cgli-T*-Mutante wird das Substrat für die GALT und FUCTc nicht gebildet und in diesem Fall hätte der Antikörper keine Zuckerstrukturen detektieren dürfen. Fitchette et al. publizierten 1999, dass in Cruciferae keine LewisA-Epitope nachweisbar sind oder gar nicht gebildet werden. Strasser et al. (2007b) konnten zeigen, dass in Arabidopsis sehr wohl LewisA zu detektieren ist, allerdings nicht in Blattgewebe.

Obwohl der LewisA-Antikörper bei Arabidopsis keine Unterschiede in den Mutanten zeigt, kann mit ihm in Tabakgewebe ein LewisA-Epitop nachgewiesen werden. LewisA-Epitope werden erst ganz am Ende der N-Glykosylierung erzeugt und diese Glykoproteine werden zum Großteil in den Apoplasten sekretiert oder in die Plasmamembran inseriert (Fitchette et al., 1999). Daher wurde aus Tabakblättern das Apoplasteneluat isoliert und mit dem LewisA-

Antikörper untersucht. Im direkten Vergleich wurde der Rohextrakt vor und nach der Apoplasteneluat-Isolierung auf den Blot aufgetragen (Abb. 3.32).

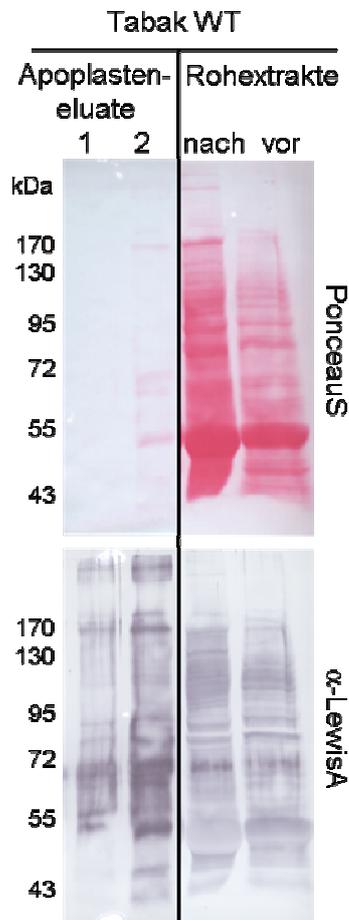


Abb. 3.32: Test des LewisA-Antikörpers auf Signalerkennung in Apoplasteneluaten aus Tabak. Oben: Ponceaus-Färbung des Blots. Unten: Colorimetrische Entwicklung mit LewisA-Antikörper. 1: Apoplasteneluat mit 48 xg für 2 min ausgeschleudert, 2: Apoplasteneluat mit 1740 xg für 3 min ausgeschleudert, jeweils 25 µl aufgetragen, Rohextrakte nach und vor Ausschleudern des Apoplasteneluates.

In den ersten beiden Spuren der Abb. 3.32 sind die Apoplasteneluaten aufgetragen. An der schwachen Ponceaus-Färbung wird deutlich, dass dort sehr wenig Protein, im Gegensatz zu den Blattextrakten in den beiden rechten Spuren, aufgetragen worden ist. Die colorimetrische Antikörperfärbung zeigt ein gegenteiliges Bild. Hier reagiert der LewisA-Antikörper sehr stark mit dem wenigen Protein aus den Apoplasteneluaten. Bei den Rohextrakten zeigt der Antikörper eine starke Reaktion mit dem Rohextrakt vor Ausschleudern des Apoplasteneluates. Die Ponceaus-Färbung ist hier deutlich schwächer, doch die Immunfärbung ist gleich stark ausgeprägt wie in der Spur nach Ausschleudern.

Die Isolierung des Apoplasteneluates aus Arabidopsisblättern ist auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden. Dies stellte sich auf Grund der kleinen und empfindlichen Blättern als schwierig heraus, zumal nicht viel Apoplasteneluat gewonnen werden konnte. Ein Western-Blot mit Arabidopsis-Apoplasteneluat zeigte keine Reaktion mit dem LewisA-Antikörper. So ist der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte LewisA-Antikörper nur bedingt für die Analyse von Arabidopsismutanten geeignet, aber für z. B. Tabak kann er durchaus eingesetzt werden.

4. Diskussion

4.1 Lokalisationsstudien verschiedener Cellulosesynthase A1-Konstrukte in Protoplasten mit Markern für das Sekretorische System

Ziel war es, ein fluoreszenzmarkiertes Konstrukt von CESA1 zu erstellen, das nach Expression in Pflanzenzellen an bzw. in der Plasmamembran lokalisiert. CESA1 ist aus acht Transmembrandomänen aufgebaut, die eine Art Pore bilden, durch die die neu synthetisierte Cellulosefibrille in den extrazellulären Raum entlassen wird. Zwischen dem zweiten und dritten Membrandurchgang erstreckt sich eine große cytosolische Domäne (*loop*) mit dem Motiv D-D-D-QxxRW, das für polymerisierende Synthasen charakteristisch ist. Es ist für die Substratbindung und Bildung der glykosidischen Bindungen zwischen den Zuckerbausteinen wichtig (Delmer, 1999).

Das Konstrukt CESA1-short-GFP beinhaltet nur die beiden N-terminalen Transmembrandomänen im Leseraster vor das GFP fusioniert. Die katalytische Domäne und die sechs weiteren Membrandurchgänge fehlen. Dieses Konstrukt wird zum Sekretorischen System dirigiert, denn es akkumuliert im ER. Dies wird auch durch die netzartige Fluoreszenz angezeigt, die den Nukleus umrandet. Zusammen mit dem ER-Marker konnte eine Co-Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 3.3A). Mit dem Golgi-Marker zeigte CESA1-short-GFP keine Übereinstimmung. Das kurze CESA1-Konstrukt verbleibt also im ER und gelangt im Sekretorischen System nicht zur Plasmamembran. Vermutlich wird das Fusionsprotein abgebaut, da im Zellkern eine schwache Fluoreszenz zu sehen ist, die durch das vom Fusionsprotein abgespaltene GFP zustande kommen könnte, da freies GFP-Protein in der Lage ist, in den Zellkern zu diffundieren.

CESA1-full-GFP ist ein Volllängenkonstrukt, welches N-terminal an GFP fusioniert wurde. Dieses Konstrukt lokalisiert zwar in geringeren Mengen im ER, vorwiegend jedoch im Golgi-Apparat. Die Co-Expression von CESA1-full-GFP mit dem ER-Marker zeigte eine schwache Co-Lokalisation. Doch die punktförmigen Fluoreszenzen, die deutlich mit dem Golgi-Marker co-lokalisieren, zeigen, dass CESA1-full-GFP nach Synthese am ER bis in den Golgi-Apparat gelangt. So ist auch die Co-Lokalisation mit dem ER-Marker zu erklären, denn das synthetisierte Protein muss über das ER gehen, um in den Golgi-Apparat zu gelangen. Unterstützend für die Lokalisation von CESA1-full-GFP im Golgi-Apparat kann die Größe der fluoreszierenden Punkte von ca. 1 µm im Durchmesser und deren *stop-and-go*-Bewegung interpretiert werden (Nebenführ et al., 1999). Die katalytische Domäne und/oder die restlichen Transmembrandomänen sind wahrscheinlich für die Assemblierung in Oligomere

und für eine Weiterreichung im Sekretorischen System wichtig. Nur richtig gefaltete Proteine können aus dem ER exportiert und weiter in den Golgi-Apparat geleitet werden. Die Untereinheiten der Cellulosesynthasen assemblieren im Golgi-Apparat zu Rosettenkomplexen und werden anschließend an die Plasmamembran geliefert, wo sie aktiviert werden (Somerville, 2006). Der Zusammenhalt der einzelnen Untereinheiten im Rosettenkomplex wird über Zink-Finger-Domänen am N-Terminus hergestellt (Kurek et al., 2002). Diese Zusammenlagerung könnte durch den cytosolischen *loop* und die C-terminalen Transmembrandomänen unterstützt werden.

Mit dem Konstrukt CESA1-Laterne-GFP sollte ein Konstrukt erstellt werden, bei dem das GFP in das Lumen des ER bzw. des Golgi-Apparates zeigt sowie in den extrazellulären Raum, falls das Fusionsprotein in die Plasmamembran inseriert. Dies hätte den Vorteil, dass das GFP-Protein außen liegt und die cytosolische Domäne nicht behindern würde. Bei dieser Fusion erhielt das CESA1-full-GFP noch eine weitere Transmembrandomäne, so dass das GFP auf der Lumen-Seite der Membran liegt. Dieser zusätzliche Membrandurchgang stammt aus der Kartoffel-GNTI-Sequenz. Die Länge der Membrandomäne ist in dem Golgi-ständigem Protein GNTI kürzer (15 Aminosäuren) als die Membrandomänen von CESA1 (19-24 Aminosäuren). In tierischen Zellen wurde gezeigt, dass die Länge des hydrophoben Membranankers in Klasse II-Membranproteinen für die „Reichweite“ der Lokalisation im Sekretorischen System entscheidend ist (Munro, 1995; für Klassifizierung integraler Membranproteine siehe Singer, 1990). Eine Beziehung zwischen dem Membrandurchmesser und der Länge der Transmembrandomäne auf die Lokalisation konnte in Pflanzen bis jetzt nur bei einem Klasse I-Membranprotein gezeigt werden (Brandizzi et al., 2002). Saint-Jore-Dupas et al. (2006) diskutieren, dass der Zusammenhang von Membranankerlänge mit der Lokalisation im Sekretorischen System eher Klasse I-Membranproteine und weniger die Klasse II-Proteine betrifft. Bei Klasse II-Proteinen sollen zusätzliche Lokalisationssignale im cytosolischen Teil des Proteins wichtig sein. Bei CESA1 handelt es sich um ein Klasse III-Protein mit mehreren Membrandurchgängen. Ob das Anhängen einer weiteren Membrandomäne die Lokalisation ändert, ist fraglich. Für eine neue Version des Konstruktes wäre es sinnvoll die Membrandomäne an die Länge der CESA1-Domänen anzupassen, indem eine GNTI-Mutante mit einer 21 Aminosäuren lange Transmembrandomäne an CESA1 fusioniert wird (GNTI-GFP-Mutante R11/R27 L; Stephan Rips, Diplomarbeit), um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Fusionsprotein durch die kürzere Membrandomäne zurückgehalten werden könnte. Dennoch könnte es sein, dass das Fusionsprotein durch die zusätzliche Transmembrandomäne nicht über die Faltungskontrolle im ER hinwegkommt.

Das Konstrukt CESA1-Laterne-GFP zeigte jedoch in allen Versuchen einer Überexpression Probleme in der Transformationseffizienz, so dass nur in sehr wenigen Protoplasten das Konstrukt detektierbar war. Bei den wenigen mit CESA1-Laterne-GFP erfolgreich transformierten Zellen zeigte sich die Fluoreszenz im Golgi-Apparat, was auch auf die Dominanz von GNTI-short zurückzuführen sein könnte. Auf Grund der schlechten Transformationseffizienz und der kurzen Membrandomäne wurde dieses Konstrukt jedoch nicht weiter verwendet.

Als ein weiteres Konstrukt wurde YFP-CESA1- Δ 15-full hergestellt, bei dem CESA1-full C-terminal an YFP fusioniert worden ist. Dieses Konstrukt sollte das Gegenstück zu CESA1-full-GFP sein, bei dem eine N-terminale Fusion mit GFP vorliegt. Die Klonierung war nicht erfolgreich, da durch die Schnittstellen SalI und XhoI, die kompatible Überhänge generieren, das Insert immer in der falschen Orientierung inserierte. Der Wahrscheinlichkeit nach bestünde dennoch eine 50%ige Möglichkeit für die richtige Orientierung, aber in allen Versuchen entstanden nur Vektoren mit der falschen Orientierung von CESA1. Vielleicht nehmen das CESA1-Insert und der Vektor bei der Ligation eine bestimmte Konformation an, die eine Verknüpfung der DNA-Fragmente nur in einer Richtung ermöglichen. Daher erfolgte die Klonierung über eine interne Restriktionsschnittstelle in der *CESA1*-Sequenz. Diese alternative Strategie verkürzte die *CESA1*-Sequenz um 45 Basen (entspricht 15 Aminosäuren).

YFP-CESA1- Δ 15-full war von der Lokalisation in Protoplasten dem CESA1-full-Konstrukt recht ähnlich, da die Fluoreszenz schwach im ER und vorwiegend im Golgi-Apparat zu detektieren war. Somit scheinen die fehlenden Aminosäuren keinen Einfluss auf die Lokalisation im Golgi-Apparat zu haben. Der N-Terminus spielt eine wichtige Rolle für den Zusammenhalt der Cellulosesynthase-Untereinheiten in den Rosettenkomplexen. Über Zink-bindende Domänen können sich zwei Untereinheiten zusammenlagern und ein Dimer bilden (Kurek et al., 2002). In CESA1 aus Arabidopsis erstreckt sich die Zink-bindende Domäne am N-Terminus von der 10. - 30. Aminosäure. Diese Funktion könnte durch das Fehlen der 15 Aminosäuren gestört sein, was eine erfolgreiche Assemblierung der CESA1-Untereinheiten verhindert und somit auch eine Weiterleitung von YFP-CESA1- Δ 15-full an die Plasmamembran unterbinden könnte.

Beide CESA1-Konstrukte, die mit KOR1-OFP co-exprimiert wurden, zeigten keine oder kaum eine Co-Lokalisation. CESA1-short-GFP scheint wie KOR1-OFP am Rand der Zelle zu lokalisieren. Aber bei der Überlagerung des GFP- und OFP-Kanals wird deutlich, dass die Fluoreszenzen nicht exakt übereinander liegen. Wie schon gezeigt, lokalisiert CESA1-short-

GFP im ER. Da KOR1 auch über das ER transportiert wird, um an die Plasmamembran zu gelangen, können damit die weißen Pixel die geringfügige Co-Lokalisation mit CESA1-short-GFP erklären. Jedoch ist eine echte Co-Lokalisation an der Plasmamembran nicht zu beobachten. Die Co-Expression von KOR1-OFP mit CESA1-full-GFP zeigte eine deutlichere Trennung der beiden Fluoreszenzen. Zwar sind auch in der Überlagerung der Schnittebene des Protoplasten einige weiße Pixel zu sehen, aber der Großteil zeigte keine Co-Lokalisation. Bei der Aufsicht auf den Protoplasten wird deutlich, dass Korrigan außen an der Plasmamembran lokalisiert und die grüne Fluoreszenz von CESA1-full-GFP im Inneren des Protoplasten liegt. Von KOR1 wurde lange vermutet, dass es ein integraler Teil des Rosettenkomplexes der Cellulosesynthase-Untereinheiten ist. Co-Präzipitationsversuche mit jeweils einem Histidin-markierten KORRIGAN oder CESA7 konnten diese Vermutung nicht bestätigen (Szyjanowicz et al., 2004).

Neuere Ergebnisse von Paradez et al. (2006) beschreiben ein YFP-Konstrukt von CESA6, das an der Plasmamembran lokalisiert und mit Mikrotubuli assoziiert ist. Dieses CESA6-Konstrukt wurde stabil in der *CESA6*-Nullmutante unter dem endogenen Promotor exprimiert (*prc1-1*, *procuste1*, Fagard et al., 2000). Demnach exprimieren die Zellen ausschließlich das mit dem Fluoreszenzprotein markierte CESA6-Protein und es findet keine Überexpression statt, wie es mit einem 35S-Promotor der Fall ist. YFP-CESA6 komplementiert den Phänotypen der *CESA6*-Nullmutante, womit gezeigt wurde, dass das Fusionsprotein funktional ist. Das YFP-CESA6 wird durch den endogenen Promotor in den Mengen synthetisiert, in denen es auch in der Pflanze natürlicherweise vorkommt. Paradez et al. (2006) beschreiben jedoch zusätzlich punktförmige Kompartimente, in denen YFP-CESA6 auftritt, die mit einem Golgi-Marker co-lokalisieren. Bei der transienten Expression von CESA1-full-GFP unter dem 35S-Promotor in Wildtyp-Protoplasten findet wahrscheinlich eine Übersättigung von CESA1-Proteinen in der Zelle statt und die überzähligen Proteine akkumulieren im ER/Golgi-Apparat. Ein Rosettenkomplex besteht aus verschiedenen Untereinheiten von Cellulosesynthasen (Doblin et al., 2002). Vermutlich ist das Verhältnis der Cellulosesynthase-Untereinheiten untereinander durch die Überexpression nicht ausgewogen, so dass zu viele CESA1 in der Zelle sind und keine Partner zur Ausbildung der Rosettenkomplexe finden. Sollten doch vereinzelte CESA1-full-Proteine an die Plasmamembran gelangen, können sie dort eventuell nicht detektiert werden, da die Fluoreszenz im ER/Golgi-Apparat stärker ist und dieses Signal überstrahlt. Für detailliertere Co-Lokalisationsstudien wäre eine stabile CESA1-Linie (WT und in Nullmutante) sinnvoll. Diese Linien könnten protoplastiert werden und zu Co-Expressionsstudien mit einem weiteren

Konstrukt transformiert werden, so dass eine Übersättigung mit CESA1-Protein verhindert werden würde.

4.2 Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-2-Hybrid-System

Mit dem Hefe-2-Hybrid-System können Protein-Protein-Interaktionen aufgedeckt werden. Der erste Versuch Interaktionspartner von CESA1-*loop* zu identifizieren, erfolgte mit dem System MATCHMAKER der Firma Clontech. Dieses Hefe-2-Hybrid-System beruht auf der Methode des Verschmelzens von zwei haploiden Hefezellen mit unterschiedlichem *mating type* (a und α). Dazu musste zuerst ein Hefestamm (Y190) mit dem *bait*-Protein (BD-Vektor) und ein zweiter Hefestamm (AH109) mit einer cDNA-Bank (AD-Vektor) transformiert werden, die aliquotiert als Glycerinkulturen archiviert wurde. Beim *mating* der beiden Hefezellen wurden nur unzureichende Effizienzen erreicht. Die erhaltenen Interaktionspartner konnten später durch weitere Analysen auch nicht bestätigt werden (*in vitro*-Translation der Proteine mit ^{35}S -Methionin und anschließender Co-Immunpräzipitation). Daraufhin wurde die Analyse-Methode geändert und ein anderer Hefestamm (Y187) mit dem BD-Konstrukt transformiert und diese Hefe:BD-Vektoren in einem größeren Ansatz mit der reinen AD-DNA (AD-Vektor mit der cDNA-Bank inseriert) co-transformiert. Diese zweite Methode ist an das HybriZAP-2.1-System der Firma Stratagene angelehnt und zeigte bessere Ergebnisse und ermöglichte auch schon eine frühere Identifizierung von falsch-positiven Kandidaten, die dann ausgesondert werden konnten.

4.2.1 Mögliche Interaktionspartner der Cellulosesynthase A1 in Arabidopsis

In der Hefe-2-Hybrid-Analyse mit CESA1-*loop* wurden fünf mögliche interagierende Proteine ermittelt, die in der Tab. 3.1 aufgeführt sind. Alle Kandidaten scheinen auf den ersten Blick cytosolische Proteine zu sein, die somit auch *in planta* mit dem cytosolischen *loop* interagieren könnten. Im Folgenden wird auf die einzelnen Kandidaten näher eingegangen.

4.2.1.1 Proteine aus der *Bcl-2-associated athanogene*-Familie (BAG-Proteine)

Zwei Proteine aus der BAG (*Bcl-2-associated athanogene*)-Familie wurden im Hefe-2-Hybrid-*screen* als Interaktionspartner für den cytosolischen *loop* identifiziert. Die Bezeichnung BAG ist von den tierischen BAG-Proteinen abgeleitet, welche eine Familie von Chaperon-Regulatoren darstellen, die Funktionen bei der Zellteilung, Stresssignal-

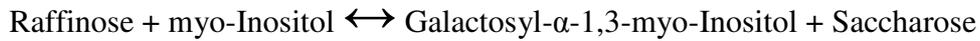
weiterleitung und Einstellung des Wachstums bis hin zum Zelltod einnehmen können. Es wurden sieben pflanzliche BAG-Proteine identifiziert, die ebenso multifunktional sind und ausgesprochene Ähnlichkeiten zu ihren tierischen Pendants zeigen, indem sie z. B. bei Apoptose-ähnlichen Prozessen (Pathogenbefall, abiotischer Stress und Entwicklung) involviert sind (Doukhanina et al., 2006). Diese Proteine besitzen eine konservierte Region nahe dem C-Terminus die als BAG-Domäne bezeichnet wird und aus einer Hsp70/Hsc70-Interaktionsdomäne (Hsp – *heat shock protein*, Hsc – *heat shock cognate*) besteht. Der N-Terminus variiert unter den sieben Familienmitgliedern. Bei den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen BAG-Proteine handelt es sich um BAG1 und BAG3. Diese beiden Vertreter weisen eine analoge Organisation mit einer Ubiquitin-ähnlichen Domäne am N-Terminus auf und werden auf Grund ihrer Aminosäuresequenz als cytosolische Proteine vorhergesagt. Pflanzliche BAG-Proteine koordinieren die Signale für das Zellwachstum, die Induktion des *cell survival pathways* sowie die Unterdrückung des programmierten Zelltods als Antwort auf Stress (Doukhanina et al., 2006). Eine Interaktion von CESA1 mit einem Mitglied aus der BAG-Familie könnte durchaus zweckmäßig sein, da die BAG-Proteine eine wichtige Rolle beim Zellwachstum spielen können. Kontrolle und Anpassung der Zellwandsynthese an den Bedarf der Zelle während des Zellwachstums sind essentiell. So könnte diese Regulation über die BAG-Proteine stattfinden, indem die Aktivität von CESA1 durch eine Protein-Protein-Interaktion gehemmt oder gesteigert bzw. die Rosettenkomplexe aktiviert oder inaktiviert werden. Eine Interaktion könnte auch als Kontrolle der Funktionalität der Rosettenkomplexe dienen. Die Bindungen von BAG-Proteinen an CESA1-Untereinheiten könnte als Signal für den Abbau gedeutet werden.

4.2.1.2 Protein der Glycosylhydrolase-Familie 36

Ein weiterer Kandidat für eine Interaktion mit CESA1 stellt das Expressionsprodukt des Genes *din10* (*dark inducible 10*) dar, das beim Vergleich der Sequenz mit der Arabidopsis-Datenbank als Gen mit der Identifikationsnummer At5g20250 identifiziert wurde. Dieser mögliche Interaktionspartner wurde im *screen* wiederholt identifiziert. Das Gen *din10* codiert für ein Mitglied aus der Glycosylhydrolase-Familie 36 (mehr unter <http://www.cazy.org/fam/GH36.html>). Zusätzlich hat es Ähnlichkeiten zu Sip1 (*seed imbibition protein*), das eine Raffinosesynthase-Domäne besitzt. Ein anderer Vergleich zeigt Ähnlichkeit zu einer alkalischen α -Galactosidase (siehe Einträge zu der Gennummer At5g20250 bei www.arabidopsis.org). Das Ergebnis des Sequenzvergleiches scheint dem Gen unterschiedliche Proteine zu zuordnen. Doch allen Proteinen ist die Domäne der

Raffinosesynthase (RaSy) gemein, die die glykosidische Bindung der α -Galactosidase spalten/bilden kann.

RaSy katalysiert folgende Reaktion:



Raffinose, ein Trisaccharid aus den Einfachzuckern Galactose, Glucose und Fructose, fungiert in Pflanzen oft als Kohlenhydratspeicher in Samen. Oligosaccharide der Raffinose-Familie besitzen eine Galactosylbindung vom α -Typ. Bei Zuckermangel können diese Raffinosen durch das Initialenzym des Raffinosekatabolismus, die α -Galactosidase oder durch die RaSy gespalten werden und die so freigesetzten Zucker in den Stoffwechsel eingeleitet werden (Carmi et al., 2003).

RaSy könnte auch beim symplastischen Transport von Assimilaten in das Phloem gegen den bestehenden osmotischen Druckgradienten eine Rolle spielen. Nach der Hypothese des „Polymerfallen-Modells“ von Turgeon (1996) findet die Synthese von Raffinose und weiteren Oligosacchariden (sog. RFO: Raffinose-Familie Oligosaccharide) in den Intermediärzellen statt. Demnach diffundiert Saccharose entlang des Konzentrationsgradienten in die Intermediärzellen und dient dort zur Synthese der RFO. Durch die Bildung von Raffinose aus dem Transportzucker Saccharose und myo-Inositol wird eine Rückdiffusion von niedermolekularen Edukten wie z.B. der Saccharose aufgrund einer entsprechenden Ausschlussgröße der Plasmodesmata zwischen Mesophyll und Intermediärzellen verhindert.

Durch Abspaltung der Galactose von der Raffinose entsteht Saccharose. Saccharose wiederum ist das Substrat für die Saccharosesynthase (SuSy), die dieses Disaccharid durch Anlagerung von UDP in Fructose und UDP-Glucose spalten kann. UDP-Glucose ist das direkte Substrat für Cellulosesynthasen.

Die Genexpression von *din10* wird innerhalb von drei Stunden im Dunkeln, in seneszenten Blättern und bei Behandlung mit Photosyntheseinhibitoren induziert, also wenn der Stoffwechsel von *source* auf *sink* umgesteuert wird. Die Genexpression ist wahrscheinlich Antwort auf den Zuckerstatus in der Zelle. Bei Saccharosemangel wird die Expression induziert und trägt zum Überleben der Pflanze unter Zuckermangelbedingungen durch die Bereitstellung von alternativen Energiequellen beim Ausfallen der Zuckerbereitstellung durch die Photosynthese bei (Fujiki et al., 2000).

Eine Bindung der RaSy an CESA1 könnte das *channelling* von Substraten erleichtern, in dem es die entstehende Saccharose an SuSy weiterleitet, die wiederum das Substrat für CESA herstellt. Amor et al. (1995) beschrieben erstmals eine Membran-assoziierte Form von SuSy

und deren besondere Bedeutung für die Cellulose- und Callose-Synthese, was die Vermutung eines *channellings* untermauert.

4.2.1.3 Ein genereller Regulierungsfaktor (GRF3)

Ein weiteres Protein, das zweimal in dem *screen* identifiziert wurde, ist GRF3 (*general regulatory factor 3*), ein 14-3-3-Protein. Die ersten 14-3-3-Proteine in Pflanzen wurden als G-Box-bindende Proteine identifiziert. Die G-Box ist ein DNA-Abschnitt innerhalb von Promotoren, durch die die Genexpression vieler Stress-induzierter Gene reguliert wird (Rooney and Ferl, 1995). 14-3-3-Proteine binden über Phosphoserin-vermittelte Interaktionen an eine Vielzahl von Proteinen, die so in ihrer Aktivität reguliert werden können und sie spielen eine entscheidende Rolle in vielen metabolischen Synthesewegen. Eine Bindung von 14-3-3-Proteinen kann die Lokalisation, die Stabilität, den Phosphorylierungsstatus und die Aktivität des Zielproteins verändern. Im Kohlenstoffwechsel regulieren 14-3-3-Proteine Schlüsselenzyme wie Saccharosephosphatsynthase (SPS), Stärkesynthase und ADP-Glucosesynthase (Cao et al., 2007 und Zitate darin). Die Cellulosesynthase hat bei der Synthese von Cellulosefibrillen einen hohen Verbrauch an UDP-Glucose. Daher muss die Verteilung der Zucker innerhalb der Stoffwechselwege in der Pflanze gut koordiniert werden, um bei Engpässen die lebenswichtigen Stoffwechselforgänge aufrecht zu erhalten, während andere Stoffwechselwege reduziert oder abgeschaltet werden. 14-3-3-Proteine werden auch durch biotischen und abiotischen Stress wie z. B. Pathogenattacken, Kälte, Salzstress und Trockenheit reguliert (Cao et al., 2007). Eine direkte Signalweiterleitung von der Cellulosesynthese zum Kern wäre der schnellste Weg die Stoffwechselforgänge zu steuern.

4.2.1.4 Ein Motorprotein (*kinesin light chain-related Protein*)

Als häufigster im Hefe-2-Hybrid-System identifizierter Interaktionspartner der CESA1 trat die Motorproteinuntereinheit *kinesin light chain-related Protein* (KLC) mit der Gen-Identifikationsnummer At4g10840 auf. Die Häufigkeit dieser Interaktion könnte darauf hindeuten, dass es sich um eine sehr wichtige Interaktion handelt oder, dass das identifizierte Protein in großen Mengen vorkommt und dadurch in der cDNA-Bank übermäßig repräsentiert ist. Kinesin ist ein in allen Eukaryotenzellen vorhandenes Protein, das als Tetramer aus je zwei gleichartigen leichten und schweren Ketten aufgebaut ist. Ein Kinesin besitzt unter anderem ein Paar globuläre Köpfe, die einen Mikrotubulus binden und als ATP-hydrolysierende, Kraft-erzeugende Maschine dienen. Zu jedem Kopf (Motordomäne) gehören ein Hals, ein stäbchenförmiger Stiel und ein fächerförmiger Schwanz, der an die Fracht bindet (Buchanan et al., 2000). Der C-Terminus der leichten Kette enthält mehrere *tetraricopeptide*

repeats (TPRs) (D'Andrea and Regan, 2003). Diese 34 Aminosäuren umfassenden TPRs vermitteln die Protein-Protein-Interaktionen, d. h. die Bindung des Kinesins mit der Ladung, und sind somit bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen involviert (z. B. Zellzyklusregulation, Transkriptionskontrolle, Proteintransport zu Mitochondrien und Peroxisomen und Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zu weiteren Membrankompartimenten) (Abb. 4.1).

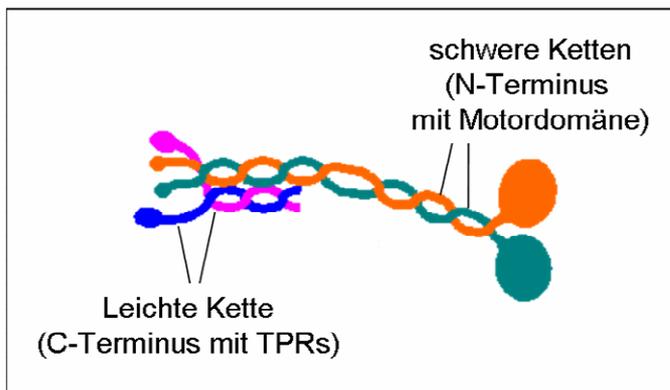


Abb. 4.1: Modell eines Kinesinproteins. Die zwei leichten Ketten (rosa und blau) vermitteln mit den TPRs die Protein-Protein-Interaktionen mit der Fracht, die befördert werden soll. Die schweren Ketten (orange und grün) binden mit ihrem C-Terminus ebenfalls an der Fracht. Der N-Terminus enthält die Motordomäne, die an ein Mikrotubulus bindet und sich durch ATP-Hydrolyse daran entlang bewegen kann.

In Kooperation mit anderen Motorproteinen wie Myosin und Dynein sind die Kinesine wesentlich am intrazellulären Transport von Makromolekülen, Vesikeln und Zellorganellen beteiligt. Die leichte Kette des Kinesins könnte durch die Bindung an CESA1 helfen die Vesikel mit den Rosettenkomplexen vom Golgi-Apparat entlang des Cytoskeletts (Mikrotubuli) an die Plasmamembran zu führen.

Paradez et al. ist es 2006 gelungen die Fortbewegung von CESA6 an den kortikalen Mikrotubuli in Pflanzenzellen zu beobachten. Für die Ablagerung der Cellulosemikrofibrillen haben sich über die Jahre mehrere Hypothesen entwickelt (Übersicht in Emons and Mulder, 2000). Eine davon besagt, dass die Mikrotubuli eine Art Schienensystem ausbilden, an dem die Rosettenkomplexe entlanglaufen während sie die Cellulose synthetisieren. So könnte es möglich sein, dass KLC die Verbindung von den Rosettenkomplexen zu den Mikrotubuli darstellt (siehe Abb. 4.2).

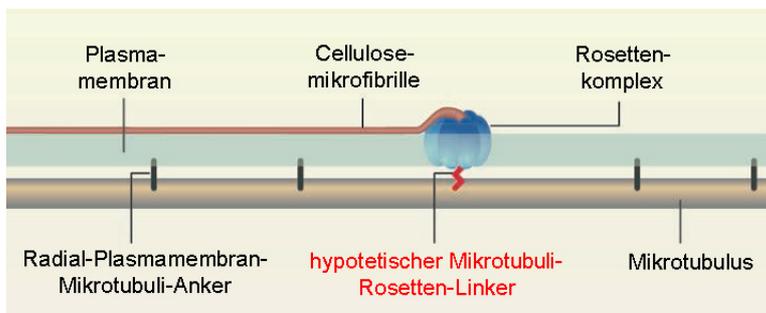


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Rosetten-Mikrotubuli-Schienensystem-Hypothese (Lloyd, 2006).

In einer Hefe-2-Hybrid-Untersuchung mit dem N-Terminus (Zink-bindende Domäne) der Cellulosesynthase 1 aus Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) wurde ein α -Tubulin, ein

Bestandteil von Mikrotubuli, identifiziert (Jacob-Wilk et al., 2006). Diese Interaktion unterstützt die von mir identifizierte Interaktion der cytosolischen Domäne von CESA1 und der leichten Kette des Kinesins. In der Publikation von Jacob-Wilk et al. (2006) wird die Abhängigkeit einer weiteren Interaktion vom Redoxstatus des *bait*-Proteins, der Zink-bindende Domäne, beschrieben, was für weitere Untersuchungen der Interaktionen sicherlich berücksichtigt werden sollte, um die erhaltenen Ergebnisse richtig zu interpretieren.

4.2.1.4.1 Lokalisation des *kinesin light chain-related Protein*

Da die Vorhersagen der Computerprogramme zur Lokalisation von KLC unzureichend und uneinheitlich waren, wurde eine N- und C-terminale Fusion des KLC mit OFP hergestellt. So konnte sicher gestellt werden, dass ein mögliches Signalpeptid, das durch eine der beiden Fusionen gestört worden wäre, frei vorliegt. Jedoch zeigten beide Fusionen, N- wie C-terminal, eine Lokalisation im Cytosol und im Zellkern von Protoplasten (siehe Abb. 3.8). Damit konnte die Vorhersagen, dass KLC in Plastiden lokalisiert ist, nicht bestätigt werden. Jedoch zeigten sich auch keine spezifischen Fluoreszenzen in Strukturen wie Golgi-Apparat, Mikrotubuli oder Membranen. Da es sich bei dem KLC nur um einen Teil eines größeren tetrameren Proteinkomplexes handelt, konnte eine Überexpression von diesem Teil ohne die weiteren Untereinheiten zu einer Übersättigung führen. Das überschüssige Protein findet keinen Partner zum Ausbilden des Proteinkomplexes und liegt ungebunden im Cytosol vor. Die Lokalisation im Zellkern ist überraschend, denn KLC ist 609 Aminosäuren lang und besitzt ein Molekulargewicht von 66 kDa und zusätzlich fusioniert daran das fluoreszierende Protein OFP mit einer Molekularmasse von ungefähr 25 kDa. Durch die pflanzlichen Kernporen können Proteine mit einer Größe von unter 60 kDa zwar langsam aber frei diffundieren (Meier, 2007). KLC-OFP besitzt aber eine Größe von über 90 kDa und die Sequenz von KLC besitzt keine Kernlokalisierungssequenz (Vorhersageprogramm für *Nuclear Localization Signal* (NLS) www.cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl). Wie kann dann eine Fluoreszenz im Kern detektiert werden, wenn das Fusionsprotein zu groß ist und es kein Kernlokalisierungssignal gibt? Wenn die Translation bei OFP-KLC nach dem OFP abbricht und nur das OFP translatiert werden würde, wäre eine Lokalisation im Kern möglich. Auch das KLC mit N-terminaler Fusion des OFP zeigt eine Fluoreszenz im Zellkern und Cytosol. Wenn die Translation in diesem Fall früher abbricht, dürfte kein Fluoreszenzprotein gebildet werden. Aber es könnte auch freies GFP beim Abbau der Fusionsproteine entstehen, die dann in den Kern gelangen und dort die Fluoreszenz verursachen.

4.2.1.4.2 Co-Expressionsanalysen von *kinesin light chain-related Protein* und Cellulosesynthase A1

Bei der Co-Expression von KLC und CESA1 zeigte sich die Lokalisation des Kinesins unverändert im Cytosol und im Zellkern (Abb. 3.9). Das YFP-CESA1- Δ 15-full-Konstrukt ist im sekretorischen System lokalisiert. Die netzartigen Strukturen stellen das ER dar und vereinzelt akkumulieren die CESA1-Proteine punktförmig im Golgi-Apparat. In den Überlagerungsbildern ist keine Co-Lokalisation der beiden Fusionsproteine zu sehen. Die überexprimierten Proteine befinden sich in getrennten Kompartimenten. Obwohl die CESA1-Domäne, mit welcher der Hefe-2-Hybrid-*screen* durchgeführt worden ist, ins Cytosol ragt und KLC cytosolisch vorliegt, konnte keine Co-Lokalisation oder eine veränderte Fluoreszenzverteilung während der Co-Expression festgestellt werden. Eventuell bedarf es bestimmter physiologischer Bedingungen, dass eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattfindet, die in diesen Protoplasten nicht gegeben waren (z. B. Redoxstatus, Phosphorylierungsstatus). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Proteine sich in ihrer natürlichen pflanzlichen Umgebung anders verhalten als in der Hefezelle. Der cytosolische *loop* von CESA1 könnte sich, wenn er für sich alleine exprimiert wird, anders falten und andere Strukturen ausbilden. Die Membrandomänen des gesamten CESA1-Konstruktes können auf die Konformation des Proteins Einfluss nehmen, da sie durch das Inserieren in der Plasmamembran sterische Vorgaben bilden, die in der Hefezelle nicht gegeben sind. An diesem Co-Expressionsversuch wird deutlich, dass eine Bestätigung der Interaktion von Proteinen nicht so einfach ist. Um die Interaktion zwischen CESA1 und den möglichen Kandidaten eindeutig zu beweisen, müssten weitere Methoden herangezogen werden. Möglich wäre z. B. die Visualisierung der Protein-Protein-Interaktion *in vivo* durch *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC), bei der in Protoplasten zwei nichtfluoreszierende Fragmente des YFP durch interagierende Proteine zu einem fluoreszierenden Komplex zusammengefügt werden (Bracha-Drori et al., 2004; Walter et al., 2004). Ein bedeutender Vorteil der BiFC-Methode wäre, dass alle Proteine, die keinen Interaktionspartner finden, auch nicht fluoreszieren können. Dies könnte das Hintergrundleuchten drastisch reduzieren und andere Bereiche, an denen die Interaktion möglicherweise stattfindet, erst sichtbar machen.

Insgesamt sind interessante Interaktionspartner einer möglichen Interaktion mit CESA1 gefunden worden. Es wäre durchaus lohnenswert die Kandidaten weiter zu untersuchen und eine Interaktion *in planta* zu bestätigen, um weitere Informationen über die Cellulosesynthese

und ihre Regulation zu erhalten. Doch durch die anfänglichen Schwierigkeiten beim Hefe-2-Hybrid-System wurde der Schwerpunkt vermehrt auf die Glykosylierung und die Auswirkung von Fehlglykosylierungen auf die Zellwandsynthese gelegt.

4.3 Die *cglI*-Mutanten und Kreuzungen mit diesen Mutanten

4.3.1 Mutationen in *cglI*

Die Glykosyltransferase GNTI überträgt ein GlcNAc auf die Glykanstruktur M5Gn2 und leitet damit den initialen Schritt zur Bildung von komplexen Glykanstrukturen im Golgi-Apparat ein. In dieser Arbeit wurden drei Mutationslinien von *cglI* verwendet. Die Mutationen in C5 und C6 wurden durch EMS hervorgerufen und in von Schaewen et al. (1993) als *nonstainer* deklariert. Die durch EMS erzeugte Punktmutation wurde mittels Sequenzierung der DNA-Sequenz ermittelt. Bei der Linie C5 entsteht durch die Punktmutation ein neues Glykosylierungsmotiv (Strasser et al., 2005). Die 144. Aminosäure ist in der WT-Sequenz ein Aspartat (D) wogegen in der C5-Mutante an dieser Stelle ein Asparagin (N) vorkommt. Im Konsens der Aminosäureabfolge im Protein wird aus der Folge DGS NGS. Damit entsteht ein neues Glykosylierungsmotiv der Form N-X-S/T. Diese Glykosylierungsstelle im C5-Protein wird nicht nur in Insektenzellen (Strasser et al., 2005), sondern auch in Pflanzen genutzt (AG von Schaewen, unveröffentlichte Daten).

In der Linie C6 bewirkt die Punktmutation eine Veränderung im Spleißsignal des 14. Introns. Beim Spleißen entsteht aus der prä-mRNA, die noch Introns enthält, die reife mRNA. Dabei werden die Introns entfernt und die angrenzenden Exons miteinander verknüpft. Das Spleißen findet in den meisten Fällen in einem großen Komplex aus RNA und Proteinen im Zellkern von Eukaryotenzellen statt. Dieser Komplex (Spleißosom) besteht aus mehreren Teilkomplexen und den snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), die wiederum aus verschiedenen Proteinen und snRNAs (*small nuclear RNAs*) zusammengesetzt sind. Die snRNPs erkennen die Grenzen zwischen Exons und Introns (Spleißstellen) und entfernen die Introns aus der prä-mRNA. Ein Klasse II-Intron wird von den Basen >gu....ag< abgegrenzt (Alberts et al., 2002). Bei der C6-Mutante ist das zweite g des Spleißsignals in ein a mutiert (>gu....aa<). Somit kann das 14. Intron nicht normal herausgespleißt werden. Nach der Mutationsstelle folgt jedoch ein weiteres g, welches, wenn es als neues Spleißsignal fungiert, zu einer Rasterverschiebung (+1) im folgenden Exon führt.

So ist im WT die Aminosäureabfolge im 14. Exon ³¹⁶GSSL... und in der C6-Mutante nach der Rasterverschiebung ³¹⁶GLVW... . Durch diese Rasterverschiebung läuft die Translation nach

13 Aminosäuren in ein Stoppcodon. Wenn das 14. Intron jedoch nicht herausgespleißt wird, läuft die Translation ebenfalls in ein Stoppcodon (nach 18 Aminosäuren). In Abb. 4.3 sind die drei Mutationen von den verwendeten Linien zusammengestellt.

Die T-DNA-Insertionsmutante *cgli-T* trägt die Insertion im 11. Intron mit der *right border* in Richtung 5'Region des Gens. Es handelt sich hierbei um eine einfache Insertion der T-DNA. Dass in den Mutanten eine Transkription der *CGLI*-DNA in mRNA auch stattfindet, wird in Abb. 3.15 deutlich. Durch die Primerkombination *CGL1_F+Ex3_R*, welche die 3'Region der cDNA amplifiziert, konnte gezeigt werden, dass in allen drei Mutanten, wie auch im WT, *CGLI*-mRNA vorhanden ist.

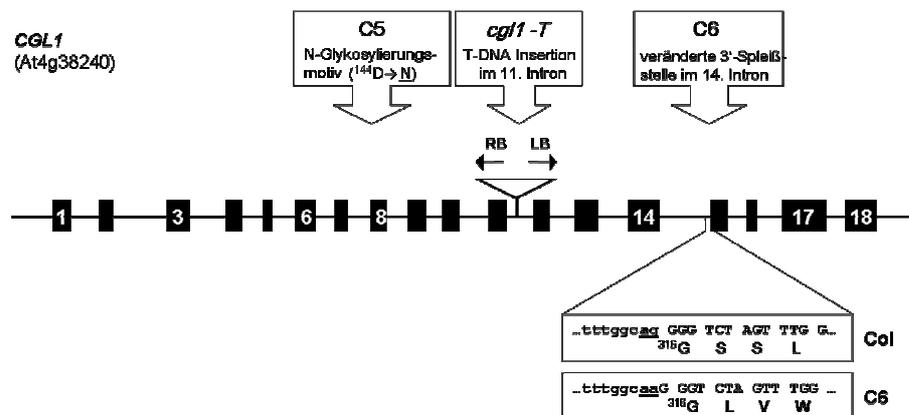


Abb. 4.3: Zusammenfassung der *cgli*-Mutanten *cgli-T*, C5 und C6. Dargestellt ist das *cgli*-Gen mit Exons (Kasten) und Introns und die Mutationen der drei Mutationslinien C5, C6 und *cgli-T*.

Ebenso wird der 3' Bereich des Gens in allen Mutanten in mRNA umgeschrieben, was mit der Primerkombination *Ex12/13_F+Ex18_R* bewiesen werden konnte. Der mittlere Teil der mRNA war nur bei den EMS-Mutanten und beim WT amplifizierbar. Bei *cgli-T* ist kein Produkt entstanden. Auch bei einer Verlängerung der Elongationszeit von bis zu 5 Minuten und bei Verwendung anderer Taq-Polymerasen konnte kein Amplifikat erzielt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die inserierte T-DNA in einer Struktur vorliegt, die durch Hitzedenaturierung nicht aufgetrennt werden kann, so dass die PCR kein Produkt liefert. Das 11. Intron mit der T-DNA-Insertion wird bei der Reifung der mRNA nicht herausgespleißt (Abb. 3.14). Wenn die T-DNA-Primer mit genspezifischen Primern kombiniert werden und als Matrize cDNA aus *cgli-T*-Pflanzen zugrunde liegt, entsteht ein PCR-Produkt. Die entstehenden Banden entsprechen in ihrer Größe den erwarteten cDNA-Fragmenten. Eine Amplifikation genomischer DNA ist durch den durchgeführten DNase-Verdau der isolierten RNA ausgeschlossen.

In der C6-Mutante wird durch die EMS-Mutation das Spleißsignal des Introns 14 verändert (Abb. 3.16). Mit Hilfe des Primers *In14_F*, der im 14. Intron bindet und verschiedenen

Gegenprimern, darunter auch Exon-überspannende Primer, konnte gezeigt werden, dass in den Mutanten C6 und *cgli-T* das 14. Intron nicht immer herausgespleißt wird. Mit dem Primerpaar Ex6_F+Ex17/18_R wird in allen Proben, bis auf *cgli-T*, ein Amplifikat, die der cDNA von 876 bp entspricht, synthetisiert. Bei *cgli-T* entsteht kein Produkt, weil durch die inserierte T-DNA unter den gegebenen Bedingungen keine Amplifikation möglich ist. Die untere Bande bei der C6-Mutante entspricht in der Größe der reinen cDNA ohne Introns. Die nach oben folgenden Banden entsprechen dieser cDNA mit jeweils einem Intron mehr (Sternchen geben die Introns an, die mit amplifiziert wurden). Dieses Phänomen ist auch bei *cgli-T* zu sehen (Abb. 3.16, In14_F+Ex17/18_R). Sobald ein Intron nicht korrekt gespleißt werden kann, hat es Auswirkungen auf darauf folgende Spleißereignisse. Die Zusammenführung der Exons startet am 5'-Ende der mRNA und wird Stück für Stück in 3'-Richtung durchgeführt (Neugebauer, 2006). Die Sequenzierung des C6 RT-PCR-Produktes in der cDNA-Größe der vollständig gespleißten Variante ergab, dass das 14. Intron entfernt wird und eine Verschiebung des Spleißsignals auf das nächste G erfolgt (Abb. 4.3). Jedoch wird dadurch eine Rasterverschiebung um +1 verursacht und es kommt zu einem Abbruch der Translation nach 13 zusätzlichen Aminosäuren. Falls aber das 14. Intron nicht alternativ gespleißt wird, da auch größere cDNA-Fragmente auf den Agarosegele zu sehen sind, die weitere Introns enthalten, würde die Translation der mRNA mit dem 14. Intron nach 18 falschen Aminosäuren ebenfalls in einem Stopp-Codon enden. Die Translation der *cgli-T*-mRNA bricht schon früher ab, denn bei einer Übersetzung des 11. Introns, wird die Translation nach vier zusätzlichen Aminosäuren mit einer Gesamtlänge von 237 Aminosäuren beendet. Die daraus resultierenden Proteine wären kürzer als das Wildtyp-Protein und es würde ein großer Teil der katalytischen Domäne mit der eigenen N-Glykosylierungsstelle bei ³⁵¹N fehlen (Abb. 4.4). In Eukaryonten ist der *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) beschrieben worden. NMD ist ein zellulärer Qualitätskontrollmechanismus, der mRNAs mit Nonsensemutationen (mRNA mit verfrühtem Stopp-Codon) eliminiert und die Synthese potenziell schädlicher verkürzter Proteine limitiert (Rehwinkel et al., 2006). Damit in Pflanzen der NMD nicht abläuft, sollte das Stopp-Codon im letzten Exon oder >50 Nukleotide abwärts von der letzten Exon-Exon-Verbindung liegen. Auch sollte die Länge des 3'UTR bei 200 - 300 Nukleotiden liegen (Hori and Watanabe, 2007). Da aber durch die RT-PCR-Untersuchung mRNA in allen *cgli*-Mutanten nachgewiesen werden konnte, wäre es möglich, dass der NMD-Mechanismus, im Falle eines nicht herausgespleißten Introns in Pflanzen, nicht greift.

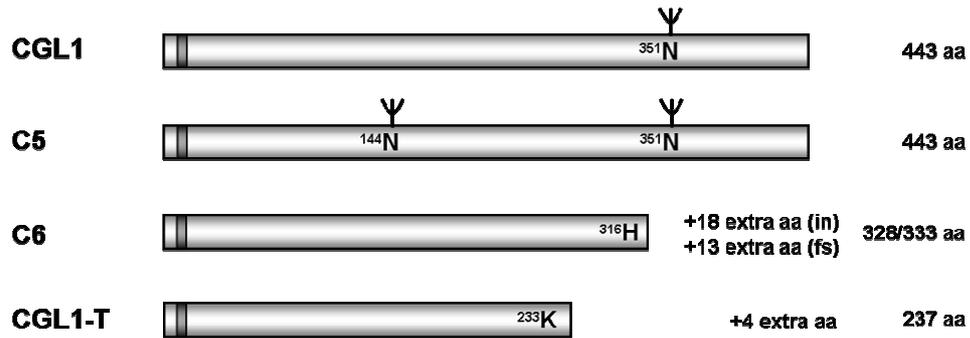


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Auswirkungen der Mutationen auf die CGL1-Proteine. Wenn die Translation der Proteine stattfindet, würden bei der C6- und *cgl1-T*-Mutante verkürzte Proteinsequenzen auftreten, die aufgrund des fehlenden C-Terminus nicht funktionsfähig wären. aa: Aminosäuren, in: Intron, fs: frameshift (Rasterverschiebung)

4.3.2 Charakterisierung der *cgl1*-Mutanten und deren Kreuzungen mit *stt3a-2*

Die beiden Einzelmutanten *cgl1-T* und *stt3a-2* zeigten bei 160 mM NaCl eine Reduktion des Wurzelwachstums und ein Anschwellen der Wurzelspitze (Kang et al., 2008). Die Kreuzung der *cgl1*-Mutanten mit *stt3a-2* sollte eine Verstärkung des Phänotyps hervorrufen, da in diesen Doppelmutanten erstens im Golgi-Apparat nicht komplex modifiziert und zweitens im ER seltener glykosyliert wird.

Die Doppelmutanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* zeigen auf dem Blot mit dem cgly-Antikörper keine Reaktion (Abb. 3.17), wodurch bewiesen werden konnte, dass diese Pflanzen keine komplexen Glykane bilden. Unerwartet war dagegen die Immunreaktion mit dem Antikörper bei Blattextrakten von C5 *stt3a-2*, die im Muster und in der Intensität der *stt3a-2*-Mutante glichen. Da die Färbung auf dem Blot der von *stt3a-2* entsprach, muss es an der C5-Mutation liegen, dass eine Reaktion mit dem cgly-Antikörper stattfand. Das C5-Protein scheint im *stt3a-2*-Hintergrund unterglykosyliert zu werden. Die beiden Glykosylierungsstellen können in unterschiedlichen Kombinationen mit einem Glykan besetzt werden (nur eine der beide, beide oder gar keine). Wird im *stt3a-2*-Hintergrund nur das ursprüngliche ³⁵¹N der beiden möglichen Glykosylierungsstellen mit einem Glykan verknüpft, dann erlangt das C5-Protein seine katalytische Aktivität wieder und der *cgl1*-Defekt kann kompensiert werden. Damit können nur die C6- und *cgl1-T*-Mutanten als wahre Nullmutanten für *cgl1* gezählt werden.

Der auf den Hartagarplatten deutlich werdende Phänotyp beider Doppelmutanten C6 *stt3a-2* und *cgl1-T stt3a-2* (verzweigtere, kürzere Wurzeln, längere und dünnere Wurzelhaare) kann auf Probleme bei der Zellelongation, der Zellwandbildung oder bei der Differenzierung und Entwicklung der Wurzelhaare hindeuten (Abb. 3.12 und 3.13). Da in der Doppelmutante zwei

N-Glykosylierungsdefekte zusammenkommen, lag der Schluss nahe, dass das oder die betroffenen Proteine Glykoproteine sind, die zur Zellwandsynthese beitragen.

Die Mutanten *cgl1-T* und *stt3a-2* zeigten auf salzhaltigen Agarplatten einen *rsw*-Phänotyp (Kang et al., 2008). Dieser *rsw*-Phänotyp konnte bei drei Mutanten beobachtet werden: *rsw1* betrifft CESA1 (Arioli et al., 1998), *rsw2* die Endoglucanase KOR1 (Nicol et al., 1998) und *rsw3* die Glucosidase II (Burn et al., 2002). Als ein möglicher Kandidat wurde das Glykoprotein KOR1, mit 8 möglichen N-Glykosylierungsstellen, in Betracht gezogen, weil die Glucosidase II nicht an der N-Modifikation im Golgi-Apparat beteiligt ist und CESA1 nicht glykosyliert wird. Daher blieb der wahrscheinlichste Kandidat KOR1, der durch die Glykosylierungsdefekte betroffen sein könnte und eine wichtige Rolle bei der Cellulosesynthese an der Plasmamembran und bei Zellteilungen spielt (Peng et al., 2002, Zuo et al., 2000, Lane et al., 2001). Dass einige der acht möglichen Glykosylierungsstellen von KOR1 in Pflanzen auch genutzt werden, konnte mit dem KOR1-Antikörper anhand des Migrationsverhaltens der Proteine aus Glykosylierungsmutanten nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.4.4). Die KOR1-Mutante *rsw2-1* zeigt bei erhöhter Temperatur ein Schwellen der Wurzelspitze und bestätigt somit einen Einfluss auf das Wurzelwachstum. In der Literatur sind viele weitere Wurzelhaar-Phänotypen beschrieben, so z. B. KOJAK, ein *cellulose synthase-like*-Protein, das ebenfalls glykosyliert wird. Bei einem Defekt dieses Gens bilden die betroffenen Pflanzen keine Wurzelhaare aus (Favery et al., 2001). Die Mutante COBRA (COB) scheint wichtig für die gerichtete Zellexpansion in Wurzeln zu sein (Benfey et al., 1993, Hauser et al., 1995, Roudier et al., 2005). Bei COB handelt es sich möglicherweise um ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Protein, das hauptsächlich in der Plasmamembran der Längsseite von Wurzelzellen vorkommt. Es besitzt neun mögliche N-Glykosylierungsmotive, die auch zumindest zum Teil genutzt werden, was durch einen Verdau von Wurzelextrakt und Mikrosomenfraktionen durch PNGase F nachgewiesen worden ist (Roudier et al., 2005). Da PNGase F keine *core*-fucosylierten Glykane abtrennt, ist die größere Mobilität der behandelten COB-Proteine nur durch *high-mannose* Glykane hervorgerufen. Doch dadurch ist nicht gezeigt, dass COB keine komplexe Glykane besitzt. In der Doppelmutanten *cgl1-T stt3a-2* könnte das COB-Protein falsch glykosyliert werden und dadurch die Regulationsstelle für das gerichtete Wurzelwachstum gestört sein und die geschwollenen Wurzelzellen sowie die vermehrten und langen Wurzelhaare hervorrufen.

Viele Membranproteine unterliegen einem *cycling* an die Plasmamembran und von dieser zurück zu intrazellulären Kompartimenten. Diese Transportvorgänge scheinen ein Regulationsmechanismus zur Kontrolle des Zellwandmetabolismus zu sein (Johansen et al.,

2006). Durch den veränderten Glykosylierungsstatus der Plasmamembran-ständigen Glykoproteine (z. B. KOR1) könnten diese Transportvorgänge gestört werden. In Johansen et al. (2006) wird der intrazelluläre Transport von CESA-Isoformen und KOR1 als Schlüsselrolle bei der entwicklungsgemäßen und umweltbedingten Regulation der Cellulosesynthese vermutet.

Da Defekte in der N-Glykosylierung alle Glykoproteine einer Zelle betreffen, können weitere Proteine an der Ausbildung des beschriebenen Phänotyps der Doppelmutante beteiligt sein. Die durch die Doppelmutante hervorgerufenen Schäden zeigen nicht so drastische Auswirkungen, da die Doppelmutanten lebensfähig sind, ein gutes Wachstum zeigen und auch in der Lage sind Samen auszubilden. Dadurch können die Mutanten kultiviert werden, was den Vorteil hat, dass an diesen Mutanten weitere Analysen durchgeführt werden können, um die N-Glykosylierung in Pflanzen zu untersuchen.

4.3.3 KOR1-OFP-Expression in den *cgl1-T*-, *stt3a-2*-Einzelmutanten und der *cgl1-T stt3a-2*-Doppelmutante

Wie im vorherigen Kapitel schon erwähnt, bewirkt eine Mutation im Glykoprotein KOR1 den gleichen Phänotyp wie bei salzgestressten *stt3a-2* oder *cgl1-T*-Mutanten. Daher stellte sich die Frage, wie KOR1 sich in den Glykomutanten verhält. Wird KOR1 noch über das Sekretorische System an die Plasmamembran gebracht? Akkumuliert es vielleicht in einem Kompartiment des Sekretorischen Systems oder wird es ins Cytosol geschleust, wo es durch die *endoplasmic reticulum associated protein degradation* (ERAD) abgebaut wird? Für die Klärung dieser Fragen wurde das KOR1-Protein mit dem N-Terminus des OFP fusioniert (KOR1-OFP) und transient in Mutantenprotoplasten exprimiert.

Die Fluoreszenzverteilung von KOR1-OFP beschränkte sich größtenteils auf den peripheren Bereich der Protoplasten. Es handelt sich bei diesen Fluoreszenz-markierten Strukturen nicht um ER, denn die würden sich durch die gesamte Zelle ziehen und auch um den Zellkern sichtbar sein. Auffällig war, dass die fluoreszierenden Proteine sich in der Plasmamembran nicht gleichmäßig verteilen, sondern gruppiert vorlagen. Aufgrund der bei der Protoplasten-Isolation verdauten Zellwand kommt es in den Protoplasten schnell und verstärkt zu einer Neusynthese von Cellulose. So könnten die gruppierten fluoreszierenden KOR1-OFP-Proteine verstärkte Cellulosesynthese-Aktivität anzeigen. Korrigan ist an der Cellulosesynthese beteiligt, jedoch nicht in die Rosettenkomplexe der Cellulosesynthese-Untereinheiten integriert (Peng et al., 2002). Nachgewiesen wurde die Lokalisation von KOR1 in der Zellplatte von sich teilenden Tabak BY2-Zellen (Zuo et al., 2000). Bei dem von

Zuo et al. verwendeten Fusionsprotein fehlten C-terminal drei Aminosäuren des KOR1. Dass diese verkürzte Sequenz die Lokalisation in der Plasmamembran verhindert, ist allerdings unwahrscheinlich. Zellwand-produzierende Protoplasten und teilende BY2-Zellen sind wahrscheinlich nicht vergleichbar, da sie sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und physiologischen Zuständen befinden.

KOR1-OFP gelangt in den Protoplasten aller Mutanten an die Plasmamembran. Dies beweist, dass eine korrekte Glykosylierung von KOR1 nicht ausschlaggebend für die Lokalisation an der Plasmamembran ist. Die Menge von KOR1-OFP, die pro Zeiteinheit an der Plasmamembran lokalisiert, variiert jedoch in den Mutanten sehr. In *cgl1-T* verteilt sich das KOR1-OFP an der Plasmamembran rund um den Protoplasten. In dieser Mutante werden alle Glykosylierungsstellen von KOR1 mit einem Glykan versehen, jedoch verbleiben diese Glykane auf Stufe von M5Gn2 stehen, da der 2. Schritt der Glykanmodifizierung blockiert ist. Es werden keine komplexen Zucker gebildet. Anders verhält es sich bei der Mutante *stt3a-2*. Hier werden nicht alle der 8 möglichen Glykosylierungsstellen mit einem Glykan versehen, sondern unterschiedlich viele pro KOR1-Protein (siehe „unscharfes“ Korrigansignal in *stt3a-2*-Spur, Abb. 3.28). Die Glykane werden auf dem Weg durch das Sekretorische System normal modifiziert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass es für die korrekte Lokalisation von KOR1 wichtig ist, alle Glykosylierungsstellen mit einem Glykan, das zwar nicht komplex modifiziert ist, zu versehen, als einige Glykosylierungsmotive auszulassen. Damit kämen im Vergleich zu den *cgl1-T*-Protoplasten weniger GFP-markierte Proteine pro Zeiteinheit an der Plasmamembran von *stt3a-2*-Protoplasten an. Werden beide Mutationen in der *cgl1-T stt3a-2*-Doppelmutante kombiniert, verstärkt sich der Effekt und KOR1-GFP kann kaum noch an der Plasmamembran detektiert werden. In der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* ist nach 24 Stunden die Fluoreszenz im Golgi-Apparat zu detektieren, der auf dem Weg zur Plasmamembran passiert werden muss. Der Proteintransport scheint in der Doppelmutante verzögert oder auf eine Weise gestört zu sein, dass die KOR1-Fusionsproteine nicht effektiv an die Plasmamembran gelangen können wie in den Einzelmutanten.

4.3.4 Kreuzungen von *cgl1-T stt3a-2* mit *rsw1-1* und *rsw2-1* in Kombination

Die Kreuzung von *cgl1-T* und *stt3a-2* sowie die daraus resultierende Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* sind schon im vorherigen Abschnitt beschrieben worden. In diesem Abschnitt geht es um Kreuzungen von *cgl1-T stt3a-2* mit den Mutanten *rsw1-1* (*CESA1*) und *rsw2-1* (*KOR1*). *rsw1-1* ist eine temperatursensitive Mutante der Cellulosesynthase A1. Ein Aminosäureaustausch von Alanin⁵⁴⁹ zu Valin bewirkt bei erhöhter Temperatur ein radiales

Schwellen der Wurzelspitze (*rsw* = *radial swelling*) (Arioli et al., 1998). Bei *rsw2-1* handelt es sich ebenfalls um eine temperatursensitive Mutante, die das Gen *KOR1* betrifft und einen ähnlichen Phänotyp wie *rsw1-1* aufweist. Dort findet durch eine Punktmutation ein Basenaustausch statt, der einen Aminosäureaustausch von Glycin⁴²⁹ zu Arginin zur Folge hat. Die Doppelmutante *rsw2-1 rsw1-1* zeigt konstitutiv ein verkürztes Wurzelwachstum im Vergleich zu den Einzelmutanten (Lane et al., 2001). Dieser konstitutive Phänotyp ist durch die Kombination zweier Gendefekte zu erklären, die unabhängig voneinander die Celluloseproduktion und das Wachstum betreffen. Die Trichome der Doppelmutante *rsw2-1 rsw1-1* sind bei Hitzeeinwirkung geschwollen und unverzweigt (Lane et al., 2001). Die REM-Aufnahme (Abb. 3.18A) dieser Doppelmutante *rsw2-1 rsw1-1* zeigt ohne Hitzeeinwirkung ein verkürztes Wachstum, jedoch nicht so ein deutliches Anschwellen der Wurzelspitze wie bei Lane et al. (2001) gezeigt. Da beide Gene (*rsw1* und *rsw2*) an der Zellwandsynthese beteiligt sind, wird durch die Kombination der beiden Mutationen ein Phänotyp sichtbar, auch ohne dass die Temperatur bei der Anzucht eine Rolle spielt.

Die Bedeutung der N-Glykosylierung von KOR1 für seine katalytische Funktionalität ist an einem in *Pichia pastoris* rekombinant-exprimierten KORRIGAN (mit integriertem RGS-His-tag) gezeigt worden. Deglykosylierung verursachte den Verlust der Aktivität (Mølhøj et al., 2001). Da *P. pastoris* nur *high-mannose*-Glykane produziert, zeigt dies, dass KOR1 ein bestimmtes Maß an Glykosylierung braucht, um aktiv zu sein. Die Daten zeigen auch, dass die Art der Glykosylierung Auswirkungen auf die Funktionalität von KOR1 hat. So verstärkt ein Glykosylierungsdefekt den Phänotyp der *rsw2-1*-Mutante (siehe Doppel- und Tripelmutanten *rsw2-1 rsw1-1* bzw. *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1* im Vergleich zu *rsw2-1* in Abb. 3.18A). Da die Tripelmutante *cgl1-T stt3a-2 rsw1-1* in ihrem Phänotyp der *rsw2-1 rsw1-1* ähnelt, kann wiederum darauf geschlossen werden, dass die Doppelmutation in *cgl1-T stt3a-2* Auswirkungen auf KOR1 hat, denn die Einkreuzung von *cgl1-T stt3a-2* in *rsw1-1* entspricht im Phänotyp der Einkreuzung von *rsw2-1* in *rsw1-1*. In Kang et al. (2008) zeigen weitere Kreuzungen von *rsw2-1* (*rsw2-1 stt3a-2* und *rsw2-1 cgl1-T*) im Vergleich mit den analogen Kreuzungen von *rsw1-1* (*rsw1-1 stt3a-2* bzw. *rsw1-1 cgl1-T*) eine offensichtlich stärkere Beeinflussung im Phänotyp, was die Auswirkung einer unkorrekten Glykosylierung auf KOR1 bestätigen. Die Phänotypen der Kreuzungen mit *rsw2-1* sind ausgeprägter als die mit *rsw1-1*. Es zeigen jedoch alle Kreuzungsvarianten einen zwergenhaften Wuchs und geschwollene Wurzeln.

Auffällig bei der Tripelmutante *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1* waren die Trichome, die eine blasige Form, im Vergleich zu der verzweigten Form im Wildtyp aufweisen (Abb. 3.18B). Diese

Trichommorphologie ist für *rsw2-1 rsw1-1*-Doppelmutante unter Hitzeeinwirkung beschrieben worden (Lane et al., 2001). Das Einkreuzen der *rsw2-1*-Mutation in *cgl1-T stt3a-2* ruft eine ähnliche abnormale Trichomform hervor, obwohl keine Hitzebehandlung erfolgte. Durch diese Kombination von Mutationen könnte auch ein Schritt in der Trichomentwicklung betroffen sein, so dass die primäre Verzweigung nicht einwandfrei erfolgt. Die Zellwand bestimmt die Form einer Zelle und in diesem Fall kann durch die Mutation in KOR1 die Cellulose nicht korrekt gebildet werden. Die Glykosylierungsdefekte könnten auch zusätzlich ein wichtiges Protein in der Entwicklung der Trichome treffen, die zusammen mit der Mutation in KOR1 zu dieser Ausprägung führen. Es sind mehr als 40 Gene identifiziert worden, die eine Rolle bei der Trichomzellentwicklung spielen (Schwab et al., 2000). Einige von diesen Proteinen besitzen mögliche N-Glykosylierungsstellen in ihrer Aminosäuresequenz, so z. B. STICHEL (STI), ein Protein mit sechs möglichen N-Glykosylierungsmotiven. Die Arabidopsismutante *sti* produziert bei einem Defekt unverzweigte Trichome (Ilgenfritz et al., 2003). Ein weiteres mögliches Gen, das in der Trichomentwicklung eine Rolle spielt, ist ZWICHEL (ZWI) (Oppenheimer et al., 1997). Die ZWI-Sequenz beinhaltet ebenfalls mehrere N-Glykosylierungsstellen. Da es sich bei beiden Enzymen STI und ZWI um cytosolische Enzyme handelt, werden diese Glykosylierungsstellen nicht genutzt, da die Proteine nicht durch das Sekretorische System geschleust werden. ZWI codiert für ein Mitglied der Kinesin-ähnlichen Proteine. In dem Hefe-2-Hybrid-*screen* in dieser Arbeit wurde ein Kinesin-ähnliches Protein, das mit CESA1 interagieren soll, identifiziert (siehe Kap. 4.2.1.4). Da ZWI nicht glykosyliert ist, liegt die Verbindung eventuell direkter zwischen CESA1/KOR1 und der Trichomentwicklung. Durch die Mutationen und die Auswirkungen auf KOR1 bzw. die Cellulosesynthese in den untersuchten Keimlingen, kann ZWI nicht mehr seine Aufgabe durchführen, z. B. könnten die Rosettenkomplexe nicht an die richtige Stelle für die Ausbildung der Trichomverzweigung geleitet werden und eine korrekte Cellulosefibrillensynthese ist nicht mehr gewährleistet.

Die Quadrupelmutante *cgl1-T stt3a-2 rsw2-1 rsw1-1* zeigt den Phänotyp, bei dem die Zellen kollabieren und die Entwicklung der Keimlinge nicht über das Keimblattstadium hinausgeht. Kollabierte Epidermiszellen könnten auf eine geschwächte Zellwand hinweisen, die im Gegensatz zu anderen Mutanten durch die Probenvorbereitung (Kritisch-Gefrierpunkt-trocknung unter Vakuum) eingedrückt wurde.

4.4 Glykosylierungsmutanten

Durch die Cooperation mit Prof. Hisashi Koiwa standen uns nahezu alle Mutationslinien der verschiedenen Glykosidasen und Glykosyltransferasen für die N-Glykanmodifizierung im Golgi-Apparat zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der *cglI-T*-Mutante auch die *gnIII*- und *fucTc*-Mutanten analysiert (Kapitel 3.4.1). Ein Überblick über die T-DNA-Insertionen in die verwendeten Mutationslinien der Glykosidasen und Glykosyltransferasen ist in Abb. 4.5 gezeigt. Die *manI*-Mutante ist eine Doppelmutante, da es zwei Gene für Golgi-Mannosidase I gibt. Für die Analysen in dieser Arbeit wurde die Kreuzung aus *manIa-2* und *manIb-1* verwendet, da es sich bei diesen beiden T-DNA-Insertionen um Exonlinien handelt.

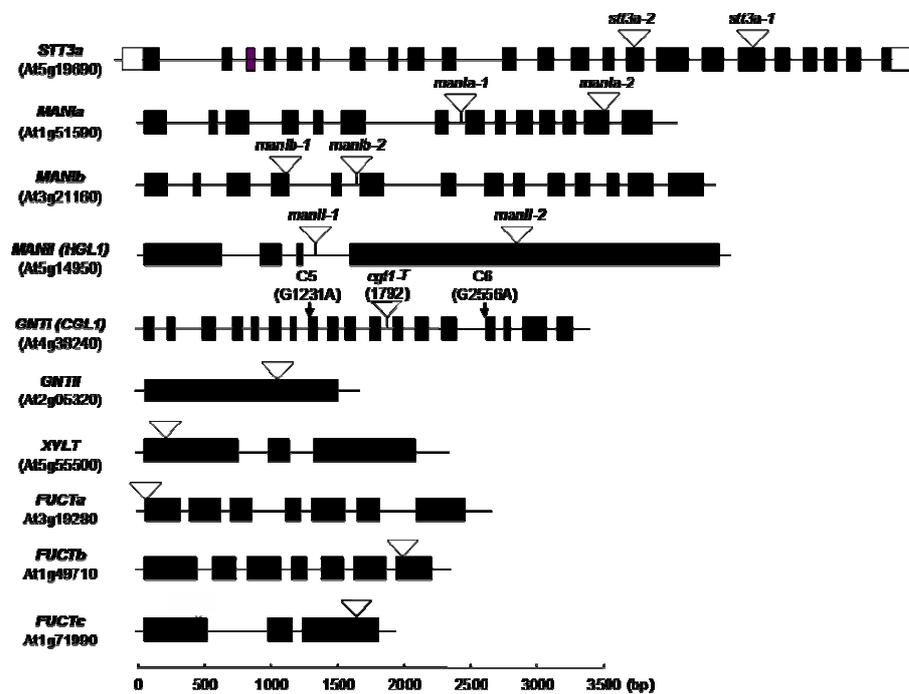


Abb. 4.5: Mutierte Arabidopsis-Allele zur Untersuchung von N-Glykosylierungsdefekten im Sekretorischem System. Bei der *manI*-Mutante handelt es sich um eine Kreuzung aus *manIa-2* und *manIb-1*, ebenso ist die *fucTa/b*-Mutante durch Kreuzung der beiden Einzelmutanten *fucTa* und *fucTb* entstanden. In diese Doppelmutante wurde für die Tripelmutante *fucTa/b/xyI1* die *xyI1*-Mutante eingekreuzt (analog zu Strasser et al., 2004). Die Abbildung ist von Prof. Hisashi Koiwa freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Die Mutationslinien wurden hauptsächlich mit immunobiochemischen Methoden untersucht, um eine Aussage über den Ablauf und die Auswirkungen der Glykosylierung treffen zu können. Die T-DNA-Insertionsmutanten *fucTc* und *gnIII* aus dem INRA-Institut sind FLAG-Linien mit jeweils nur einer T-DNA-Insertion.

4.4.1 Proteinmuster in den Glykosylierungsmutanten

Zur Analyse des Proteinmusters der Mutanten wurden die löslichen Proteinextrakte mit Hilfe von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen untersucht. Dabei zeigte sich ein im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügig verändertes Proteinmuster. Eine einzige Bande im Coomassie-gefärbten SDS-Gel wich in den Mutanten *stt3a-2* und *manI* klar vom WT ab. Die Bande mit ca. 78 kDa im WT, ist in *stt3a-2* nicht mehr nachweisbar und es ist zu vermuten, dass in der *manI*-Mutante diese Bande eine Größe von ca. 85 kDa aufweist. Es ist erstaunlich, dass es nicht mehr Banden gibt, die in den Mutanten ein anderes Laufverhalten zeigen. Falls der Hauptteil der komplexen Glykoproteine membrangebunden vorliegt, ist es eine mögliche Erklärung für die geringen Unterschiede, da in diesem Versuch lösliche Proteine untersucht wurden. Wahrscheinlicher ist, dass die einzelnen Glykoproteine in so geringen Mengen auftreten, dass sie in der Vielzahl an Banden nicht durch ein verändertes Laufverhalten auffallen.

Auch eine Silberfärbung (Daten nicht gezeigt) erbrachte keine weiteren oder deutlicheren Ergebnisse, obwohl die Silberfärbung eine sensitivere Nachweismethode ist und die untere Nachweisgrenze bei 1 ng Protein liegt (im Vergleich zu 100 ng bei Coomassie-Färbung). Die Bande, die im WT bei 78 kDa verläuft, wurde mittels Massenspektrometrieanalyse als β -Thioglycosidglucohydrolase (TGG1) bzw. Myrosinase identifiziert. Dieses Enzym bewirkt eine enzymatische Spaltung von Glucosinolaten und wird als Abwehrmechanismus von einigen Pflanzenspezies eingesetzt. Da Glucosinolate, als Substrat und TGG1 als umsetzendes Enzym in verschiedenen Kompartimenten vorliegen, kann das Enzym die β -Thioglycosid-Bindung der Glucosinolate erst bei Zerstörung der Zellen und damit der Zellkompartimente spalten, wobei freie Glucose und Isocyanat entsteht (Barth and Jander, 2006 und Zitate darin). Koiwa et al. identifizierten schon 2003 TGG1 als ein Protein, das im Wildtyp aber nicht in der *stt3a*-Mutante detektierbar ist.

Dass es sich bei der TGG1 um ein Glykoprotein handelt, zeigten Falk et al. (1995) durch Deglykosylierung isolierter TGG1. Diese wies nach der Deglykosylierung eine geringere Molekularmasse auf. Die Aminosäuresequenz von TGG1 beinhaltet neun mögliche Glykosylierungsmotive. TGG1 ist ein vakuoläres Enzym, das Glykane der Form M3FXGn2 trägt. Werden diese neun möglichen Glykane mit einer Größe von ca. 1,3 kDa bei der Massenkalkulation berücksichtigt, dann vergrößert sich die Molekularmasse des „nackten“ Proteins (61 kDa) um ca. 12 kDa auf 73 kDa. In dem Coomassie-Gel in Abb. 3.21 zeigt TGG1 jedoch eine größere Molekularmasse als die vermutete Molekularmasse von 73 kDa. Damit könnten von den neun möglichen Glykosylierungsstellen einige mit einem *high*-

mannose-Glykan verbunden sein, die eine größere Masse aufweisen (ca. 2 kDa) und das glykosylierte TGG1 im SDS-Gel nicht so weit migrieren.

4.4.2 Komplexe Glykane in den Glykosylierungsmutanten

Ein wichtiges Werkzeug zur Analyse der komplexen Glykosylierung war die Verwendung des cgly-Antikörpers. Dieses Serum wurde gegen Phytohemagglutinin-L (PHA-L) hergestellt. PHA-L ist ein Lektin aus der Bohne *Phaseolus vulgaris*, das ein vakuoläres *high-mannose*-Glykan und ein komplexes Glykan trägt (Sturm et al., 1992). Die komplexe Zuckerkette besteht aus M3XFGn2. Das Antiserum gegen natives PHA-L erkennt nur komplexe Zuckerketten und nicht die Proteinstruktur (Lauriere et al., 1989).

Komplexe Zucker weisen sich durch zwei spezifische Zuckermoleküle aus, die an der Grundstruktur (M3Gn2) anknüpfen. Zum einen die *core*-Fucose, welche über eine α -1,3-Bindung an das proximale GlcNAc geknüpft ist. Zum anderen die *core*-Xylose, die über eine β -1,2-Bindung an das zentrale β -Mannosemolekül gebunden ist. Die so verknüpften Fucose- und Xylosereste sind in Glykoproteinen von Säugern nicht vorhanden. Der cgly-Antikörper erkennt vornehmlich die Xylose und schwächer die Fucose an den komplexen Glykanen, was in einer leicht schwächeren Immunfärbung der *fucTa/b*-Doppelmutanten zu sehen ist (Abb. 3.23) und die Beobachtung von Faye et al. (1993) bestätigt. Die *xylT*-, *fucTa*- und *fucTb*-Mutanten konnten verifiziert sowie die erfolgreiche Kreuzung von *fucTa* mit *fucTb* durch eine Schwächung der Immunfärbung gezeigt werden. Die Tripelmutante *fucTa/b/xylT* konnte durch eine fehlende Immunfärbung auf dem mit cgly-Antikörper behandeltem Blot bestätigt werden.

In Abb. 3.24 sind alle Mutanten mit dem cgly-Antikörper untersucht worden. Der WT gilt als positive Kontrolle und zeigt eine starke Immunfärbung. Deutlich ist eine Bande in der Höhe von 43 kDa nachweisbar. Sonst detektiert der Antikörper Proteine mit einer Größe von ca. 100 kDa bis in den Molekularbereich von 30 kDa. Bei der *stt3a-2*-Mutante ist die Immunfärbung mit dem cgly-Antikörper nicht identisch mit der Immundekoration des Proteinextrakts vom Wildtyp. Die Banden bei *stt3a-2* erscheinen etwas diffuser und variieren in der Größe. STT3a ist eine Untereinheit der OST im ER-Lumen, die den Transfer des Oligosaccharids auf das Protein katalysiert. In Hefen sind neun Untereinheiten der OST identifiziert worden, die sich zu einem membrangebunden Hetero-Oligomer-Komplex zusammensetzen (Knauer and Lehle, 1999). Häufig sind Mutationen, die die Aktivität der OST blockieren, letal (Koiwa et al., 2003, Lerouxel et al., 2005). Doch auch durch die Unterdrückung der Übertragung der N-Glykan-Vorstufen durch Tunicamycin auf das Protein

ist in Eukaryoten letal (Elbein, 1987). Dies zeigt die große Bedeutung der Proteinglykosylierung. Durch die sporadische Glykosylierung in der *stt3a-2*-Mutante werden die Glykoproteine verschieden häufig glykosyliert und dadurch in ihrer Masse beeinflusst (Koiwa et al., 2003), was ein anderes Laufverhalten im SDS-Gel hervorruft. Dadurch sind sie im SDS-Gel nicht mehr als einzelne distinkte Bande sichtbar, sondern verteilen sich über einen bestimmten Bereich. In Abhängigkeit also von der Anzahl an Glykanen oder ihrem Modifikationszustand, kann die Größe von Glykoproteinen variieren. Es ist bekannt, dass einzelne Polypeptidketten heterogene Zuckerketten tragen können (komplexe und *high-mannose*-Glykane). Zudem kann das Glykosylierungsmuster für ein bestimmtes Polypeptid variieren (gewebespezifische Unterschiede), und muss auch nicht immer bezüglich einer bestimmten Glykosylierungsstelle gleich sein, was als Mikroheterogenität bezeichnet wird (Sturm, 1991). Doch in der *stt3a-2*-Mutante ist die Breite des Korrigansignals (Abb. 3.28) nicht mehr durch die Mikroheterogenität zu erklären, sondern auf die lückenhafte Glykosylierung in der Mutante. Durch eine falsche bzw. lückenhafte Glykosylierung kann der Faltungsprozess des Proteins im ER beeinflusst werden und über die UPR (*unfolded protein response*) der Abbau des Proteins eingeleitet werden. Wenn die Glykoproteine erstmal in den Golgi-Apparat gelangt sind, verlaufen die Glykosylierungsschritte in der *stt3a-2*-Mutante wie im Wildtyp.

Die α -Mannosidase I katalysiert im Golgi-Apparat die erste Reaktion an den Glykoproteinglykanen. Bei diesem Schritt werden terminale Mannosen abgetrennt und der 1,3-Arm für weitere Modifikationen vorbereitet. In Arabidopsis sind zwei Gene für die Golgi- α -Mannosidase I (*man1a*: At1g51590 und *man1b*: At3g21160) identifiziert worden. Für alle Analysen in dieser Arbeit wurde die Doppelmutante verwendet, bei der beide T-DNA-Insertionen in einem Exon liegen (*man1a-2/man1b-1*) (Hisashi Koiwa, unveröffentlichte Daten). Die schwache Reaktion der Proteine der *man1*-Mutante mit dem cgly-Antikörper in der Abb. 3.24 war unerwartet. Diese Reaktion des cgly-Antikörpers kann durch ein Überlaufen der benachbarten Spur erklärt werden, da auf anderen Blots (siehe Abb. 3.25 und 3.27) *man1* keine Reaktion zeigte. Die *cgl1*-Insertionsmutante - GNTI katalysiert den darauffolgenden Schritt - zeigt ebenfalls keine Reaktion mit dem Antikörper und von der Abfolge der Enzyme muss MANI vor GNTI aktiv sein, da es den Arm für die N-Acetylglucosaminylierung vorbereitet. In der Abb. 4.6 sind die (möglichen) Glykanstrukturen der Mutanten aufgezeichnet, die sich durch Ausschaltung der Gene anhäufen. Das Glykan, das sich durch das Fehlen der Aktivität von MANI anhäuft, ist M8Gn2, also eine *high-mannose*-Struktur, die weder eine *core*-Fucose, noch eine *core*-Xylose trägt. MANI

für den Antikörper besser zugänglich machen. Eine Veränderung der Immunreaktion wurde durch externe Zugabe dieser Mannosidase jedoch nicht hervorgerufen. Auffällig sind jedoch zwei zusätzliche Banden (50 und 65 kDa) auf dem mit PonceauS-gefärbten Blot der gefällten Blattextrakte (Abb. 3.25). Diese Banden traten nur bei der hohen Mannosidasekonzentration von 1,36 Units auf. Worauf diese zusätzlichen Banden zurückzuführen sind, ist unklar. Durch die Aktivität der Mannosidase könnten Proteine auf eine bestimmte Größe reduziert worden sein und auf dieser Höhe im SDS-Gel akkumulieren. Da es sich aber um zwei deutliche Banden handelt, ist es doch recht unwahrscheinlich, dass sich mehrere Proteine auf die gleiche Molekularmasse trimmen lassen und mit PonceauS-Färbung sichtbar gemacht werden können. Es könnte sich auch um die zugegebene *jack bean*-Mannosidase handeln. Durch die starke Intensität der Banden (in den Spuren mit 1,36 Units) müssten sie jedoch noch in einer geringeren Verdünnung (also 0,136 Units) zu sehen sein. Zur Kontrolle, ob die zugegebene Mannosidase aus der Jackbohne wirklich aktiv war, wäre es sinnvoll gewesen den Blot mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) zu entwickeln. Da ConA an terminalen Mannosen von *high-mannose*-Glykanen bindet, hätte nach der Mannosidase-Behandlung keine Reaktion mit ConA mehr stattfinden dürfen. Leider wurde diese Kontrolle nicht durchgeführt.

Ob die Mannosen wirklich durch die Mannosidase abgetrennt worden sind, ist fraglich. In Tulsiani and Touster (1983) sind die Aktivitäten der *jack bean*-Mannosidase und einer Golgi-Mannosidase II aus Ratte verglichen worden. Die *jack bean*-Mannosidase setzt im Vergleich zur Golgi-Mannosidase in einer Stunde (37°C) nur ein Drittel der Menge um, ist dabei jedoch nicht so eingeschränkt in der Wahl des Substrates (Golgi-Mannosidase bevorzugt GnM5Gn2). Die Inkubation der Blots bzw. der Proteinextrakte erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur (Herstellerangaben besagen, dass 1 nmol Substrat in 1 Stunde bei 25°C von 1 Unit umgesetzt wird). Es wäre sinnvoll, weitere Versuche mit einer auf bis zu 16 Stunden ausgedehnte Inkubationszeit und einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C durchzuführen, um optimale Bedingungen für die Reaktion zu schaffen. Auf die Frage, ob *manII*-Glykane nun eine *core*-Xylose und/oder eine *core*-Fucose tragen, wird später noch genauer eingegangen.

Die Ergebnisse der cgly-Antikörperreaktion bei den *fucTa/b*-Doppelmutanten sind schon in diesem Abschnitt besprochen worden, ebenso die der *xylT*-Mutante. Die Tripelmutante *fucTa/b/xylT* ist ein wahrer *nonstainer*, da bei diesen Glykanstrukturen sowohl die *core*-Fucose als auch die *core*-Xylose fehlen.

Bei *gnIII* und *fucTc* handelt es sich um T-DNA-Insertionslinien mit einem Wassilewskija-Hintergrund im Gegensatz zu den anderen Mutanten, die Columbia als Hintergrund haben.

Die Immunfärbung der beiden Mutantenrohextrakte ähnelt dem Wildtyp (Abb. 3.25). Diese beiden Mutanten besitzen jeweils eine *core*-Fucose und *core*-Xylose, da sie sonst mit dem cgly-Antikörper keine Immunreaktion zeigen würden. Es ist jedoch auffällig, dass bei diesen beiden Mutanten die markante Bande bei 43 kDa nicht nachgewiesen werden konnte. In der Abb. 3.27 ist ein Wassilewskija-Wildtyp neben *gnTII* und *fucTc* aufgetragen und mit cgly-Antikörper immundetektiert worden. Im Wassilewskija-Wildtyp fehlt die 43 kDa-Bande ebenfalls. Um was für ein Protein es sich handelt, ist nicht klar. Anscheinend wird es in Wassilewskija nicht in detektierbaren Mengen synthetisiert oder nicht komplex glykosyliert.

Ein weiteres Werkzeug zur Untersuchung von Glykoproteinen ist die Behandlung von gereinigten Proteinen bzw. Proteinrohextrakten mit der Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F). Diese Glykosidase spaltet N-Glykane von Proteinen ab, wenn diese nicht mit einer *core*-Fucose dekoriert sind. Mit Hilfe des cgly-Antikörpers kann dann nachvollzogen werden, ob in den Mutanten komplexe Zucker gebildet wurden. Um die schwache cgly-Immunreaktion von *manII* zu erklären, war eine Inkubation der Proteinrohextrakte mit PNGase F sehr hilfreich (Abb. 3.25). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Wildtypen (Col und Ws) ist vor und nach der PNGase F-Behandlung eine eindeutige Immunreaktion mit dem cgly-Antikörper erfolgt, was auf das Vorhandensein komplexer Zucker hinweist. Ebenso konnte eine Immunreaktion bei den Mutanten *stt3a-2*, *gnTII*, *fucTc* und auch schwach bei *xylT* nachgewiesen werden. Bei der Mutante *fucTa/b* ist die Glykosyltransferase für die α -1,3-Fucose-Verknüpfung ausgeschaltet, somit müssten alle Glykane ohne die *core*-Fucose aufgebaut sein. Dies konnte eindeutig in dem cgly-Blot nachgewiesen werden, da nach PNGase F-Verdau keine Reaktion mit dem Antiserum stattfand. Dieses Ergebnis stellt eine Positivkontrolle dar und verdeutlicht, dass die PNGase F-Reaktion stattgefunden hat. *Nonstainer*-Mutanten wie *cglI-T* und *fucTa/b/xylT* zeigen unverändert keine Reaktion mit dem cgly-Antikörper. Ein eindeutiger Nachweis, ob in der *manII*-Mutante *core*-Fucosen vorhanden sind, konnte mit Hilfe dieses Ansatzes nicht zweifelsfrei geklärt werden. Für diesen Zweck wurde der gleiche Blot anschließend mit ConA inkubiert und mit Hilfe von HRP entwickelt. Wie oben schon erwähnt, bindet ConA an terminale Mannosen, wie sie bei Glykoproteinen als *high-mannose*-Glykane vorkommen. Diese *high-mannose*-Glykane (M5-9Gn2) haben keine Fucose oder Xylose gebunden (siehe Abb. 4.6 *manI* und *cglI*). Da die *high-mannose*-Glykane durch die PNGase F abgetrennt werden können, war zu erwarten, dass nach der Behandlung keine Reaktion mit ConA mehr nachweisbar ist. Entsprechend dieser Erwartung weisen die Wildtypen im unbehandelten Zustand *high-mannose*-Strukturen auf, die nach der PNGase F-Behandlung nicht mehr zu detektieren sind. Diese *high-mannose*-Glykane liegen auch in den

Mutanten *stt3a-2*, *manI*, *cglI-T*, *gnIII*, *fucTc* und in geringerer Konzentration auch in *fucTa/b* und *fucTa/b/xylT* vor, dass heißt sie konnten ebenfalls durch die Behandlung abgespalten werden. In den beiden Mutanten *manII* und *xylT* ist jedoch nach PNGase F-Behandlung eine Bindung von ConA an terminale Mannosen möglich und detektierbar. In diesen beiden Mutanten liegen Glykane vor, die mit einer *core*-Fucose versehen sind und noch einen ungetrimmten α -1,6-Mannosearm besitzen müssen (siehe Abb. 4.6, rechtes *manII*-Glykan). Diese Glykanstrukturen sind Zwischenprodukte, die sich auf Grund der Blockade im Glykosylierungsweg anhäufen und nicht weiter verarbeitet werden können. Die schwache Reaktion von ConA mit den Glykanen der *xylT*-Mutante könnte auf das Fehlen des normalen Substrates zurückzuführen sein. Dadurch, dass die Xylose nicht an das Glykan geknüpft werden kann, erkennen anderen Transferasen (z. B. MANII oder GNTII) ihr Substrat vielleicht nur unzureichend und können es nur bedingt umsetzen.

Dass die Zuckerreste der Mutante *manII* eine *core*-Fucose tragen, zeigte Strasser et al. (2006) anhand einer MALDI-TOF-Analyse der Mannosidase II-Mutante. In dieser Analyse zeigten sich überwiegend die Strukturen M5XFGn2 und GnMan5XFGn2. Das beweist, dass die Enzyme XYLT und FUCTa/b auch ohne MANII aktiv sein können.

Wenn die Zuckerstrukturen in der *manII*-Mutante diese komplexen Zuckerreste enthalten, warum erkennt der cgly-Antikörper diese dann nicht? Die Mannosidasebehandlungen haben durch die erwartete Trimmung der Mannosen keine Verbesserung in der Detektion gebracht. Jedoch ist auch unklar, ob die *jack bean*-Mannosidase die Mannosen abgespalten hat. Damit ist die Aussage, dass es sich bei der *manII* um eine *nonstainer*-Mutante handelt nicht ganz richtig, denn durch den ConA-Blot konnte gezeigt werden, dass bei den Zuckerstrukturen in der *manII*-Mutante eine *core*-Fucose vorhanden ist. Daher wäre die Bezeichnung (wie auch für *xylT*) als *lowstainer* angebrachter.

Der cgly-Antikörper ist gegen das komplexe Glykan M3XFGn2, wie es bei vakuolären Proteinen vorkommt, gerichtet. Beim Vergleich der Struktur M3XFGn2 von vakuolären Glykoproteinen mit den Strukturen der Glykane, die in der *manII*-Mutante gebildet werden und folgende Strukturen aufweisen: M5XFGn2 oder GnM5XFGn2, fallen nur die zusätzlichen Mannosen auf. Die zweite Version (zusätzliches GlcNAc) wird durch Hexosaminidasen in der Vakuole auf die Form der ersten Version getrimmt. Durch 3D-Strukturmodelle von N-Glykanen kann die räumliche Anordnung der einzelnen Zuckermoleküle dargestellt werden. In Abb. 4.7 sind die beiden Glykanstrukturen als 3D-Modell gezeigt. Zur besseren Übersicht sind nur die vakuolären Strukturen ohne das endständige GlcNAc gezeigt. Wie in den 3D-Strukturen zu erkennen ist, ist die Anordnung

der *core*-Xylose in den beiden dargestellten Strukturen von WT und *manII*-Mutante verschoben. In der *manII*-Mutante klappt die Xylose um ca. 30° in Richtung der beiden GlcNAc-Reste der Grundstruktur. Diese Verschiebung der Xylose um 30° könnte dazu führen, dass der cgly-Antikörper die *manII*-Mutante als *nonstainer* bzw. *lowstainer* deklariert (Prof. von Schaewen, persönliche Mitteilung), obwohl Massenspektrometrie-Daten darauf hinweisen, dass es sich bei den Glykanen um komplexe Glykane handelt (Strasser et al., 2006). Durch die Winkelverschiebung kann der Antikörper sein Antigen eventuell nicht mehr binden. Aktuelle Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die schwache Immunreaktion des cgly-Antikörpers wirklich auf die Fucose zurückzuführen ist, da eine Tripelmutante *manII fucTa/b* nicht mehr mit dem cgly-Antikörper reagiert (Kerstin Fischer, persönliche Mitteilung). Deutlicher wird es noch mit dem HRP-Antikörper, der die *core*-Zucker zu gleichen Teilen erkennt (cgly-Antikörper reagiert stärker mit der Xylose). Auch dieser Antikörper zeigte keine Immunreaktion mit der Tripelmutante.

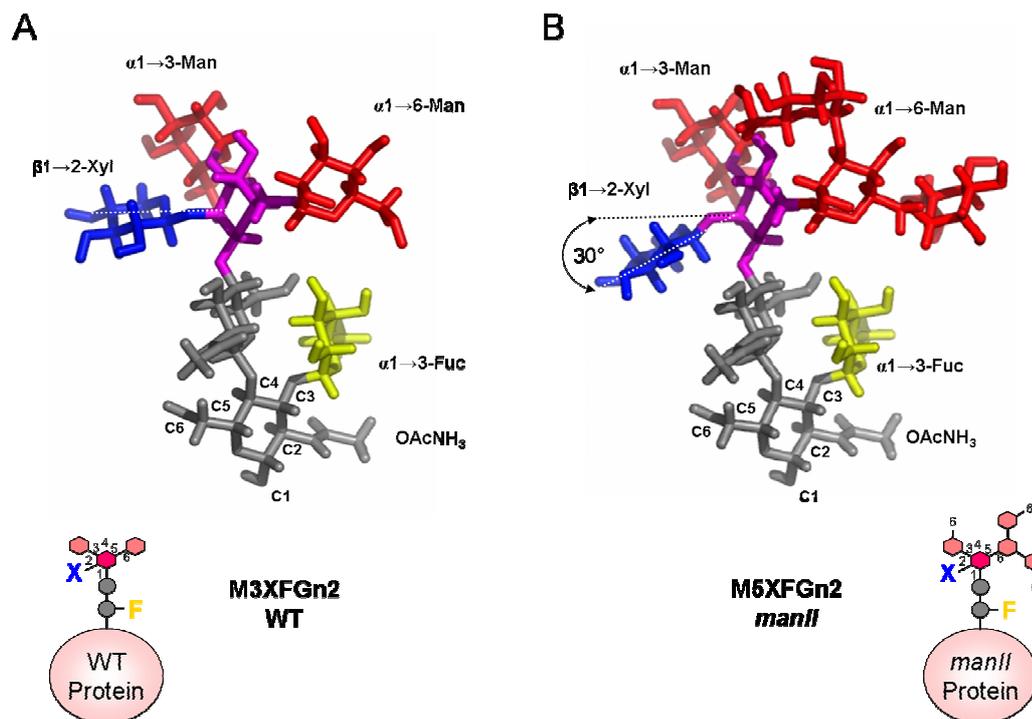


Abb. 4.7: 3D-Strukturmodelle der N-Glykane im WT (A) und in der *manII*-Mutante (B). Die Glykane sind als vakuoläre Strukturen dargestellt. Es fehlen die endständigen GlcNAc, da der cgly-Antikörper gegen das vakuoläre Protein Phytohemagglutinin hergestellt wurde. Die 3D-Struktur ist oben dargestellt. Unten sind das N-Glykan und die Formel als Schema gezeigt. Die 3D-Modelle wurden mit den Programmen SWEET2 und AISMIG (DKFZ Heidelberg) erstellt (Abbildung wurde freundlicherweise von Stephan Rips und Prof. von Schaewen zur Verfügung gestellt).

Zur Untermauerung der Winkelverschiebungshypothese sollen demnächst die Proteine der *manII fucTa/b*-Mutante mit einer Golgi-Mannosidase II aus *Drosophila* behandelt werden, die rekombinant in Insektenzellen hergestellt wurde. Diese Mannosidase II hydrolysiert terminale

α -1,3- und α -1,6-verknüpfte Mannosereste an GnM5Gn2. Nach einem erfolgreichen Verdau würde die Reaktion der Antikörper (cgly- und HRP-Antikörper) dann weiteren Aufschluss darüber geben, ob die Winkelverschiebung Auswirkung auf die Erkennung der Xylose hat. Die Winkelverschiebung der Xylose nach unten wird ebenfalls für N-Glykanen modelliert, die sekretiert werden und zwei endständige GlcNAc tragen. Somit würde der cgly-Antikörper nur komplexe Glykoproteine, die in der Vakuole oder Zellwand vorkommen und keine endständigen GlcNAc tragen, erkennen. In einer neueren Veröffentlichung sind zwei β -Hexosaminidasen identifiziert worden, die in der Plasmamembran lokalisieren (Strasser et al., 2007a). Diese Hexosaminidasen trennen die terminalen GlcNAc-Reste an den Glykane ab. Damit würden die sekretierten N-Glykane mit den vakuolären N-Glykanen identisch sein. Jedoch gibt es Glykoproteine, an denen die LewisA-Epitope nachgewiesen wurden (z. B. Laccase, welche von Ahorn-Zellkulturen sekretiert werden, Fichette-Lainé et al., 1997). Diese Glykanstrukturen werden demnach von den Hexosaminidasen nicht getrimmt. Bei den Versuchen von Strasser et al. (2007a) wurden den Hexosaminidasen jedoch keine Substrate angeboten, die ein LewisA-Epitop oder nur die α -1,4-Fucose bzw. die β -1,3-Galactose trugen. Diese Hexosaminidasen sind integrale Membranproteine, die in der Plasmamembran verankert sind. Können sie ebenfalls nur die Glykane von Membranproteinen als Substrat nutzen und lösliche Glykoproteine werden nur unzureichend als Substrat erkannt? Aber wozu dienen dann die Modifikationen im Golgi-Apparat, wenn sie durch Hexosaminidasen wieder entfernt werden? Die GNTI-Aktivität ist unumgänglich, um komplexe N-Glykane herzustellen. Erst wenn der α -1,3-Arm ein GlcNAc trägt, können die *core*-Fucose und *core*-Xylose verknüpft werden. Lange Zeit wurde angenommen, dass Arabidopsis nicht in der Lage ist LewisA-Epitope zu bilden, da diese Epitope nicht nachgewiesen werden konnten (Fichette-Lainé et al., 1997). Die für das LewisA zuständige Galactosyltransferase (GALT) wurde kürzlich identifiziert und beschrieben (Strasser et al., 2007b). In dieser Publikation wird auch beschrieben, dass mit dem LewisA-Antikörper JIM 84 (Horsley et al., 1993) nur in bestimmten Gewebetypen von Arabidopsis (z. B. Petalen und Stängeln) das Epitop nachgewiesen werden konnte. Ein Nachweis des LewisA-Epitops mit unserem LewisA-Antikörper war in Blattextrakten nicht möglich. Die Ausbildung dieses Epitops scheint demnach stark gewebespezifisch zu sein. Das Anhängen des LewisA-Epitops könnte auch eine Art Endkontrolle im *trans*-Golgi-Netzwerk darstellen, bevor die Glykoproteine das Sekretorische System verlassen. Ähnlich wie die transiente Glucosylierung als Faltungskontrolle im ER (Übersichtsartikel zur ER-Faltungskontrolle: Hebert et al., 2005). Das LewisA-Epitop würde dann nur transient an die Glykane gebunden sein und wenn es die

Kontrolle des *trans*-Golgi-Netzwerks durchschritten hat, wird es wieder entfernt. Das Entfernen des Epitops kann noch im *trans*-Golgi-Netzwerk stattfinden, falls dort die Enzyme für die Abspaltung vorliegen, oder durch die Hexosaminidasen, die in der Plasmamembran inserieren und das GlcNAc mit der LewisA-Dekoration entfernen. Für den zweiten Fall, müsste die Substratspezifität der Hexosaminidasen näher untersucht werden. Proteine mit LewisA-Epitop werden, wenn auch nur in geringen Konzentrationen, nachgewiesen (durch MALDI-TOF in Strasser et al., 2007b) und der schlechte Nachweis des Epitops in *Arabidopsis* könnten die Vermutung einer transienten Dekoration mit LewisA-Epitopen als Kontrollmechanismus bekräftigen.

4.4.3 Die Endoglucanase KORRIGAN 1 in den Glykosylierungsmutanten

Das Glykoprotein KORRIGAN (KOR1) eignet sich durch die acht möglichen N-Glykosylierungsstellen gut für die Untersuchung der Glykosylierung in den Mutanten. Die Analyse der Mutanten erfolgte durch einen Antikörper gegen KOR1.

Das reine Proteinrückgrat von KOR1 besitzt eine Größe von ca. 70 kDa. Jeder Zuckerbaustein hat eine eigene Masse. So ist für ein Glykan im WT mit der Formel $Gn2M3FXGnc2$ ein Gewicht von 1,61 kDa anzusetzen, mit einer LewisA-Dekoration (zusätzlich noch Gal2Fuc2) liegt die Größe bei 2,23 kDa. Werden alle 8 möglichen Glykosylierungsstellen genutzt, erhöht sich die Größe des Proteins auf 87,8 kDa (pro Zuckerbaum 2,23 kDa +17,84 kDa) bzw. auf 82,9 kDa (pro Zuckerbaum 1,61 kDa +12,88 kDa ohne LewisA).

Der von uns genutzte Antikörper gegen KOR1 wurde freundlicherweise von der AG Höfte (INRA, Versailles, Frankreich) zur Verfügung gestellt und ist in Nicol et al. (1998) beschrieben. In Nicol et al. (1998) wird mit diesem Antikörper in Microsomenfraktionen KOR1 bei einer Größe von 70 kDa detektiert. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Proteingerüst ohne die Glykanstrukturen alleine schon ca. 70 kDa wiegt. Im Gegensatz zu der Veröffentlichung von Nicol et al. (1998) soll der Antikörper laut einer persönlichen Mitteilung einer Mitarbeiterin der AG Höfte eine Bande bei 75 kDa auf Western-Blots erkennen.

Wenn bei der Aufarbeitung der Pflanzen die Membranproteine der Klasse II ohne die Transmembrandomäne und die cytosolische Domäne isoliert werden, liegt die Größe von KOR1 bei 58,5 kDa für die Aminosäurekette und mit den Glykanen bei 76,3 kDa (mit LewisA) bzw. 71,4 kDa (ohne LewisA). Dies käme der Größenangabe des Höfte-Labors recht nahe. Nur ist der KOR1-Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins hergestellt worden und wenn die Membranproteine bei der Proteinaufarbeitung ihre N-Termini verlieren, dürfte der verwendete Antikörper KOR1 nicht detektieren können.

In meinen Western-Blots erkennt der KOR1-Antikörper jedoch eine distinkte Bande in den Blattextrakten. In einem Vorversuch konnte mit dem KOR1-Antikörper eine Bande in der Pelletfraktion ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Pelletfraktion handelt es sich hauptsächlich um Membranproteine, die durch Kochen aggregieren würden, daher wurden die Pelletproben in 1x SDS-Ladepuffer resuspendiert, eine halbe Stunde bei RT inkubiert und zweimal mit Ultraschall im Wasserbad behandelt.

Da die Größenangaben von KOR1 auf Western-Blots in der Literatur nicht mit der hier detektierten Größe von ca. 95 kDa übereinstimmten, wurden weitere Aufarbeitungsmethoden der Proteine getestet. Nach Proteinextraktion mit einem Hochsalzpuffer wird in Robert et al. (2005) eine einzelne Bande bei 72 kDa mit demselben Antikörper detektiert. In dieser Arbeit wurde die Proteinisolierung von Roberts et al. wiederholt (Abb. 3.29). Es wurden jedoch, abweichend zur Literaturangabe im Proteinüberstand, zwei Banden mit dem KOR1-Antikörper detektiert (bei ca. 80 kDa und bei ca. 95 kDa). In der Pelletfraktion war nur die 95 kDa-Bande detektierbar (Abb. 3.29). Bei Verwendung des HNP-Extraktionspuffers wurden im Überstand ebenfalls die beiden Banden bei 80 und 95 kDa detektiert. Keine der detektierten Banden entspricht der Größe in der Veröffentlichung von Robert et al. (2005). Da nicht bekannt ist, welche der acht möglichen oder alle Glykosylierungsstellen bei KOR1 genutzt werden und ob sie nur mit komplexen Glykanen oder auch mit *high-mannose*-Glykanen besetzt werden, kann über die genaue Größe von KOR1 auf Western-Blots nur spekuliert werden. Jedoch warf dies die Frage auf, welche Größe KOR1 auf einem Western-Blot wirklich hat, da die Angaben der Bandengrößen so variieren. In Kang et al. (2008) ist ein RGS-His-markiertes KORRIGAN-Konstrukt verwendet worden, das in der N-terminale cytosolischen Domäne ein Histidin-tag trägt. Dieses Konstrukt wurde mit Hilfe eines Histidin-Antikörpers detektiert, das eine Größe unterhalb von ca. 100 kDa aufweist. Der Histidin-tag ist nur wenige Aminosäuren lang und verändert die Größe des Proteins kaum. Diese Größenangabe unterstützt die in dieser Arbeit detektierte Bandengröße in der Pelletfraktion von 95 kDa.

Da KOR1 ein mehrfach glykosyliertes Protein ist, können anhand der Größe dieses Proteins Rückschlüsse auf die Glykane in den Mutanten gezogen werden. Mögliche *high-mannose*-Glykane an KOR1 ändern nicht die Größe des Proteins in den Mutanten, da sie in allen Mutanten die gleiche Größe besitzen und im Golgi-Apparat keine weiteren Modifikationen erfahren. In Abb. 3.28 sind Proteinextrakte verschiedener Mutanten auf einem Western-Blot aufgetragen und KOR1 mit dem KOR1-Antikörper detektiert worden. Zuerst fällt auf, dass die Bande, die der KOR1-Antikörper erkennt in den Mutanten auf unterschiedlichen Höhen

verlaufen. KOR1 besitzt demnach unterschiedliche Größen, je nachdem in welchem Mutantenhintergrund das Protein gebildet wird. Die Bande bei der Wildtyp-Probe ist sehr klar und deutlich zu erkennen. Sie liegt unterhalb der 100 kDa Markerbande, was das Ergebnis in Abb. 3.29 bestätigt. Die Wildtyp-Bande zeigt die stärkste Intensität im Vergleich zu den anderen Proben. KOR1 besitzt im Wildtyp eine einheitliche Größe. In der Mutante *stt3a-2* dagegen zeigt sich keine distinkte Bande. Das Signal des KOR1-Antikörpers reicht von ca. 75 kDa bis 90 kDa. Dies ist durch die sporadische Glykosylierung der Glykoproteine im *stt3a-2*-Hintergrund zu erklären. Ein analoges Ergebnis konnte in Kang et al. (2008) mit dem Histidin-markierten KOR1 erzielt werden. Die Mutation in *stt3a-2* hat für OST die Auswirkung, dass entweder die Glykosylierungsmotive nicht alle erkannt werden oder die Übertragung des Glykans nicht jedes Mal gelingt (Koiwa et al., 2003).

Um die in den Abb. 4.6 dargestellten Zuckerstrukturen anhand der Korrigan-Blot-Daten zu erklären, muss man sich die Massen der einzelnen Zuckerbausteine vor Augen halten: GlcNAc: 221 Da; Man: 180 Da; Fuc: 164 Da; Xyl: 150 Da; Gal: 181 Da. Die Verringerung der Molekularmasse pro glykosidische Bindung beträgt 18 Da. Wenn für jeden Zuckerrest die Massen addiert werden, kann die Abweichungen der Banden errechnet und dadurch erklärt werden. Anhand dieser Massen kann versucht werden, die Größenunterschiede der Banden, die mit dem KOR1-Antikörper detektiert wurden, mit den möglichen Zuckerstrukturen zu vergleichen. In der Tabelle 4.1 sind die theoretisch errechneten Molekularmassen zusammen mit der Zuckerstruktur der einzelnen Mutanten und des Wildtyp aufgelistet. Diese Angaben sind ohne LewisA-Epitop angegeben, da sie sich bei Arabidopsis bzw. bei Cruciferae allgemein kaum nachweisen lassen. Die Gene *FucTc* und *GalT* sind allerdings im Arabidopsisgenom vorhanden und das LewisA-Epitop ist mit dem JIM 84-Antikörper in Stängeln detektiert worden (Strasser et al., 2007b). Das LewisA-Epitop konnte nicht in allen Geweben von Arabidopsis gleich gut nachgewiesen werden. Da die Korrigan-Analysen dieser Arbeit nur an Blattmaterial durchgeführt wurden sind, ist es wahrscheinlich, dass kaum LewisA-Epitope vorhanden waren. Zudem kann es durch die Aufarbeitung des Blattmaterials zu Degradierungen der Zuckerstrukturen kommen, so dass Glucanasen oder Hydrolasen durch die Zerstörung der Vakuolen freigesetzt wurden und die äußerste Dekoration der Zuckerstrukturen abbauen konnten.

Die Größenabstufung von KOR1 in den Mutanten und dem Wildtyp aus Abb. 3.28 kann in nachstehende Reihenfolge gebracht werden:

cgl1-T – *fucTa/b/xylT* – *gnTII* – WT – (*fucTc*) – *manI/manII*.

Die Größe von KOR1 in der *stt3a-2*-Mutante kann durch die Breite des Korrigansignals nicht eindeutig zugeordnet werden, denn KOR1 kann in dem *stt3a*-Hintergrund keine distinkte Größe annehmen, da hier eine variable Glykosylierung stattfindet.

Tab. 4.1: Errechnete Molekularmasse der Glykane wie sie in den Mutanten und im WT auftreten. *fucTc*-Glykan ist wie WT, da LewisA-Epitop bei dieser Berechnung nicht ins Gewicht fällt.

Mutante	Struktur	Masse [kDa]
WT	Gn2M3FXGn2	1,61
<i>manI</i>	M8Gn2	1,74
	M7Gn2	1,58
<i>cglI</i>	M5Gn2	1,26
<i>manII (hglI)</i>	GnM5FXGn2	1,74
	M5FXGn2	1,53
	(GnM5Gn2	1,46)
<i>gnIII</i>	GnM3FXGn2	1,41
<i>fucTa/b/xylT</i>	Gn2M3Gn2	1,34
<i>fucTc</i>	Gn2M3FXGn2	1,61

Die Größe des Korrigansignals in der *manI*-Mutante liegt fast auf der gleichen Höhe wie das Signal im WT. In dem *manI*-Hintergrund müssten die Zuckerstrukturen eine Form von M8Gn2 aufweisen. Diese Struktur ist mit einer Größe von 1,74 kDa größer als die Wildtyp-Struktur (1,61 kDa). Unklar ist, ob die Zuckerketten in der *manI*-Mutante wirklich acht Mannosereste oder evtl. doch weniger besitzen. Die Molekularmasse würde bei 1,58 kDa liegen, wenn nur sieben Mannosen verknüpft wären. Da in den Pflanzen nicht alle Glykane immer in einer Form vorliegen, sondern auch Übergangsformen vorkommen können, würde der Mittelwert der Molekularmassen von M8Gn2/M7Gn2 bei 1,66 kDa liegen. Diese Angabe würde mit dem Größenverhältnis auf dem Western-Blot übereinstimmen.

Findet die Blockierung der N-Glykosylierung auf der Ebene von GNTI statt, so entstehen nur Zuckerstrukturen mit der Formel M5Gn2. Diese Struktur besitzt eine Molekularmasse von 1,26 kDa und ist somit das kleinste Glykan, das bei den Mutanten in dieser Analyse vorkommt. KOR1 in dem *cglI-T*-Hintergrund weist dementsprechend auch die geringste Größe auf.

Im direkten Vergleich der Laufhöhe von KOR1 in der *manII*-Mutante mit der ähnlichen Laufhöhe von KOR1 im WT oder in der *manI*-Mutante wird deutlich, dass das Vorkommen

dieser Zuckerstruktur GnM5Gn2 auf Grund der zu geringen Molekularmasse von 1,46 kDa widerlegt wird (daher in Tab. 4.1 in Klammern gesetzt). Durch den PNGase F-Verdau (siehe Abb. 3.27) konnte die *core*-Fucose bestätigt werden. Strasser et al. (2006) zeigten durch MALDI-TOF auch das Vorhandensein einer *core*-Xylose in der *manII*-Mutante. Die Glykane GnM5FXGn2 (22%, relative Menge an Glykanen in der Mutante) und M5FXGn2 (31%) akkumulieren in dieser Mutanten. Die durchschnittliche Masse der beiden Glykanen läge bei 1,64 kDa, womit sie im Größenverhältnis bei der Masse des WT-Glykans (1,61 kDa) läge und es die ähnliche Höhe auf dem Blot erklären könnte. Da das Glykan M5FXGn2 in der *manII*-Mutante akkumuliert, könnte gefolgert werden, dass die Transferasen XYLT und FUCTa/b vor der Aktivität von GNTI aktiv waren. Dagegen sprechen jedoch alle anderen Daten mit denen gezeigt werden konnte, dass GNTI-Aktivität zwingend nötig ist, um komplexe Zucker auszubilden. Anfangs wurde angenommen, dass der Transfer der beiden Zuckerreste zur selben Zeit stattfindet kurz nach der Aktivität von MANII (Johnson and Chrispeels, 1987). Später wurde von Lerouge et al. (1998) und Tezuka et al. (1992) die Vermutung aufgestellt, dass XYLT und FUCTa/b erst sehr spät nach der GNTII-Aktivität arbeiten. Da jedoch die *gnTII*-Mutante eine Immunreaktion mit dem *cgly*-Antikörper zeigte und somit komplexe Zuckerformen vorliegen, ist dies nicht möglich. Bencúr et al. (2005) zeigten, dass XYLT in mehreren Stadien der Glykanmodifikation aktiv sein kann. XYLT bevorzugt als Substrat die Struktur GnM3Gn2 und nur mit ca. 30% die Struktur GnM5Gn2, wodurch das Substratangebot für die XYLT nach Aktivität der MANII verbessert werden würde. Das Auftreten der Glykanstruktur M5FXGn2 ohne das terminale GlcNAc ist durch die Aktivität der Hexosaminidasen (vakuoläre und Plasmamembran-ständige) zu erklären, die das endständige GlcNAc auf dem α -1,3-Arm wieder abtrennen (Vitale and Chrispeels, 1984; Strasser et al., 2007b).

Bei der *gnTII*-Mutante verläuft das Korrigansignal unterhalb des Signals im Wildtyp und oberhalb des Signals in *cgII-T*. Mit Hilfe des Western-Blots, der mit dem *cgly*-Antikörper behandelt wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *gnTII*-Mutante komplexe Zucker besitzt. Daher ist die Struktur mit GnM3FXGn2 und einer Masse von 1,41 kDa wahrscheinlich und wird durch das Größenverhältnis von KOR1 in der Mutante bestätigt. Zumal KOR1 in der Tripelmutante *fucTa/b/xylT* unterhalb des Signals von KOR1 in der *gnTII*-Mutante liegt. Bei der Tripelmutante sind die Enzyme ausgeschaltet, die die *core*-Zucker Fucose und Xylose auf das Glykan übertragen. Damit entsteht eine Zuckerstruktur mit der Formel Gn2M3Gn2 und einer Masse von 1,34 kDa, was sich mit meinen Beobachtungen deckt.

4.5 Das LewisA-Epitop in Pflanzen

Um das Vorkommen des LewisA-Epitops nachzuweisen, wäre ein Antikörper gegen dieses Epitop hilfreich. Damit könnte z. B. bei der *gnTIII*-Mutante gezeigt werden, dass der 1,3-Arm mit dem terminalen GlcNAc eine LewisA-Dekoration besitzt, während der 1,6-Arm noch mit Mannosen versehen ist.

Als Alternative zu einem nativen LewisA-Epitop, habe ich erfolgreich den Zuckerrest Lacto-N-fucopentaose II (ein LewisA-Pentasaccharid aus der Muttermilch; die Struktur ist in Abb. 4.8A gezeigt) durch eine chemische Kopplung an das Trägerprotein BSA anbringen können. Das BSA wies nach der Kopplung eine größere Molekularmasse im SDS-Gel auf (Abb. 3.30). Mit diesem LewisA-dekoriertem BSA wurde ein LewisA-Antikörper in Kaninchen hergestellt. Der LewisA-Antikörper erkennt auch sein Antigen, wie in Abb. 3.31 gezeigt werden konnte. Er zeigte auch auf das reine Trägerprotein BSA eine Reaktion, doch durch eine Verarmung des Serums gegen BSA ist es möglich diese Reaktion zu reduzieren. Da schon lange diskutiert wurde, ob Arabidopsis überhaupt LewisA-Epitope ausbilden kann, wurde der Antikörper auch auf anderen Pflanzenspezies getestet. Jedoch konnte keine eindeutige Reaktion des Antikörpers mit Pflanzenextrakten verschiedener Spezies nachgewiesen werden.

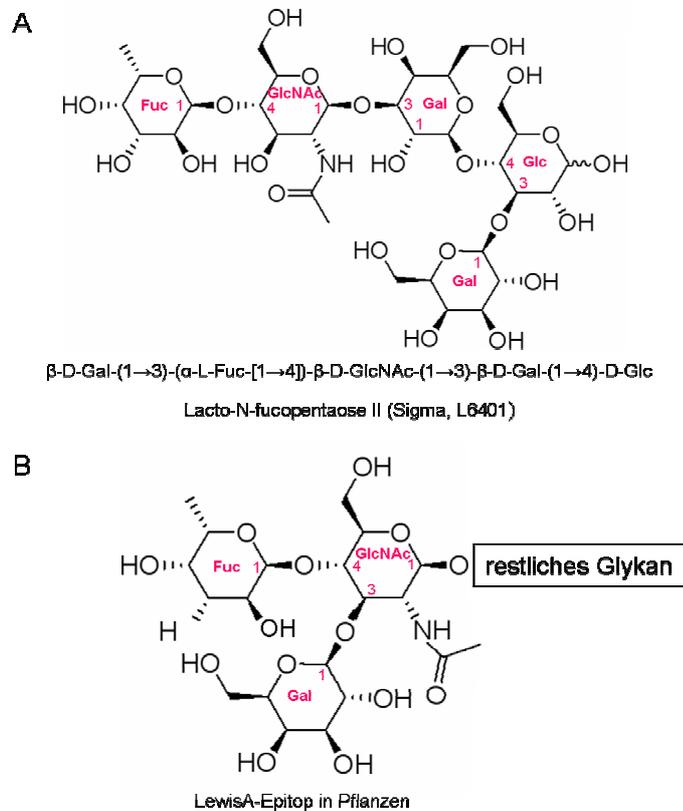


Abb. 4.8: Modell des LewisA-Pentasaccharids (Lacto-N-fucopentaose II), das an BSA gekoppelt wurde (A) und des LewisA-Epitops, wie es in Pflanzen vorkommt (B).

Der Antikörper erkannte in allen Pflanzenspezies eine Bande auf Höhe der RubisCO. Dabei handelt es sich nicht um die Erkennung der RubisCO direkt, sondern vermutlich um ein Protein, das von der großen Menge RubisCO auf dem Blot verdeckt wurde. Bei genauerer Betrachtung von Abb. 4.8A und im Vergleich zum LewisA-Epitop in pflanzlichen Glykanen (siehe Abb. 4.8B) sind die Strukturen nicht identisch.

Bei dem Pentasaccharid ist zwar eine Fucose und eine Galactose mit einem GlcNAc verknüpft, jedoch befinden sie sich nicht in der Positionen zueinander, in denen sie sich im pflanzlichen LewisA zueinander befinden. Das terminale GlcNAc in pflanzlichen LewisA-Epitopen ist mit dem C1-Atom an die Mannose des Grundgerüsts gebunden, das C3-Atom mit der Galactose und das C4-Atom mit der Fucose. Gerade die Fucose und Galactose kommen bei dieser Art der Verknüpfung an das GlcNAc in eine andere räumliche Position zueinander als in dem verwendeten Pentasaccharid (Sigma, L6401). Die unzureichende Erkennung des LewisA-Antikörpers in Pflanzengewebe könnte mit der unterschiedlichen Anordnung der Zuckerreste erklärt werden. Vor allem wenn man bedenkt, dass eine Verschiebung der *core*-Xylose um 30° wahrscheinlich einen starken Effekt auf die Erkennung des cgly-Antikörper von komplexen Glykanen haben könnte (siehe Abb. 4.7).

Der LewisA-Antikörper reagiert jedoch mit dem Apoplasteneluat von Tabakblättern (Abb. 3.32). Auch wenn mit der PonceauS-Färbung des Blots kaum Protein in den Spuren der Apoplasteneluate angefärbt wurde, so reagiert der Antikörper doch äußerst stark mit dem Material in den Spuren. Beim Ausschleudern des Apoplasteneluats können auch Zellwandkomponenten austreten, dabei handelt es sich zum Großteil auch um Zuckerstrukturen (z. B. Hemicellulose und Pektin). Es könnte durchaus sein, dass der LewisA-Antikörper nicht nur die LewisA-Epitope erkennt, sondern auch die Zellwandkomponenten. Da der Antikörper diese starke Reaktion auf dem Blot (Abb. 3.32) mit den Apoplasteneluat aus Tabak zeigte, wurden ebenfalls Apoplasteneluate aus Arabidopsisblättern isoliert. Doch auf dem Western-Blot mit Arabidopsis-Apoplasteneluat zeigte sich keine Reaktion mit dem LewisA-Antikörper. Dieses Ergebnis widerspricht der Vermutung, dass der LewisA-Antikörper verstärkt oder nur auf die Zellwandmaterialien reagiert. Zumal gezeigt wurde, dass LewisA-Epitope in Blättern von Arabidopsis nicht nachweisbar sind (JIM 84; Strasser et al., 2007b). Die Untersuchungen der LewisA-Dekoration fanden an Arabidopsis-Pflanzen des Ökotyps Columbia statt. In einem weiteren Versuch könnten die Gewebe oder Apoplasteneluate verschiedener Ökotypen von Arabidopsis untersucht werden (z. B. C24, Ler), um zu kontrollieren, ob die Nachweisbarkeit von LewisA bei diesen Pflanzen eindeutiger ist.

Erste Expressionsstudien von AtFUCTc-OFP aus Arabidopsis in Protoplasten zeigen eine ungewöhnliche Lokalisation dieses Konstruktes in der Zelle (Stephan Rips, persönliche Mitteilung). FUCTc, das letzte Enzym im N-Glykosylierungsweg, das zur Bildung des LewisA-Epitop nötig ist, wurde zwar über das ER und den Golgi-Apparat verteilt, markierte aber schließlich nur noch Kernhüllen. Analoge Fusionskonstrukte mit LeFUCTc aus Tomate zeigten diese Lokalisation nicht, sondern markierten wie erwartet Golgi-Stapel. Die Kernhüllen-Markierung scheint spezifisch für das Arabidopsis-Protein zu sein. Beide Proteinsequenzen enthalten je eine potentielle Glykosylierungsstelle allerdings an nicht konservierter Position. Wie Tunicamycin-Experimente zeigten, wird nur die Glykosylierungsstelle in der Arabidopsis-Sequenz genutzt. Interessanterweise konnten Tunicamycin die Kernhüllen-Markierung von AtFUCTc unterbinden (Stephan Rips, persönliche Mitteilung). Wir vermuten, dass die Arabidopsis FUCTc-Sequenz in der Evolution diese genutzte Glykosylierungsstelle durch Mutation erworben hat. Arabidopsis ist ein reiner Selbstbestäuber, so dass nicht-letale Mutationen im Genom akkumulieren könnten (Hypothese, Prof. von Schaewen). Das würde auch zur Erklärung der schlechten Nachweisbarkeit von LewisA-Epitopen in Arabidopsis beitragen. Für weitere Analysen wäre es sinnvoll ein Antikörper gegen FUCTc aus Arabidopsis herzustellen, mit dem die Lokalisation der Glykosyltransferase FUCTc in Gewebeschnitten untersucht werden könnte. Mit diesem Ansatz könnte die Kernhüllenlokalisierung von FUCTc bestätigt oder widerlegt werden. Je nach Spezifität des Antikörpers könnten auch weitere Pflanzenspezies (Tomate, Kartoffel, Tabak) in diese Untersuchung mit einbezogen werden.

5 Zusammenfassung

Um Anhaltspunkt für die Regulation der Zellwandbiosynthese in Pflanzen zu erhalten, sollten in der vorliegenden Arbeit Protein-Protein-Interaktionen der Cellulosesynthase A1 mit anderen Proteinen experimentell nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems konnten Interaktionspartner der Cellulosesynthase A1 identifiziert werden. Insgesamt wurden fünf mögliche Protein-Protein-Interaktionen ermittelt. Darunter waren eine Glykosylhydrolase (Raffinosynthase), die Untereinheit eines Motorproteins aus der Kinesin-Familie, ein Regulationsfaktor und zwei Enzyme, die im Apoptose-Signalweg involviert sein sollen.

Die transiente Überexpression der CESA1-XFP-Konstrukte offenbarte, dass die kurze CESA1-Version (N-Terminus und die ersten zwei Transmembrandomänen) im ER akkumulierte, während die verschiedenen Vollängenkonstrukte bis in den Golgi-Apparat geschleust wurden, jedoch fand eine detektierbare Markierung der Plasmamembran nicht statt.

Die Analyse der *cgl1*-Mutanten und ihre Kreuzungen in *stt3a-2* zeigte, dass die EMS-Mutante C5 keine wahre Null-Mutante im Gegensatz zu C6 und *cgl1-T* ist, da das Protein seine katalytische Aktivität im *stt3a-2*-Hintergrund wiedererlangen konnte. Die Mutation in C6 führt zu einem verfrühten Abbruch der Translation, indem das 14. Intron entweder nicht herausgespleißt wird oder ein alternativer Spleißvorgang ein *frame shift* hervorruft. Bei der T-DNA-Insertionsmutante *cgl1-T* wird das Intron, in dem die Insertion liegt, bei der mRNA-Reifung nicht entfernt. In den Doppelmutanten mit *stt3a-2* tritt in Kombinationen mit den wahren Nullmutanten für *cgl1* ein Wurzelphänotyp auf. Die Wurzeln sind im Wuchs verkürzt (40% kürzer gegenüber WT), besitzen längere, dünnere Wurzelhaare und bilden mehr Verzweigungen der Wurzeln unterhalb des Hypocotyls aus.

Die an der Zellwandbiosynthese beteiligten Gene *CESA1* und *KOR1* weisen bei einer Mutation einen *radial swelling*-Phänotyp auf, wie in früheren Publikationen gezeigt. Einen entsprechenden Phänotyp zeigten die Glykosylierungsmutanten *cgl1-T* und *stt3a-2* bei Salzstress, was darauf schließen lässt, dass eine korrekte Glykosylierung für die Zellwandsynthese wichtig ist.

Die Mutation in der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* (lückenhafte Glykosylierung mit nicht komplexen Glykanen) hat Auswirkungen auf das Glykoprotein KOR1, da in Protoplasten der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* eine zeitlich verzögerte Lokalisation des Fluoreszenzmarkierten Proteins KOR1 an der Plasmamembran zu beobachten war. Weitere Kreuzungen der Doppelmutante *cgl1-T stt3a-2* mit der Cellulosesynthase A1-Mutante *rsw1-1* unterstützten

dieses Ergebnis. Die Tripelmutante *cgl1-T stt3a-2 rsw1-1* entsprachen dem Phänotyp zu *rsw2-1 rsw1-1*-Mutante, so dass *cgl1-T stt3a-2* den gleichen Einfluss auf die Tripelmutante hat wie *rsw2-1* auf die Doppelmutante.

Die immunologischen Untersuchungen der einzelnen Glykosylierungsmutanten und die vermuteten und bekannten Strukturen der N-Glykane in *Arabidopsis thaliana* stimmten mit denen der Analysen durch die Antikörper (cgly- und KOR1-Antikörper) überein. Die *manII*-Mutante zeigte Unterschiede zu den veröffentlichten Daten. Durch 3D-Modellierung wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Xylose in den *manII*-Glykanen in einem anderen Winkel an der β -Mannose angebracht ist und der cgly-Antikörper seine antigene Determinanten nur zum Teil erkennt.

Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte polyklonale Antiserum gegen das LewisA-Pentasaccharid steht für weitere immunologische Arbeiten und Optimierungen zur Verfügung, um Dekorationen mit LewisA-Epitopen in Pflanzen zu untersuchen.

6 Literatur

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) *Molecular Biology of The Cell*. 4th edition, New York: Garland Science
- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott S and Delmer DP (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9353-9357
- Andréasson E, Jørgensen LB, Höglund AS, Rask L and Meijer J (2001) Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 127: 1750-1763
- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camelleri C, Höfte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279: 717-720
- Barth C and Jander G (2006) *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J.* 46: 549-562
- Bartel PL and Fields S (1997) *The yeast two-hybrid system*. Oxford University Press, Inc.
- Bencúr P, Steinkellner H, Svoboda B, Mucha J, Strasser R, Kolarich D, Hann S, Köllensperger G, Glössl J, Altmann F and Mach L (2005) *Arabidopsis thaliana* β 1,2-xylosyltransferase: an unusual glycosyltransferase with the potential to act at multiple stages of the plant N-glycosylation pathway. *Biochem. J.* 388: 515-525
- Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser MT and Aeschbacher RA (1993) Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57-70
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acid Res.* 7: 1513-1523
- Boevink P, Oparka K, Santa-Cruz S, Martin B, Betteridge A and Hawes C (1998). Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15: 441-447
- Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S and Ohad N (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40: 419-427
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54
- Brandizzi F, Fragne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N (2002) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* 14: 1077-1092

- Brandizzi F, Hanton S., da Silva L.L., Boevink P., Evans D., et al (2003). ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J.* 34: 269-81.
- Buchanan B, Gruissem W and Jones (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA
- Burn JE, Hurley UA, Birch RJ, Arioli T, Cork A, Williamson RE. (2002) The cellulose-deficient *Arabidopsis* mutant *rsw3* is defective in a gene encoding a putative glucosidase II, an enzyme processing N-glycans during ER quality control. *Plant J.* 32: 949-960
- Cao A, Jain A, Baldwin JC and Raghothama KG (2007) Phosphate differentially regulates 14-3-3 family members and GRF9 plays a role in Pi-starvation induced response. *Planta* 226: 1219-1230
- Carmi N, Zhang G, Petreikov M, Gao Z, Eyal Y, Granot D and Schaffer A (2003) Cloning and functional expression of alkaline α -galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *Plant J.* 33: 97-106
- Cipollo JF, Awad AM, Costello CE and Hirschberg CB (2005) N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J. Biol. Chem.* 280: 26063–26072
- Cipollo JF, Costello CE and Hirschberg CB (2002) The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans. *J. Biol. Chem.* 277: 49143–49157
- Crawley SC, Hindsgaul O, Ratcliffe RM, Lamontagne LR and Palcic MM (1989) A plant fucosyltransferase with human lewis blood-group specificity. *Carbohydr. Res.* 193: 249-259
- D'Andrea LD and Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* 28: 655-62
- Delmer D (1999) CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 245–276
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D and Delmer DP (2002) Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43: 1407-1420
- Doukhanina EV, Shaorong C, van der Zalm E, Godzik A, Reed J and Dickman MB (2006) Identification and Functional Characterization of the BAG Protein Family in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 281: 18793-18801
- Elbein AD (1987) Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 497-534
- Emons AMC, Mulder BM (2000) How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends Plant Sci.* 5: 35-40
- Fabini G, Freilinger A, Altmann F and Wilson IBH (2001) Identification of core α -1,3-fucosylated glycans and the requisite fucosyltransferase in *Drosophila melanogaster*: potential basis of the neural anti-horseradish peroxidase epitope. *J. Biol. Chem.* 272: 28058-28067

- Falk A, Ek B and Rask L (1995) Characterization of a new myrosinase in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 27: 863-874
- Fagard M, Desnos T, Desprez T, Gobet F, Refregier G, Mouille G, McCann M, Rayon C, Vernhettes S and Höfte H (2000) PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase requires for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2409-2423
- Favery B, Ryan E, Foreman J, Linstead P, Boudonck K, Steer M, Shaw P and Dolan L. (2001) *KOJAK* encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15: 79-89
- Faye L, Gomord V, Fitchette-Lainé AC and Chrispeels M J (1993) Affinity Purification of Antibodies Specific for Asn-Linked Glycans Containing $\alpha 1 \rightarrow 3$ Fucose or $\beta 1 \rightarrow 2$ Xylose *Anal. Biochem.* 15: 104-108
- Fitchette AC, Cabanes-Macheteau M, Marvin L, Martin B, Satiat-Jeunemaitre B, Gomord V, Crooks K, Lerouge P, Faye L and Hawes C (1999) Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cell. *Plant Physiol.* 121: 333-344
- Fichette-Lainé AC, Gomord V, Cabanes M, Michalski JC, Saint Macary M, Foucher B, Cavelier B, Hawes C, Lerouge P and Faye L (1997) N-glycans harbouring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J.* 12: 1411-1417
- Fitchette-Lainé AC, Gomord V, Chekkafi A and Faye L (1994) Distribution of xylosylation and fucosylation in the plant Golgi apparatus. *Plant J.* 5: 673-682
- French AD, Miller DP, Aabloo A (1993) Miniature crystal models of cellulose polymorphs and other carbohydrates. *Int. J. Biol. Macromol.* 15: 30-36
- Fujiki Y, Ito M, Nishida I and Watanabe A (2000) Multiple Signalling Pathways in Gene Expression during Sugar Starvation. Pharmacological Analysis of *din* Gene Expression in Suspension-Cultured Cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1139-1147
- Giddings TH, Staehelin LA (1988) Spatial relationship between microtubules and plasma-membrane rosettes during the deposition of primary wall microfibrils in *Closterium sp.* *Planta* 173: 22-30
- Giddings T.H., Staehelin L.A. (1991) Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis. In: Lloyd C.W. (1991) "The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form". London, Academic Press, pp. 85-99
- Gietz RD and Woods RA (2002) Transformation of yeast by LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350: 87-96
- Gillmor CS, Poindexter P, Lorieau J, Palcic MM and Somerville C (2002) Alpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *J. Cell Biol.* 156: 1003-1013
- Hadlington JL and Denecke J (2000) Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 461-468

- Haigler CH, Blanton RL (1996) New hope for old dreams: Evidence that plant cellulose synthase genes have finally been identified. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12082-12085
- Hammond C, Braakman I and Helenius A (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 913-917
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher D and Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2122-2127
- Hauser MT, Morikami A and Benfey PN (1995) Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. *Development* 121: 1237-1252
- Hebert DN, Garman SC and Molinari M (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: Asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell. Biol.* 15: 364-370
- Heldt HW (1999) Pflanzenbiochemie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA and Aebi M (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* 415: 447-450
- Hori K and Watanabe Y (2007) Context Analysis of Termination Codons in mRNA that are Recognized by Plant NMD. *Plant Cell Physiol.* 48: 1072-1078
- Horsley D, Coleman J, Evans D, Crooks K, Peart J, Satiat-Jeunemaitre B and Hawes C (1993) A monoclonal antibody, JIM 84, recognizes the Golgi apparatus and plasma membrane in plant cells. *J. Exp. Bot.* 44: 223-229
- Ilgenfritz H, Bouyer D, Schnittger A, Mathur J, Kirik V, Schwab B, Chua NH, Jürgens G and Hülskamp M (2003) The *Arabidopsis* *STICHEL* Gene Is a Regulator of Trichome Branch Number and Encodes a Novel Protein. *Plant Physiol.* 131: 643-655
- Ioffe E and Stanley P (1994) Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 728-732
- Jacob-Wilk D, Kurek I, Hogan P and Delmer DP (2006) The cotton fiber zinc-binding domain of cellulose synthase A1 from *Gossypium hirsutum* displays rapid turnover *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 12191-12196
- Johansen JN, Vernhettes S and Höfte H (2006) The ins and outs of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 616-620
- Johnson KD and Chrispeels MJ (1987) Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. *Plant Physiol.* 84: 1302-1308

- Kang JS, Frank J, Kang CH, Vikram M, Ueda A, Kim S, Bahk JD, Triplett B, Fujiyama K, Lee SY, von Schaewen A and Koiwa H (2008) Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press
- Kaushal G, Pastuszak I, Hatanaka KI, Elbein AD (1990) Purification to homogeneity and properties of glucosidase II from mung bean seedlings and suspension-cultured soybean cells. *Journal of Biology Chemistry* 265: 16271-16279
- Kim J, Harter K and Theologis A (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11786-11791
- Knauer R and Lehle L (1999) The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1426: 259-273
- Koiwa H, Li F, McCully MG, Mendoza I, Koizumi N, Manabe Y, Nakagawa Y, Zhu J, Rus A, Pardo JM, Bressan RA and Hasegawa PM (2003) The STT3a Subunit Isoform of the Arabidopsis Oligosaccharyltransferase Controls Adaptive Response to Salt/Osmotic Stress. *Plant Cell* 15: 2273-2284
- Kornfeld R and Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54: 631-664
- Kurek I, Kawagoe Y, Jacob-Wilk D, Doblin M and Delmer D (2002) Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11109-11114
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LaFayette PR, Eriksson KE and Dean JFD (1995) Nucleotide Sequence of a cDNA Clone Encoding an Acidic Laccase from Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus* L.) *Plant Physiol.* 107: 667-668
- Lane DR, Wiedemeier A, Peng L, Höfte H, Vernhettes S, Desprez T, Hocart CH, Birch RJ, Baskin TI, Burn JE, Arioli T, Betzner AS and Williamson RE (2001) Temperature-Sensitive Alleles of RSW2 Link the KORRIGAN Endo-1,4-beta-Glucanase to Cellulose Synthesis and Cytokinesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126: 278-288
- Lauriere M, Lauriere C, Chrispeels MJ, Johnson KD and Sturm A (1989) Characterization of a Xylose-Specific Antiserum That Reacts with the Complex Asparagine-Linked Glycans of Extracellular and Vacuolar Glycoproteins. *Plant Physiol.* 90: 1182-1188
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fitchette-Lainé AC, Gomord V and Faye L (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* 38: 31-48
- Lerouxel O, Mouille G, Andème-Onzighi C, Bruyant MP, Séveno M, Loutelier-Bourhis C, Driouch A, Höfte H, and Lerouge P (2005) Mutants in DEFECTIVE GLYCOSYLATION, an Arabidopsis homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein underglycosylation and defects in cell differentiation and growth. *Plant J.* 42: 455-468

- Lloyd C (2006) Microtubules Make Tracks for Cellulose. *Science* 312: 1482-1483
- Logeman J, Schell J and Willmitzer L (1987) Improved methods for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163: 16-20
- Meier I (2007) Composition of the plant nuclear envelope: theme and variations. *J. Exp. Bot.* 58: 27-34
- Melo NS, Nimitz M, Conradt HS, Fevereiro PS and Cost J (1997) Identification of the human Lewis^a carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.). *FEBS lett.* 415: 186-191
- Metzler M, Gertz A, Sarkar M, Schachter H, Schrader JW and Marth JD (1994) Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development. *EMBO J.* 13: 2056-2065
- Mølhøj M, Ulvskov P and Degan FD (2001) Characterization of a Functional Soluble Form of a *Brassica napus* Membrane-Anchored Endo-1,4- β -Glucanase Heterologously Expressed in *Pichia pastoris*. *Plant Physiol.* 127: 674-684
- Mueller SC, Brown RM JR (1982) The control of microfibril deposition in the cell wall of higher plants. I. Can directed membrane flow orient cellulose microfibrils? Indirect evidence from freeze-fractured plasma membranes of maize and pine seedlings. *Planta* 154: 501-515
- Munro S (1995) A comparison of the transmembrane domains of Golgi and plasma membrane proteins. *Biochemical Society Transactions* 23: 527-530
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Navazio L, Baldan B, Mariani P, Gerwig GJ and Vliegenthart JFG (1996) Primary structure of the N-linked carbohydrate chains of calreticulin from spinach leaves. *Glycokonjugate J.* 13: 977-983
- Nebenführ A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlick JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB and Staehelin LA (1999) Stop-and-Go Movements of Plant Golgi Stacks Are Mediated by the Acto-Myosin System. *Plant Physiol.* 121: 1127-1141
- Nebenführ A and Staehelin LA (2001) Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 160-67
- Neugebauer KM (2006) Please hold – the next available exon will be right with you. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13: 385-386
- Neumann U, Brandizzi B and Hawes C (2003) Protein transport in plant cells: in and out of Golgi. *Ann. Bot.* 92: 167-180
- Nicol F, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H and Höfte H (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 19: 5563-5576

- Oppenheimer DG, Pollock MA, Vacik J, Szymanski DB, Ericson B, Feldmann K and Marks MD (1997) Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6261-6266
- Paradez AR, Somerville CR and Ehrhardt DW (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312: 1491-1495
- Paris N and Neuhaus JM (2002) BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol. Biol.* 50: 903-914
- Paris N, Stanley CM, Jones RL and Rogers JC (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 85: 563-72
- Parodi AJ, Mendelzon DH, Lederkremer GH and Martin-Barrientos J (1984) Evidence that transient glycosylation of protein-linked Man₉GlcNAc₂, Man₈GlcNAc₂ and Man₇GlcNAc₂ occurs in rat liver and *Phaseolus vulgaris* cells. *J. Biol. Chem.* 259: 6351-6357
- Peng L, Kawagoe Y, Hogan P and Delmer D (2002) Sitosterol- β -glucoside as Primer for Cellulose Synthesis in Plants. *Science* 295: 147-150
- Rehwinkel J, Raes J and Izaurralde E (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem. Sci.* 31: 639-46
- Rips, Stephan (2005) Subzelluläre Lokalisation von Membranproteinen im Sekretorischen System Höherer Pflanzen. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Robert S, Bichet A, Grandjean O, Kierzkowski D, Satiat-Jeunemaître B, Pelletier S, Hauser MT, Höfte H and Vernhettes S (2005) An *Arabidopsis* Endo-1,4- β -D-Glucanase Involved in Cellulose Synthesis Undergoes Regulated Intracellular Cycling. *Plant Cell* 17: 3378-3389
- Rooney MF and Ferl RJ (1995) Sequences of Three *Arabidopsis* General Regulatory Factor Genes Encoding GF14 (14-3-3) Proteins. *Plant Physiol.* 107: 283-284
- Roudier F, Fernandez AG, Fujita M, Himmelspach R, Borner GH, Schindelman G, Song S, Baskin TI, Dupree P, Wasteneys GO, Benfey PN (2005) COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell* 17: 1749-1763
- Saint-Jore-Dupas C, Gomord V and Paris N (2004) Protein localization in the plant Golgi apparatus and the *trans*-Golgi network. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 159-171
- Saint-Jore-Dupas C, Nebenführ A, Boulaflous A, Follet-Gueye ML, Plasson C, Hawes C, Driouich A, Faye L and Gomord V (2006) Plant *N*-Glycan Processing Enzymes Employ Different Targeting Mechanisms for Their Spatial Arrangement along the Secretory Pathway. *Plant Cell* 18: 3182-3200
- Schwab B, Folkers U, Ilgenfritz H and Hülskamp M (2000) Trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Phil. Trans. R. Lond. B* 355: 879-883

- Seagull RW (1986) Changes in microtubule organization and microfibril orientation during in vitro cotton fiber development: an immunofluorescent study. *Can. J. Bot.* 64: 1373-1381
- Singer SJ (1990) The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296
- Somerville C (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 53-78
- Staehelin LA and Moore I (1995) The plant Golgi apparatus: structure, functional organisation and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 46: 261-288
- Staudacher E, Dalik T, Wawra P., Altman F and März L (1995) Functional purification and characterization of a GDP-fucose: β -N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) α -1,3-fucosyltransferase from mung beans. *Glycoconjugate Journal* 12: 780-786
- Strasser R, Altmann F, Mach L, Glössl J and Steinkellner H (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. *FEBS Lett.* 561: 132-136
- Strasser R, Bondili JS, Schoberer J, Svoboda B, Liebming E, Glössl J, Altmann F, Steinkellner H and Mach L (2007a) Enzymatic Properties and Subcellular Localization of *Arabidopsis* β -N-Acetylhexosaminidases. *Plant Physiol.* 145: 5-16
- Strasser R, Bondili JS, Vavra U, Schoberer J, Svoboda B, Glössl J, Léonard R, Stadlmann J, Altmann F, Steinkellner H and Mach L (2007b) A Unique β 1,3-Galactosyltransferase Is Indispensable for the Biosynthesis of N-Glycans Containing Lewis a Structures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 2278-2292
- Strasser R, Schoberer J, Jin C, Glössl J, Mach L and Steinkellner H (2006) Molecular cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* Golgi α -mannosidase II, a key enzyme in the formation of complex N-glycans in plants. *Plant J.* 45:789-803
- Strasser R, Stadlmann J, Svoboda B, Altmann F, Glössl J and Mach L (2005) Molecular basis of N-Acetylglucosaminyltransferase I deficiency in *Arabidopsis thaliana* plants lacking complex N-glycans. *Biochem. J.* 387: 385-391
- Strasser R, Steinkellner H, Borén M, Altmann F, Mach L, Glössl J and Mucha J (1999) Molecular cloning of cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase II from *Arabidopsis thaliana*. *Glycoconj. J.* 16: 787-91
- Stryer L (1996) Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Sturm A (1991) Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of 2 secreted carrot glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* 199: 169-179
- Sturm A, Bergwerff AA and Vliegthart JFG (1992) H-NMR structural determination of the N-linked carbohydrate chains on glycopeptides obtained from the bean lectin *phytohemagglutinin*. *Eur. J. Biochem.* 204: 313-316

- Sturm A, Johnson KD, Szumilo T, Elbein AD and Chrispeel MJ (1987) Subcellular localisation of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of the N-linked oligosaccharides. *Plant Physiol.* 85: 741-745
- Szumilo T, Kaushal GP and Elbein AD (1986) Purification and properties of a glucosidase I from mung bean seedlings. *Arch. Bioche. Biophys.* 247: 261-271
- Szyjanowicz PM, McKinnon I, Taylor NG, Gardiner J, Jarvis MC and Turner SR (2004) The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrigan that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 37: 730-40
- Taylor NG, Laurie S and Turner SR (2000) Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2409-2423
- Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR and Turner SR (1999) The *irregular xylem3* locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell* 11: 769-779
- Tezuka K, Hayashi M, Ishihara H, Akazawa T and Takahashi N (1992) Studies on synthetic pathway of xylose-containing N-linked oligosaccharides deduced from substrate specificities of the processing enzymes in sycamore cells (*Acer pseudoplatanus* L.). *Eur. J. Biochem.* 203: 401-413
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-814
- Towbin H, Staehelin J and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Trombetta SE, Bosch M and Parodi AJ (1989) Glycosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry* 28: 8108-8116
- Tse Y.C., Mo B., Hillmer S., Zhao M., Lo S.W., et al., (2004) Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* 16: 672-93
- Tulsiani DRP and Touster O (1983) Swainsonine Causes the Production of Hybrid Glycoproteins by Human Skin Fibroblasts and Rat Liver Golgi Preparations. *J. Biol. Chem.* 258: 7578-7585
- Turgeon R (1996) Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* 1: 418-423
- van Remoortere A, Hokke CH, van Dam GJ, van Die I, Deelder AM and van den Eijnden DH (2000) Various stages of *Schistosoma* express Lewis(x), LacdiNAc, GalNAcbeta1-4 (Fucalpha1-3)GlcNAc and GalNAcbeta1-4(Fucalpha1-2Fucalpha1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology* 10: 601-609

- Vitale A and Chrispeels M (1984) Transient N-acetylglucosamine in the biosynthesis of phytohemagglutinin: attached in the Golgi apparatus and removal in protein bodies. *J. Cell Biol.* 99: 133-140
- von Schaewen A, Sturm A, O'Neill J and Chrispeels MJ (1993) Isolation of a Mutant *Arabidopsis* Plant That Lacks N-Acetyl Glucosaminyl Transferase I and Is Unable to Synthesize Golgi-Modified Complex N-Linked Glycans. *Plant Physiol.* 102: 1109-1118
- Walter M, Chaban C, Schütze, K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blasevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K and Kudla, J (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40: 428-438
- Wenderoth I and von Schaewen A (2000) Isolation and Characterization of Plant N-Acetyl Glucosaminyltransferase I (*GntI*) cDNA Sequences. Functional Analyses in the *Arabidopsis cgl* Mutant and in Antisense Plants. *Plant Physiol.* 123: 1097-1108
- Wilson IBH (2002) Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 569-577
- Zeng Y, Bannon G, Thomas Hayden V, Rice K, Drake R and Elbein A (1997) Purification and specificity of β 1,2-xylosyltransferase, an enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins. *Journal of Biology and Biochem.* 272: 31340-31347
- Zuo J, Niu QW, Nishizawa N, Wu Y, Kost B, and Chua NH (2000) KORRIGAN, an *Arabidopsis* Endo-1,4- β -Glucanase, Localizes to the Cell Plate by Polarized Targeting and Is Essential for Cytokinesis. *Plant Cell* 12: 1137-1152

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	L-Adenin
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAG	<i>Bcl-2-associated anthogene</i>
BD	Bindedomäne
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
BiP	<i>binding protein</i>
BLAST	„ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> “
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CESA1	Cellulosesynthase A1
CFP	cyanfluoreszierendes Protein
<i>cgl</i>	<i>complex glycan less</i>
<i>cgly</i>	<i>complex glycan</i>
cLSM	konvokales Laserscanningmikroskop
COB	COBRA
Col	Columbia
ConA	Concanavalin A
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
<i>din10</i>	<i>dark inducible10</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>endoplasmic reticulum associated protein degradation</i>
Fru	Fructose
Fuc	Fucose
FUCTa - b - c	Fucosyltransferase A oder B oder C
g	Erdbeschleunigung
GA	Golgi-Apparat
Gal	Galactose
GALT	Galactosyltransferase
GDP	Guanindiphosphatinositol
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GNTI oder II	N-Acetylglucosaminyltransferase I oder II
GPI	Glykosylphosphatidyl
GRF3	<i>general regulatory factor 3</i>
His	L-Histidin
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Hsc	<i>heat shock cognate</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
KLC	<i>kinesin light chain</i>
KOR1	Endoglucanase Korrigan
M	Molar
MALDI-TOF	matrix-assistierte Laserdesorptions-/Ionisationszeit der Flugzeitmassenspektrometrie
Man	Mannose
MANI oder II	α-Mannosidase I oder II
MOPS	3-(N-Morpholino)-propan-sulfonat
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Murashige & Skoog-Medium

MW	Molekularmasse
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
OD	optische Dichte
OPF	orange fluoreszierendes Protein
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “, Polymerasekettenreaktion
PHA-L	Phytohemagglutinin L
PNGaseF	Peptid-N-Glycosidase F
RaSy	Raffinosesynthase
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFO	Raffinose-Familie Oligosaccharide
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>rsw</i>	<i>radial swelling</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SD	Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SiP	<i>seed imbibition protein</i>
snRNAs	<i>small nuclear RNAs</i>
snRNPs	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
SPS	Saccharosephosphatsynthase
STI	STICHEL
STT3	Untereinheit STT3 der OST
SuSy	Saccharosesynthase
T-DNA	transferierte DNA
TEMED	NNNN-Tetramethylethylendiamin
TGG1	β -Thioglucosid Glucohydrolase, Myrosinase
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TPRs	<i>tetraricopeptide repeats</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
Trp	L-Tryptophan
UDP	Uridindiphosphat
ÜN	über Nacht
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Ws	Wassilewskija
WT	Wildtyp
XFP	fluoreszierendes Protein
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
Xyl	Xylose
XYLT	Xylosyltransferase
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZWI	ZWICHEL

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Das Tonnen-Modell einer Cellulosesynthase-Untereinheit.....	2
Abb. 1.2: Cellulosemikrofibrillenablagerung in der Zellwand.....	3
Abb. 1.3: Strukturen der verschiedenen Formen von N-Glykanen in Pflanzen.	7
Abb. 1.4: N-Glykosylierung im Sekretorischen System von Höheren Pflanzen.....	11
Abb. 3.1: Tonnen-Modelle und postulierte Membrantopologie der GFP/YFP-CESA1-Konstrukte.....	48
Abb. 3.2: cLSM-Aufnahmen zur Lokalisation der GFP/YFP-CESA1-Konstrukte in Arabidopsis-Proto-plasten.	49
Abb. 3.3: Co-Expression von CESA1-short-GFP mit ER-OPF (A) und CGL1-OPF (B) in Tabak-Proto-plasten.	52
Abb. 3.4: Co-Expression von CESA1-full-GFP mit ER-OPF (A) und CGL1-OPF (B) in Tabak-Proto-plasten. ...	52
Abb. 3.5: Co-Expression von CESA1-short-GFP und KOR1-OPF in Tabak-Proto-plasten.	53
Abb. 3.6: Co-Expression von CESA1-full-GFP und KOR1-OPF in Tabak-Proto-plasten.....	54
Abb. 3.7: Beispiele der Auswertung der Hefe-2-Hybrid-Analyse mit pGBKT7-CESA1-loop als bait.	55

Abb. 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von KLC-OFP (A) und OFP-KLC (B) in Tabak-Protoplasten. .	57
Abb. 3.9: Co-Expression von YFP-CESA1- Δ 15-full mit KLC-OFP in Tabak-Protoplasten.....	58
Abb. 3.10: Analyse der homozygoten <i>cglI-T</i> -Mutante.	60
Abb. 3.11: <i>nonstainer</i> -Test der Einzel- und Doppelmутanten.....	62
Abb. 3.12: Wurzelphänotyp der Arabidopsis Einzel- und Doppelmутanten.	64
Abb. 3.13: REM-Aufnahmen der Arabidopsis-Einzelmutanten <i>cglI-T</i> und <i>stt3a-2</i> und der Doppelmутante <i>cglI-T stt3a-2</i> sowie des Wildtyps.	65
Abb. 3.14: RT-PCR mit T-DNA-bindenden Primern (RBa1 und LBa1) und <i>cglI</i> -Primern.	66
Abb. 3.15: RT-PCR Analyse der <i>cglI</i> -Mutanten.	67
Abb. 3.16: RT-PCR Analyse der <i>cglI</i> -Mutanten mit dem Intron 14-Primer und verschiedenen Antisense-Primern.....	68
Abb. 3.17: Überprüfung der Lokalisation von KOR1-GFP in Protoplasten der Mutanten.	70
Abb. 3.18: REM-Aufnahmen von <i>cglI-T stt3a-2</i> , <i>rsw2-1</i> , <i>rsw1-1</i> und <i>rsw2-1 rsw1-1</i> sowie Kreuzungen aus diesen Mutanten.	73
Abb. 3.19: Identifizierung der <i>gnTII-T</i> -DNA-Mutante (FLAG-Linie).	75
Abb. 3.20: Identifizierung der <i>fucTc-T</i> -DNA-Mutante (FLAG-Linie).	76
Abb. 3.21: SDS-PAE und Coomassie-Färbung der löslichen Blatthextrakte der Glykosylierungsmutanten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
Abb. 3.22: Sequenz der Myrosinase (TGG1).	78
Abb. 3.23: <i>nonstainer</i> -Test der Mutanten <i>fucTa</i> , <i>fucTb</i> , <i>fucTa/b</i> , <i>xylT</i> und <i>fucTa/b/xylT</i>	79
Abb. 3.24: <i>nonstainer</i> -Test von Glykosylierungsmutanten.....	79
Abb. 3.25: α -Mannosidase-Behandlung von Arabidopsis-Glykosylierungsmutanten (geblottete Blatt-Extrakte).80	
Abb. 3.26: α -Mannosidase-Behandlung von Arabidopsis-Glykosylierungsmutanten (TCA-gefällte Blattextrakte).	81
Abb. 3.27: PNGaseF-Analyse von Arabidopsis-Glykosylierungsmutanten.....	83
Abb. 3.28: Analyse der Glykosylierungsmutanten mit Hilfe des KOR1-Antikörpers.	84
Abb. 3.29: Detektion von KORRIGAN aus Blatthextrakten mit dem KOR1-Antikörper im Vergleich verschiedener Extraktionspuffer.	85
Abb. 3.30: Kopplung eines LewisA-Glykans an das Trägerprotein BSA.	86
Abb. 3.31: Test des LewisA-Antikörpers auf Blattextrakten von Arabidopsis, Tabak, Tomate und Kartoffel.....	87
Abb. 3.32: Test des LewisA-Antikörpers auf Signalerkennung in Apoplasteneluate aus Tabak.	88
Abb. 4.1: Modell eines Kinesinproteins.	97
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Rosetten-Mikrotubuli-Schienen-Hypothese.....	97
Abb. 4.3: Zusammenfassung der <i>cglI</i> -Mutanten <i>cglI-T</i> , C5 und C6.	101
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Auswirkungen der Mutationen auf die CGLI-Proteine.	103
Abb. 4.5: Mutierte Arabidopsis-Allele zur Untersuchung von N-Glykosylierungsdefekten im Sekretorischem System.....	109
Abb. 4.6: Schematische Darstellung der Glykane in verschiedenen N-Glykosylierungsmutanten.....	113
Abb. 4.7: 3D-Strukturmodelle der N-Glykane im WT (A) und in der <i>manII</i> -Mutante (B).	117
Abb. 4.8: Modell des LewisA-Pentasaccharids (Lacto-N-fucopentaose II), das an BSA gekoppelt wurde (A) und des LewisA-Epitops, wie es in Pflanzen vorkommt (B).	124

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Chemikalien und deren Hersteller.....	13
Tab. 2.2: Aufgelistet sind die verwendeten Arabidopsismutanten.	15
Tab. 2.3: Liste der verwendeten Stämme von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).	19
Tab. 2.4: Liste der verwendeten Plasmide.....	19
Tab. 2.5: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer.	25
Tab. 3.1: Ergebnis der 51 möglichen Interaktionspartner eines Hefe-2-Hybrid- <i>screens</i> mit dem <i>CESA1-loop</i> nach <i>Mini-mating</i> und Sequenzierung.	56
Tab. 4.1: Errechnete Molekularmasse der Glykane wie sie in den Mutanten und im WT auftreten.	122

7.4 Sequenzen zur Herstellung von Konstrukten

7.4.1 DNA- und Protein-Sequenz der Cellulosesynthase A1 aus *A. thaliana* (At4g32410)

ATGGAGGCCAGTGCCGGCTTGGTTGCTGGATCCTACCGGAGAAACGAGCTCGTTCGGATC
 M E A S A G L V A G S Y R R N E L V R I
 CGACATGAATCTGATGGCGGACCAAACCTTTGAAGAATATGAATGGCCAGATATGTCAG
 R H E S D G G T K P L K N M N G Q I C Q
 ATCTGTGGTATGATGTTGGACTCGCTGAAACTGGAGATGCTTTTGTGCGGTGTAATGAA
 I C G D D V G L A E T G D V F V A C N E
 TGTGCCTTCCCTGTGTGTCGGCCTTGTATGAGTACGAGAGGAAAGATGGAACCTCAGTGT
 C A F P V C R P C Y E Y E R K D G T Q C
 TGCCTCAATGCAAGACTAGATTACAGACACAGGGGAGTCTCTGTTGAAGGAGAT
 C P Q C K T R F R R H R G S P R V E G D
 GAAGATGAGGATGATGTTGATGATATCGAGAATGAGTTCAATTACGCCAGGGAGCTAAC
 E D E D D V D D I E N E F N Y A Q G A N
 AAGGCGAGACACCAACGCCATGGCGAAGAGTTTCTTCTTCTCTAGACATGAATCTCAA
 K A R H Q R H G E E F S S S S R H E S Q
 CCAATTCCTTCTCACCCATGGCCATACGGTTTCTGGAGAGATTGCGACGCCTGATACA
 P I P L L T H G H T V S G E I R T P D T
 CAATCTGTGCGAACTACATCAGGTCCTTTGGGTCCTTCTGACAGGAATGCTATTTTCATCT
 Q S V R T T S G P L G P S D R N A I S S
 CCATATATTGATCCACGGCAACCTGTCCCTGTAAGAATCGTGGACCCGTCAAAAGACTTG
 P Y I D P R Q P V P V R I V D P S K D L
 AACTCTTATGGGCTTGGTAATGTTGACTGGAAAGAAAGAGTTGAAGGCTGGAAGCTGAAG
 N S Y G L G N V D W K E R V E G W K L K
 CAGGAGAAAAATATGTTACAGATGACTGGTAAATACCATGAAGGAAAGGAGGAGAAATT
 Q E K N M L Q M T G K Y H E G K G G E I
 GAAGGGACTGGTTCCAATGGCGAAGAACTCCAATGGCTGATGATACACGCTTCTCCTATG
 E G T G S N G E E L Q M A D D T R L P M
 AGTCGTGTGGTGCCTATCCCATCTTCTCGCCTAACCCCTTATCGGGTGTGATTATTCTC
 S R V V P I P S S R L T P Y R V V I I L
 CGGCTTATCATCTTGTGTTCTTCTTGGCAATATCGTACAACCTCACCTGTGAAAAATGCA
 R L I I L C F F L Q Y R T T H P V K N A
 TATCCTTTGTGGTTGACCTCGGTTATCTGTGAGATCTGGTTGCAATTTCTTGGCTTCTT
 Y P L W L T S V I C E I W F A F S W L L
 GATCAGTTTTCCAAATGGTACCCCATTAACAGGGAGACTTATCTTGACCGTCTCGCTATA
 D Q F P K W Y P I N R E T Y L D R L A I
 AGATATGATCGAGACGGTGAACCATCACAGCTCGTTCCTGTTGATGTGTTTGTAGTACA
 R Y D R D G E P S Q L V P V D V F V S T
 GTGGACCCATTGAAAGAGCCTCCCTTGTACAGCAAACACAGTTCTCTCGATTCTTTCT
 V D P L K E P P L V T A N T V L S I L S
 GTGGACTACCCGGTAGATAAAGTAGCCTGTTATGTTTCAGATGATGGTTCAGCTATGCTT
 V D Y P V D K V A C Y V S D G S A M L
 ACCTTTGAATCCCTTCTGAAACCGCTGAGTTTGCAAAGAAATGGGTACCATTTTGCAAG
 T F E S L S E T A E F A K K W V P F C K
 AAATTCACATTGAACCTAGGGCCCTGAATCTATTTTGCCAGAAGATAGATTACTTG
 K F N I E P R A P E F Y F A Q K I D Y L
 AAGGACAAGATCCAACCGTCTTTTGTAAAGAGCGACGAGCTATGAAGAGAGAGTATGAA
 K D K I Q P S F V K E R R A M K R E Y E
 GAGTTTAAAGTGAGGATAAATGCTCTTGTGCCAAAGCACAGAAAATCCCTGAAGAAGGC
 E F K V R I N A L V A K A Q K I P E E G
 TGGACAATGCAGGATGGTACTCCCTGGCCTGGTAACAACACTAGAGATCATCCTGGAATG
 W T M Q D G T P W P G N N T R D H P G M
 ATACAGGTGTTCTTAGGCCATAGTGGGGTCTGGATACCGATGGAAATGAGCTGCCTAGA
 I Q V F L G H S G G L D T D G N E L P R
 CTCATCTATGTTTCTCGTGAAAAGCGGCCTGGATTCAACACCACAAAAGGCTGGAGCT
 L I Y V S R E K R P G F Q H H K K A G A
 ATGAATGCATTGATCCGTGTATCTGCTGTTCTTACCAATGGAGCATATCTTTGAACGTG
 M N A L I R V S A V L T N G A Y L L N V
 GATTGTGATCATTACTTTAATAACAGTAAGGCTATTAAGAAGCTATGTGTTTCATGATG
 D C H Y F N N S K A I K E A M C F M M
 GACCCGGCTATTGGAAAGAAGTGCTGCTATGTCCAGTTCCTCAACGTTTTGACGGTATT
 D P A I G K K C C Y V Q F P Q R F D G I
 GATTGACAGATCGATATGCCAACAGGAATATAGTCTTTTTCGATATTAACATGAAGGGG
 D L H D R Y A N R N I V F F D I N M K G
 TTGGATGGTATCCAGGGTCCAGTATATGTGGTACTGGTTGTTGTTTAAATAGGCAGGCT
 L D G I Q G P V Y V G T G C C F N R Q A
 CTATATGGGTATGATCCTGTTTACGGGAAGAAGATTTAGAACCAATATTATTGTCAAG
 L Y G D P V L T E E D L E P N I I V K
 AGCTGTTGCGGGTCAAGGAAGAAGGTAAGTAGCAAGAAGTATAACTACGAAAAGAGG
 S C C G S R K K G K S S K K Y N Y E K R
 AGAGGCATCAACAGAAGTGACTCCAATGCTCCACTTTTCAATATGGAGGACATCGATGAG
 R G I N R S D S N A P L F N M E D I D E

```

GGTTTGAAGGTTATGATGATGAGAGGTTCTATTCTAATGTCCCAGAGGAGTGTAGAGAAG
G F E G Y D D E R S I L M S Q R S V E K
CGTTTGGTCAGTCGCCGGTATTTATTGCGCAACCTTCATGGAACAAGGCCGATCCA
R F G Q S P V F I A A T F M E Q G G I P
CCAACAACCAATCCCCTACTCTTCTGAAGGAGGCTATTCATGTTATAAGCTGTGGTTAC
P T T N P A T T L L K E A I H V I S C G Y
GAAGACAAGACTGAATGGGCAAGAGATTGGTTGGATCTATGTTCCGTGACGGAAGAT
E D K T E W G K E I G W I Y G S V T E
ATTCTTACTGGTTCAAGATGCATGCCCGGGTGGATATCGATCTACTGCAATCCTCCA
I L T G F K M H A R G W I S I Y C N P P
CGCCCTGCGTTCAAGGGATCTGCACCAATCAATCTTCTGATCGTTTGAACCAAGTCTT
R P A F K G S A P I N L S D R L N
CGAIGGGCTTGGGATCTATCGAGATTCTTCTTAGCAGACATTGTCTATCTGGTATGGT
A L G S I E I L L S R H C P I W Y G
TACCATGGAAGGTTGAGACTTTGGAGAGGATCGCTTATATCAACACCAATCGTCTATCCT
Y H G R L R L L E R I A Y I N T I V Y P
ATTACATCCATCCCTTATTGCGTATTGTATTCTTCCCGCTTTTGTCTCATCACCGAC
I T S I P L I A Y C I L P A F C L I T D
AGATTCATCATACCGAGATAAGCAACTACGCGAGTATTTGGTTCATTCTACTCTTCATC
R F I I P E I S N Y A S I W F I L L F I
TCAATGCTGTGACTGGAATCCTGGAGCTGAGATGGAGCGGTGTGAGCATTGAGGATTGG
S I A V T G I L E L R W S G V S I E D W
TGGAGGAACGAGCAGTTCGGGTCATGGTGGCACATCCGCCCATCTTTTGTGTCTTC
W R N E Q F W V I G G T S A H L F A V F
CAAGTCTACTTAAGGTTCTTGCTGGTATCGACACCAACTTCACCGTTACATCTAAAGCC
Q G L L K V L A G I D T N F T V T S K A
ACAGACGAAGATGGGATTTTGCAGAAGTCTACATCTTCAATGGACAGCTCTTCTCATT
T D E D G D F A E L Y I F K W T A L L I
CCACCAACCACCGTCTACTTGTGAACCTCATAGGCATTGTGGCTGGTGTCTCTTATGCT
P P T T V L L V N L I G I V A G V S Y A
GTAAACAGTGGCTACCGATCGTGGGGTCCGCTTTTCGGGAAGCTCTTCTTCGCCTTATGG
V N S G Y Q S W G P L F G K L F F A L W
GTTATTGCCATCTCTACCCTTCTTGAAGGTCGTGGGAAGACAAAACCGAACCA
V I A H L Y P F L K G L L G R Q N R T P
ACCATGTCATTGTCTGCTGTTCTTCTCGCTCCATCTTCTCGTTGGTTCAGG
T I V I V W S V L L A S I F S L L W V R
ATCAATCCCTTGTGGACGCAATCCCAATGCCAACAACTCAATGGCAAAGGAGGTGTC
I N P F V D A N P N A N N F N G K G G V
TTTTAG
F *

```

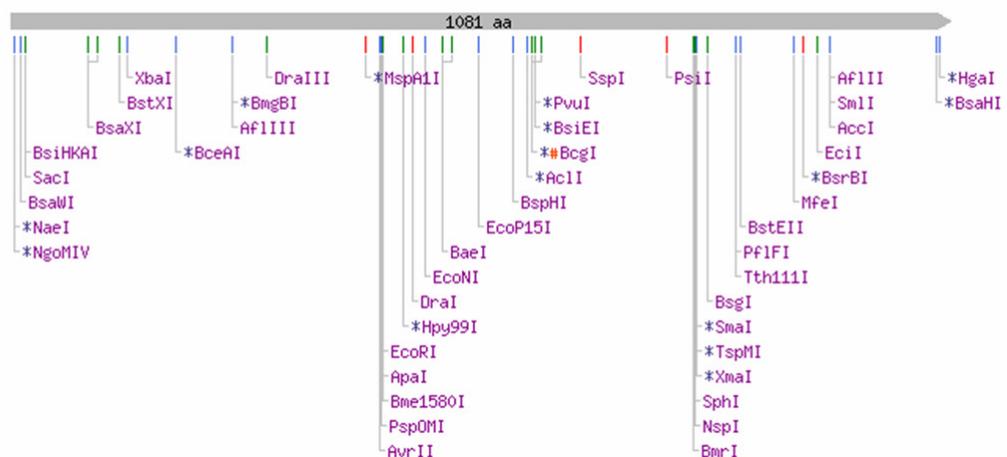
Markierte Domänen:

Rosa Sequenz: Transmembrandomänen

Rote Sequenz: cytosolischer *loop* von CESAI

Grün unterlegt ist das D-D-D-QxxRW-Motiv

Restriktionskarte von *CESA1*:



7.4.2 DNA- und Protein-Sequenz von Korrigan aus *A. thaliana* (At5g49720)

```

ATGTACGGAAGAGATCCATGGGGAGGTCCATTGGAGATAAACTGCAGATTCCGCCACC
M Y G R D P W G G P L E I N T A D S A T
GACGATGATCGTAGTCGGAATTTAAACGATTGGATCGTGC GGCTTTTCAGTCCACTA
D D D R S R N L N D L D R A A L S R P L
GATGAGACGCAGCAGAGTTGGTTACTTGGTCCAACGGAGCAGAAGAAGAAGTACGTC
D E T Q Q S W L L G P T E Q K K K K Y V
GATCTCGGTTGATTATCGTTAGCCGCAGATCTTCGTCTGGACTGTGGTACTCTGTT
D L G C I I V S R K I F V W T V G T L V
GCCGCCGCGTTACTGCGCGGATTACCTTACCTTGATCGTTAAA ACTGTGCCGCGTCATCAT
A A A L L A G F I T L I V K T V P R H H
CCTAAGATCCGCGCGGATAATTATACTATAGCTCTACACAAAGCTCTTAAGTTCTTC
P K T P P P D N Y T I A L H K A L K F F
AATGCTCAGAAATCTGGGAAATGGCCAAAGCATAATAACGTGTCATGGAGAGGTAATCT
N A Q K S G K L P K H N N V S W R G N S
GGGCTCAAGATGGGAAAGGTGAAACAGGAAGCTTCTATAAAGATTGGTGGGAGTTAT
G L Q D G K G E T G S F Y K D L V G G Y
TATGATGCTGGTATGCTATCAAGTCAATTTCCCATGGCTTATGCTATGACTATGTTG
Y D A G D A I K F N F P M A Y A M T M L
AGCTGGAGTGTATTGAATATAGTGCTAAATACGAAGCTGCTGCTGAGCTCACTCATGTT
S W S V I E Y S A K Y E A A G E L T H V
AAGGAGCTTATCAATGGGGAAGTACTTCTCAAGACTTTCAATAGTACTGCTGAT
K E L I K W G T D Y F L K T F N S T A D
TCCATGATGATCTTGTGTACAGGTTGGATCAGGGAATACTGATGATGGAATACAGAT
S I D D L V S Q V G S G N T D D G N T D
CCTAATGACCATTACTGTTGGATGCGACCTGAGGATATGGACTATAAAAGGCCCGTGACT
P N D H Y C W M R P E D M D Y K R P V T
ACTTGTAAAGTGTTCGGATCTCGCTGCAGAGATGGCAGCTGCTGCTGCGCTTACGCA
T C N G G C S D L A A E M A A A L A S A
TCTATTGATTAAGGATAACAAGGAATATCTAAAAGCTTGTCCATGGTGTAAAGGTG
S I V F K D N K E Y S K K L V H G A K V
GTGTATCAGTTTGGAAAGACGAGGAGAGGAGATATAGTGCAGGCCTGCGGAATCTAGC
V Y Q F G R T R R G R Y S A G T A E S S
AAGTCTATAAATCAAGTATGATTGGGATGAGTTCAATTTGGGGTGGTGTGCTGGATGAT
K F Y N S S M Y W D E F I W G G A W M Y
TATGCTACCGAAATGTAACGTATCTCAATCTAATCACCCACCTACTATGGCCAAGCAT
Y A T G N V T Y L N L I T Q P T M A K H
GCTGTGCCCTTCGGGGTGGCCCTTACTATGGTGTATTTAGCTGGGACAACAAGCTTGTCT
A G A F W G G P Y Y G V F S W D N K L A
GGTGTCAAGTTTGGACAAAATACCCGTTGAGGTTGTTTCTGAGTCTGATATCCATATGAA
G A Q L L L S R L R L F L S P G Y P Y E
GAAATCTAAGGACCTCCACAATCAGACCAGCATAGTCATGTGCTCATACTTGCCTATT
E I L R T F H N Q T S I V M C S Y L P I
TTCAACAAATTTACAGAACCAATGGAGTTTAATAGAGTTGAATCATGGAGCTCCACAG
F N K F N R T N G G L I E L N H G A P Q
CCGCTGCAATATTCTGTAATGCAGCTTCTTAGCGACTCTATACAGTGATTATCTGGAT
P L Q Y S V N A A F L A T L Y S D Y L D
GCTGTGATACTCCTGGATGTACTGTGGACCTAATTTCTATTTCGACAAGTGTGCTAGCT
A A D T P G W Y C G P N F Y S T S V L R
GACTTTGCTAGATCCAGATTGATTATATACTGGGTAAAAACCCTCGGAAAATGAGTTAT
D F A R S Q I D Y I L G K N P R K M S Y
GTCGTTGGTTTTGGCACAAAATACCCAAGACATGTGCATCACAGAGGACTTCGATACCC
V V G F G T K Y P R H V H H R G A S I P
AAGAACAAGTCAAGTATACTGCAAAGGAGGATGAAAATGGAGAGACAGCAAGAAACCA
K N K V K Y N C K G G W K W R D S K K P
AACCCAAACAGATTGAAGGAGCCATGGTTGCTGGTCTGACAAGCGCACGGGTACCGT
N P N T I E G A M V A G P D K R D G Y R
GATGTCGGTATGAACTACAACACTGAACCGACTCTTGCAGGCAATGCTGGTCTAGTC
D V R M N Y N Y T E P T L A G N A G L V
GCAGCTCTTGTGGCATTATCGGGTGAAGAAGAAGCCACCGGTAAGATAGACAAAAACACT
A A L V A L S G E E E A T G K I D K N T
ATTTTCTCAGCTGTTCTCTCTTGTTCCTACTCCACCACCTCCACCAGCACCATGGAAA
I F S A V P P L F P T P P P P P A P W K
CCTTGA
P *

```

Markierte Domäne:

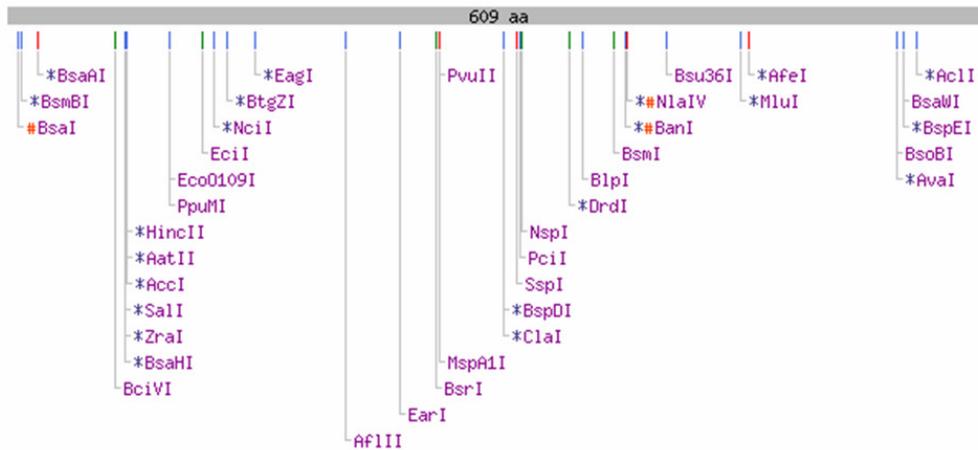
Rosa Sequenz: Transmembrandomäne


```

aagaaacgtttgccgagcttttgaaggaagctggcggtcgcggaactacaaagccaag
K K R L A E L L K E A G R S R N Y K A K
tcgctccagaatctgattgatccaatgcaagacctccgaagaagagtcttctgctaag
S L Q N L I D P N A R P P K K E S S A K
aatggcccagcctcggtttcaagtctga
K W P S L G F K F *

```

Restriktionskarte von *KinesinLC*:



7.5 Sequenzen der pACT-cDNA-Bank-Konstrukte

Im Folgenden sind die ermittelten Sequenzen der pACT-cDNA-Bank-Konstrukte aufgelistet. Sequenzen, die mehrfach identifiziert wurden, sind beispielhaft nur einmal dargestellt und zu jeder Sequenz ist die entsprechende BLAST-Analyse abgebildet. Unterstreichungen kennzeichnen Teile der Vektorsequenz.

7.5.1 *kinesin light chain-related*-Protein

Sequenzierung der pACT-cDNA:

```

TCTGAATATGAATACGGCTAGTAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCACTGTCAC
CTGGTTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACTACAGGGATGTTTAATA
CCACTACAATGGATGATGATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAACC
CAAAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGATTTACCGAAATTGCTTGAGGATAAGC
CAGGACAGCAGAGCGCCATTGCAGGGTTAGAGGCACGGATGGGAGTTATGTATTACACAG
TGGGGAGGTACGAGGACGCAAGAAACGCGTTTGGAGAGCGCTGTGACAAAG

```

>AT4G10840.2 *kinesin light chain-related*

```

Length = 2248
Score = 258 bits (130), Expect = 3e-68
Identities = 130/130 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 221 gaaattgcttgaggataagccaggacagcagagcgccattgcagggtttagaggcacggat 280
          |||
Sbjct: 1355 gaaattgcttgaggataagccaggacagcagagcgccattgcagggtttagaggcacggat 1414

Query: 281 gggagttatgtattacacagtggggaggtacgaggacgcaagaaacgcgcttgagagcgc 340
          |||
Sbjct: 1415 gggagttatgtattacacagtggggaggtacgaggacgcaagaaacgcgcttgagagcgc 1474

Query: 341 tgtgacaaag 350
          |||
Sbjct: 1475 tgtgacaaag 1484

```

7.5.2 *general regulation factor 3-Protein (GRF3)*

Sequenzierung der pACT-cDNA:

```
CATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCCTGTC
ACCTGGTTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACTACAGGGATGTTTAA
TACCCTACAATGGATGATGATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAA
CCCAAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGATTTACCGTATCTTGCTGAGTTTAA
GGCTGGTGCCTGAAAGGAAAGAGCTGCTGAAAGCACTTTGGTTGCTTACAAGTCTGCTTC
CGACATTGCCACTGCTGAGTTAGCTCCTACTACCCGATAAG
```

```
>AT5G38480.2 RCI1, GRF3 (GENERAL REGULATORY FACTOR 3)
      protein phosphorylated amino acid binding |
      Length = 1138
      Score = 238 bits (120), Expect = 3e-62
      Identities = 120/120 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 223 gtatcttgctgagtttaaggctggtgctgaaaggaagaagctgctgaaagcactttggt 282
      |||
Sbjct: 538 gtatcttgctgagtttaaggctggtgctgaaaggaagaagctgctgaaagcactttggt 597

Query: 283 tgcttacaagtctgcttccgacattgccactgctgagttagctcctactcaccgataag 342
      |||
Sbjct: 598 tgcttacaagtctgcttccgacattgccactgctgagttagctcctactcaccgataag 657
```

7.5.3 *Bcl-2-associated athanogene 3-Protein (BAG3)*

Sequenzierung der pACT-cDNA:

```
TCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCCTGTC
CACCTGGTTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACTACAGGGATGTTTAA
ATACCCTACAATGGATGATGATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAA
ACCAAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGATTTACCCGCGGGACTAGTGGTA
ATGAGTGGGAGTCTCGACCTGGAGGAATGGTTGTTCAACGTCGGACAGATCAGAACTCCG
ATGTGCCACGTGCTTTTCGTGTTCCGGTTAAATACGGGTCGG
```

```
>AT5G07220.1 ATBAG3 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 3)
      protein binding
      Length = 1448
      Score = 236 bits (119), Expect = 1e-61
      Identities = 119/119 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 224 cggcgggactagtggaatgagtgaggctctcgacctggaggaatgggtgttcaacgtcg 283
      |||
Sbjct: 289 cggcgggactagtggaatgagtgaggctctcgacctggaggaatgggtgttcaacgtcg 348

Query: 284 gacagatcagaactccgatgtgccacgtgtctttcgtgttcgggttaaatcgggtcgg 342
      |||
Sbjct: 349 gacagatcagaactccgatgtgccacgtgtctttcgtgttcgggttaaatcgggtcgg 407
```

7.5.4 *Bcl-2-associated athanogene 1-Protein (BAG1)*

Sequenzierung der pACT-cDNA:

```
TTCTGAATATGAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCCTGTC
CCTGGTTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACTACAGGGATGTTTAA
ACCACTACAATGGATGATGATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAA
CCAAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGATTTACCAAATCTCCGACGGCGGGT
ATGACTAATGGCGGTAGAGTTCCGGCGGGGTTGGTGGTGGCGGGCAGGGAGTCAGGC
GGTCGTGATTGGAATTAGACCTGGTGGTATGTTGGTTCAGAAACGTAA
```

```
>AT5G52060.1 ATBAG1 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 1)
      protein binding
      Length = 1767
      Score = 258 bits (130), Expect = 3e-68
      Identities = 130/130 (100%)
      Strand = Plus / Plus
```

```

Query: 221 caaatcttccgacggcggtatgactaatggcggtagaggttccggcgcggtggtggtg 280
          |||
Sbjct: 532 caaatcttccgacggcggtatgactaatggcggtagaggttccggcgcggtggtggtg 591

Query: 281 gcggcggcaggagtcaggcggtcgtgatttgaaaattagacctggtggtatggtggttc 340
          |||
Sbjct: 592 gcggcggcaggagtcaggcggtcgtgatttgaaaattagacctggtggtatggtggttc 651

Query: 341 agaaacgtaa 350
          |||
Sbjct: 652 agaaacgtaa 661

```

7.5.5 dark inducible 10-Protein (DIN10) oder Raffinosesynthase

Sequenzierung der pACT-cDNA:

```

CTGAATATGAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCCTGTCACC
TGGTTGGACGGACCAAACTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACTACAGGGATGTTTAAATAC
CACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCCAAAACCC
AAAAAAGAGATCTGGAATTCGGATCCTCGAGATTACCATCTTCTTCCATTCAAATC
TCACATTCCTCTTCCACAACAACAGCTTCGTATTTCGCTCATCTTCTTCGCTTCTGATCT
TGGAAATCGCAGGCATTGTTTCGCTACTCGAGATTCAATTTGGTTCAT

```

```

>AT5G20250.3 DIN10 (DARK INDUCIBLE 10)
    hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
    Length = 2833
    Score = 155 bits (78), Expect = 3e-37
    Identities = 78/78 (100%)
    Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 219 catcttctcttccattcaaatctcacattccctcttcacaacaacagcttcgtattcgct 278
          |||
Sbjct: 141 catcttctcttccattcaaatctcacattccctcttcacaacaacagcttcgtattcgct 200

Query: 279 catcttctctgctttctg 296
          |||
Sbjct: 201 catcttctctgctttctg 218

Query: 297 atcttggaaatcgaggcattggtcgtctactcgaggatttcaattttggtcat 350
          |||
Sbjct: 312 atcttggaaatcgaggcattggtcgtctactcgaggatttcaattttggtcat 365

```

7.6 Sequenzierungen der Glykosylierungsmutanten *cglI-T*, *gnTII*, *fucTc* (genomische DNA) und C6-cDNA

Die T-DNA-Insertionsmutanten wurden mit dem jeweiligen auf der T-DNA bindenden Primer (LBb1, RBa1 und FLAG-TAG) sequenziert, um den genauen Insertionsort der T-DNA zu ermitteln.

Von der EMS-Mutante C6 wurde ein cDNA-Fragment sequenziert, um den *frame shift*, der durch das alternative Spleißen hervorgerufen würde, zu bestätigen.

7.6.1 T-DNA-Insertion in *cglI-T*

Sequenzierung mit LBb1-Primer:

```

GGCAGGCGGTGAAGGCAATCAGCTGTGCCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAACCACCC
CAGTACATTAATAACGTCGCCAATGTGTTATTAAGTTTCCACAGAGTATACAAATGTTT
TATTACTGTTTCTCATTCTTTCTGGTCCAAACATGTGTTAGAACCATTAAGGCTGCTTC
ATCATGGAATGATAATGGACAGAAGCAGTTTGTGCATGATCCCTGTAAGATTCTTCTTCT
TCTTCTTTACCTTGCTTCTCTCTTGCCTGTTCTTTCAATACCTCATTATGTCTAGCTCA
TGCGAGCTAAATAATCTGCAGATGCGCTATACCGATCAGATTTTTTTC

```

```

TDNA_GnTI_LBb1 -----
genDNA          AGTATTGCTTAAGAGAGGTTATCTTGTCTCTTTAACAGATGATATGGAAA 1700

```

```

TDNA_GnTI_LBb1 ----GGCAGGCGGTGAAGGCAATC---AGCTGTGCCCCGTCTCACTGGT 43
genDNA          TTGCTCCAGACTTCTTTGATTACTTTGAGGCTGCAGCTAGTCTCATGGAT 1750
                *** * * * * **** ** ***** * *

```

```

TDNA_GnTI_LBb1      GAAAAGAAAAACCACCCAGTACATTA AAAACGTC CGCAATGTGTTATTA 93
genDNA              AGGGATAAGTATGTTACCTACTGAAGCTAGACTCTTATAGT----A-TA 1794
                    * * * * *
TDNA_GnTI_LBb1      AGTTTCCACAGAGTATACAAATGTTTTTATTACTGTTTCTCATTCTTTTC 143
genDNA              AGTTTCCACAGAGTATACAAATGTTTTTATTACTGTTTCTCATTCTTTTC 1844
                    *****
TDNA_GnTI_LBb1      TGGTCCAAACATGTGTTAGAACCATATGGCTGCTTCATCATGGAATGAT 193
genDNA              TGGTCCAAACATGTGTTAGAACCATATGGCTGCTTCATCATGGAATGAT 1894
                    *****
TDNA_GnTI_LBb1      AATGGACAGAAGCAGTTTGTGCATGATCCCTGTAAGATTCTTCTTCTTCT 243
genDNA              AATGGACAGAAGCAGTTTGTGCATGATCCCTGTAAGATTCTTCTTCTTCT 1944
                    *****
TDNA_GnTI_LBb1      TCTT--TACCTTGCCTCCTCCTTGCCTGTTCTTTCAATACCTCATTAT 290
genDNA              TCTTCTTTACCTTGCCTCCTCCTTGCCTGTTCTTTCAATACCTCATTAT 1994
                    *****
TDNA_GnTI_LBb1      GTCTAGCTCATGCGAGCTAAAATAATCTGCAGATGCGCTATACCGATCAG 340
genDNA              GTCTAGCTCATGCGAGCTAAAATAATCTGCAGATGCGCTATACCGATCAG 2044
                    *****
TDNA_GnTI_LBb1      ATTTTTTTC----- 349
genDNA              ATTTTTTTCCTGGCCTGGGTGGATGCTCAAGAGATCGACTTGGGATGAG 2094
                    *****

```

Sequenzierung mit RBa1-Primer:

```

AATTACTAACCATGGTCTTTTCCAACGACATATTTTCTGACAGGATGGATCTGATCAAGC
TGTC AAGAGCAAGTCATTGAGCTATAATCAATTAACATATATGCAGGTAATTTAATCTAG
CGTGATTTTTCTCCTCACTGTTCAAGTAGATAAATGAGGATGAAGGCTCGTTTTCCCTT
TTCAGCACTGGATTTTGAACCAGTGGTCACTGAAAGGCCGTCGCAACTGACTGCGTACT
ACAAGATTGCACGTAAGGACTGGTTTCTCTTTCTCTGCGTCCCTCCAGCTCCATTACTG
AAACACTTTTTAATACAGGTCACATAAAGTGGGCACTGGACCAGTTGTTTTACAAACACA
AATTTAGTCGAGTGATTATACTAGAAAGGTGGCGCTTTTTAACCTTTACACTCATCGTAC
CTTGCTGTGTATTTTAAAGAGGGCTGTCTTTACCTTGTGGAGTATTGCTTAAGAGAG
GTTATCTTGTCTCTTTAACAGATGATATGGAATGCTCCAGACTCTTTGATTACTTTG
AGGCTGCAGCTAGTCTCATGGATAGGGATAAGTATGTTACCTACTGAAGCTAGACTCTTA
TAGTACGCTGATAGTTTAAACTGTCCGGTGCCCACTATCAGTGTTATCAGTGTCCGGTGC
CCTGAATGACAACCTAATATAAAGTGTCCGGTCTGTGCTTCAAACTGATAGTTTA
AACTGAAGCGGGAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACGTTATG
ACCCCGCGGATGACGCGGGAAGCCGTTTTACGTTTGGAACTGACAGAACCAGCAACGT
TGAAGGAGCCATCAGCCGGGTTTTCTGGAGTTTAAAGCTAAGCACATACGTGAGAA
ACCATTATTGCGGTCAAAA

```

```

Sequenz_GnTI_RBa1  -----AATTACTAACCAT 13
genDNA              ACTTAATTTGCAGGTTGGTCTCTTAGACTGTTTTATATTCAACGAATTACTAACCAT 1200
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  GGTCTTTTCCAACGACATATTTTCTGACAGGATGGATCTGATCAAGCTGTCAAGAGCAAG 73
genDNA              GGTCTTTTCCAACGACATATTTTCTGACAGGATGGATCTGATCAAGCTGTCAAGAGCAAG 1260
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  TCATTGAGCTATAATCAATTAACATATATGCAGGTAATTTAATCTAGCGTGATTTTTTCTC 133
genDNA              TCATTGAGCTATAATCAATTAACATATATGCAGGTAATTTAATCTAGCGTGATTTTTTCTC 1320
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  CTCACTGTTCAAGTAGATAAATGAGGATGAAGGCTCGTTTTCCCTTTTTCAGCACTTGGGA 193
genDNA              CTCACTGTTCAAGTAGATAAATGAGGATGAAGGCTCGTTTTCCCTTTTTCAGCACTTGGGA 1380
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  TTTTGAACCAGTGGTCACTGAAAGGCCGTCGCAACTGACTGCGTACTACAAGATTGCACG 253
genDNA              TTTTGAACCAGTGGTCACTGAAAGGCCGTCGCAACTGACTGCGTACTACAAGATTGCACG 1440
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  TAAGGACTGGTTTCTCTTTTCTCTGCGTCCCTCCAGCTCCATTACTGAAACACTTTTTTAA 313
genDNA              TAAGGACTGGTTTCTCTTTTCTCTGCGTCCCTCCAGCTCCATTACTGAAACACTTTTTTAA 1500
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  TACAGGTCACATAAAGTGGGCACTGGACCAGTTGTTTTACAAACACAAAATTTAGTCGAGT 373
genDNA              TACAGGTCACATAAAGTGGGCACTGGACCAGTTGTTTTACAAACACAAAATTTAGTCGAGT 1560
                    *****
Sequenz_GnTI_RBa1  GATTATACTAGAAGGTGGCGCTTTTTAACCTTTTACACTCATCGTACCTTGTGTTGTAT 433
genDNA              GATTATACTAGAAGGTGGCGCTTTTTAACCTTTTACACTCATCGTACCTTGTGTTGTAT 1620
                    *****

```

Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	TGTTTAAGAGGGGCTGTCTTTACCTTGTGGAGTATTGCTTAAGAGAGGTTATCTTGTCTC 493 TGTTTAAGAGGGGCTGTCTTTACCTTGTGGAGTATTGCTTAAGAGAGGTTATCTTGTCTC 1680 *****
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	TTTAACAGATGATATGGAATTTGCTCCAGACTTCTTTGATTACTTTGAGGCTGCAGCTAG 553 TTTAACAGATGATATGGAATTTGCTCCAGACTTCTTTGATTACTTTGAGGCTGCAGCTAG 1740 *****
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	TCTCATGGATAGGGATAAGTATGTTACCTACTGAAGCTAGACTCTTATAGTACGCTGATA 613 TCTCATGGATAGGGATAAGTATGTTACCTACTGAAGCTAGACTCTTATAGTATAA-GTTT 1799 ***** * *
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	GTTTAAACTGTCCGGTGCCACTATCAGTGTTA-TCAGTGTCGGTGCCCTGAA---TG 668 CCACAGAGTATACAAATGTTTTATTACTGTTTCTCATTCTTTCTGGTCCAAACATGTG 1859 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	ACAACTTAATATAAACTGTCCGGTCTGTCA--GTTTCAAACACTGATAGTTTAAACTGA 726 TTAGAACCATTATGGCTGCTTCATCATGGAATGATAATGGACAGAAGCAGTTTGTGCATG 1919 * ** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	AGGCGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACGTTATGACCCCC 786 ATCCCTGTAAGATTCTTCTTCTTCTTCTTCTTTACCTTGTCTTCTCTC-TTGCCGTGTTCT 1978 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA	GCCGATGACGCGGACAAGCCGTTT-TACGTTTGGAACTGA---CAGAACCGCAACGTT 841 TTCAATACCTCATTATGTCTAGCTCATGCGAGCTAAAATAATCTGCAGATGCGCTATACC 2038 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA_GnII	GAAGGAGCCACTCAGCCGGGTTTCTGGAGTTTAAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAA 901 GATCAGATTTTTTTCCTGGCCTTGGGTGGATGCTCAAGAGATCGACTTG-GGATGAGTTA 2097 ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Sequenz_GnII_RBa1 genDNA_GnII	CCATTATTGCGCGTCAAAA----- 920 TCACCAAAGTG-GCCAAAGGCATATCCTTATATGCTTTTTTTTTCTTTCAATCTCGATGAC 2156 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

7.6.2 Sequenzierung der C6-cDNA

Sequenzierung des C6-PCR-Fragment (cDNA) ohne Intron 14 mit dem Primer Ex16/17_R:

```

AGTCTCATGGATAGGGATAAAACCATTATGGCTGCTTCATCATGGAATGATAATGGACAG
AAGCAGTTTTGTGCATGATCCCTATGCGCTATACCGATCAGATTTTTTTCCTGGCCTGGG
TGGATGCTCAAGAGATCGACTTGGGATGAGTTATACCAAAGTGGCCAAAGGCTTACTGG
GATGATTGGCTGAGACTAAAGGAAAACCATAAAGGCCGCCAATTCATTTCGACCGGAAGTC
TGTAGAACATACAATTTGGTGAACATGGICTAGTTTGGGACAGTTTTTCAGTCAGTATC
TGGAACTATAAAGCTAAACGATGTGACGGTTGACTGGAAGCAAAGGAC

```

cg11-mRNA Sequenz	TACTTTGAGGCTGCAGCTAGTCTCATGGATAGGGATAAAACCATTATGGCTGCTTCATCA 720 -----AGTCTCATGGATAGGGATAAAACCATTATGGCTGCTTCATCA 42 *****
cg11-mRNA Sequenz	TGGAATGATAATGGACAGAAGCAGTTTGTGCATGATCCCTATGCGCTATACCGATCAGAT 780 TGGAATGATAATGGACAGAAGCAGTTTGTGCATGATCCCTATGCGCTATACCGATCAGAT 102 *****
cg11-mRNA Sequenz	TTTTTTCCTGGCCTTGGGTGGATGCTCAAGAGATCGACTTGGGATGAGTTATACCAAAG 840 TTTTTTCCTGGCCTTGGGTGGATGCTCAAGAGATCGACTTGGGATGAGTTATACCAAAG 162 *****
cg11-mRNA Sequenz	TGGCCAAAGGCTTACTGGGATGATTGGCTGAGACTAAAGGAAAACCATAAAGGCCGCCAA 900 TGGCCAAAGGCTTACTGGGATGATTGGCTGAGACTAAAGGAAAACCATAAAGGCCGCCAA 222 *****
cg11-mRNA Sequenz	TTCATTTCGACCGGAAGTCTGTAGAACATACAATTTTGGTGAACATGGGCTAGTTTGGGA 960 TTCATTTCGACCGGAAGTCTGTAGAACATACAATTTTGGTGAACATGG-ICTAGTTTGGGA 281 *****
cg11-mRNA Sequenz	CAGTTTTTCAGTCAGTATCTGGAACCTATAAAGCTAAACGATGTGACGGTTGACTGGAAA 1020 CAGTTTTTCAGTCAGTATCTGGAACCTATAAAGCTAAACGATGTGACGGTTGACTGGAAA 341 ***** * * *
cg11-mRNA Sequenz	GCAAAGGACCTGGGATACCTGACAGAGGGAAACTATACCAAGTACTTTTCTGGCTTAGTG 1080 GCAAAGGAC----- 350 *****

Der *frame shift* durch das Verschieben der Spleißstelle um +1 ist grau unterlegt.

Translatierte C6-Sequenz (die durch den *frame shift* hervorgerufenen falschen Aminosäuren sind unterstrichen):

```
SLMDRDKTIM AASSWVNDNGQ KQFVHDPYAL YRSDFPGLG WMLKRSTWDE LSPKWPKEYW
DDWLRLENH KGRQFIRPEV CRTYNFGEHG LVWDSFSVSI WNL
```

Der Vergleich der Sequenzen (C6 und CGL1) ist im Folgenden dargestellt.

```
C6          -----SLMDRDKTIMAASS 14
CGL1       AYYKIARHYKWALDQLFYKHKFSRVIILEDDMEIAPDFDYFEAAASLMDRDKTIMAASS 240
          *****

C6          WNDNGQKQFVHDPYALYRSDFPGLGWMLKRSTWDELSPKWPKEYWDDWLRLENHKHGRQ 74
CGL1       WNDNGQKQFVHDPYALYRSDFPGLGWMLKRSTWDELSPKWPKEYWDDWLRLENHKHGRQ 300
          *****

C6          FIRPEVCRTYNFGHEG-----LVWDS-----FS--- 97
CGL1       FIRPEVCRTYNFGHEGSSLGQFFSQYLEPIKLNVDVTDWKAKDLGYLTEGNYTKYFSGLV 360
          *****                               : *.: **

C6          -----VSIWNL-S-TM-RLTGQR----- 113
CGL1       RQARPIQGSIDLVLKAQNIKDDVRIYKQDQVEFERIAGEFGIFEWKGVPRTAYKGVVVF 420
          * * . : *:: .
```

7.6.3 T-DNA-Insertion in *gntII*

Sequenzierung mit FLAG-TAG-Primer:

```
TGTACTCAAGCTTATCGATACCGTCGGCTATTGGTAATAGGACACTGGGATTCGTCTTGG
ACAACTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCAACTGGAAACGGGCCGACTCCAG
GGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGGCCAGACCCTTGAAAATCCGATTGAGTA
CAATCGATTGCCCTCATTTTTATGTTGGGTATTGCCCTCAATCGATTATCAGAAAGCAA
GAGAGTTTTGTTCTTTGATGATTACAACCTGGGATATAACGATGTGGCAACGGTTTTCC
CGTCGTTTGGTTCCCGGTGTACACATTGCGAGGGCCTAGGACTAGTGCGG
```

```
Sequenz          -----TGTACTCAAGCTTATCGATACCGTCGGCTATTGGTAATAGGACACTGGGATTCG 54
genDNA_GnTII     TTGGAAGAGACTAAAGGACATGAGGGCATATCCTTTTCATTGAAGAAGATCATTTTCTG 720
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequenz          TCTTGGACAACCTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCAA--CTGGAAACGGGCCG 112
genDNA_GnTII     TTTCTTAATGCCTATCGTAACATACAGACTCTTACGAGGCTGAAACCCGCAAAGTGTCT 780
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequenz          GACTCCAGGGC-GTGTGCCAGGTGCCACGGA--ATAGTTTTGGCCAGACC--CTTGAA 166
genDNA_GnTII     GACTGTTTTGCTGCTAATTTAGCACCGTCTGATGTGAAGTCAAGAGGAGAAGGGCTTGAA 840
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequenz          AATCCGATT-CAGT-ACAATCGATTGCCCT--CATTTTTATGTTGGGTATTGCCCTCAA 221
genDNA_GnTII     AGTTTGGTTCAGAGAGAATGGGAAATGTTGGGTATTCTTTAATAGAAGTGTGTGGGAG 900
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequenz          TCGATTATCAGAAAGCAAGAGAGTTTTGTTTCTTTGATGATTACAACCTGGGATATAACG 281
genDNA_GnTII     AATATTTATCAGAAAGCAAGAGAGTTTTGTTTCTTTGATGATTACAACCTGGGATATAACG 960
          *****

Sequenz          ATGTGGCAACGGTTTTCCCGTCGTTTGGTTCCCGGTGTACACATTGCGAGGGCCTAGG 341
genDNA_GnTII     ATGTGGCAACGGTTTTCCCGTCGTTTGGTTCCCGGTGTACACATTGCGAGGGCCTAGG 1020
          *****

Sequenz          ACTAGTGCGG----- 351
genDNA_GnTII     ACTAGTGCGGTACACTTTGGAAAATGTGGGTGTCATCAAGGTAGAGGAGATGAGGGTGAT 1080
          *****
```

Die genaue Insertionsstelle der T-DNA ist **grau** hinterlegt.

7.6.4 T-DNA-Insertion in *fucTc*

Sequenzierung mit FLAG-TAG-Primer:

```
TGTACTCAGCTTATCGATACCGTCGGCTATTGGTAATAGGACACTGGGATTCGTCTTGG
CAACTTTCCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCAACTGGAAACGGGCCGACTCCAGG
GCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGGCCAGACCCTTGAAAATCCGATTGAGTAC
AATCGATTGCCCTCATTTTTACGTTGGCATATATCCTGTGCACCCGTGCGAAGAGATTAG
CAGAAGAGTGGGAAGAACCCGGAGTTTGTATGAGCCACATGTGGTTTCATTTAGTGTGG
GTTTATGTAAATGTGATCCTATGATCTGTTTCTGTTACATATGATAACTTT
```

```

Sequenz -----
genDNA_FucTC TCCACTGCGCTATGTCACACTACAAATTCGTCCTTGCAATCGAAAACACAGCTGTTGAGT 1500

Sequenz ----TGTACTC----AGCTTATCGATACCGTCGGCTATTG----GTAATAGGACACTGGG 48
genDNA_FucTC CATACGTGACCGAGAAGCTTTTCTATGCGCTCGACTCTGGTTCTGTTCCAATCTATTTTG 1560
          ** * ***** ** * * ** * * * * ** * * * *

Sequenz ATTCGTCT---TGGACAACCTTT---CCTTCTCATCTAAGCGTAGACAACCCTCAACTGG 101
genDNA_FucTC GGGCCTCTAACGTGCAAGACTTTTCCCTCCGCATTCGGTGATCGATGGTAGCAAATTCG 1620
          * *** ** * ***** ** * * * * * * * * ** * * *

Sequenz AAACGG-GCCGGACTCCAGGGCGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGTTTTGG-----C 153
genDNA_FucTC GCTCGATGACAGGAGTTGGCTGCGTACGTGAAGCGCTCGGTGATGATCCTGTGGCTTACT 1680
          ** ** *** * ***** * * * * * * * * * * ** * *

Sequenz CAGA----CCCTTGAAAATCCGATTAGTACAATCGATTGCCCTC-----ATTTTTACGT 204
genDNA_FucTC CAGAGTACCATGCGTGGAGGCGGTGTGGACTAATGGGGAACACGGGAAAACCCGTGCGG 1740
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequenz TGGC-----ATATATC-CTGTG-CACCCGTGCGAAGAGATTAGCAGAAGAGGTGGGAAGA 257
genDNA_FucTC TGAGTCTCGATACATTGCCATGTCGGTGTGCGAAGAGATTAGCAGAAGAGGTGGGAAGA 1800
          ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sequenz ACGCCGGAGTTTGATGAGCCACATGTGGTTTCATTTAGTGTGGGTTTATGTAAATGTGAT 317
genDNA_FucTC ACGCCGGAGTTTGATGAGCCACATGTGGTTTCATTTAGTGTGGGTTTATGTAAATGTGAT 1860
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

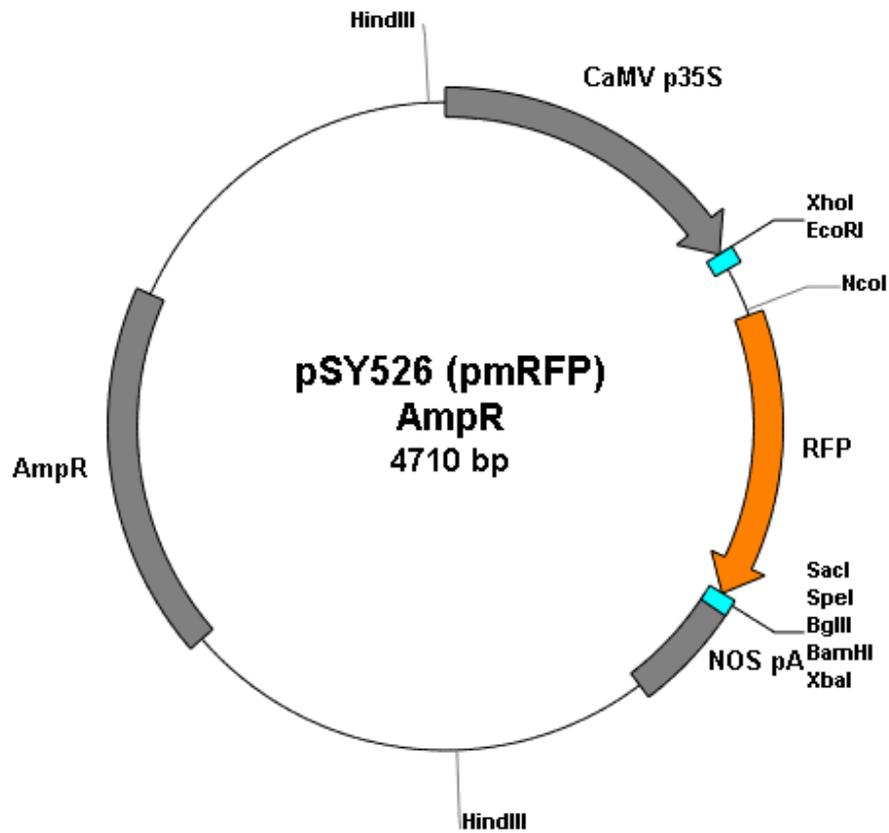
Sequenz CCTATGATCTGTTTCTGTTACATATGATAACTTT----- 351
genDNA_FucTC CCTATGATCTGTTTCTGTTACATATGATAACTTTTTTGTCTATATAGTCTCAGATCATC 1920
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

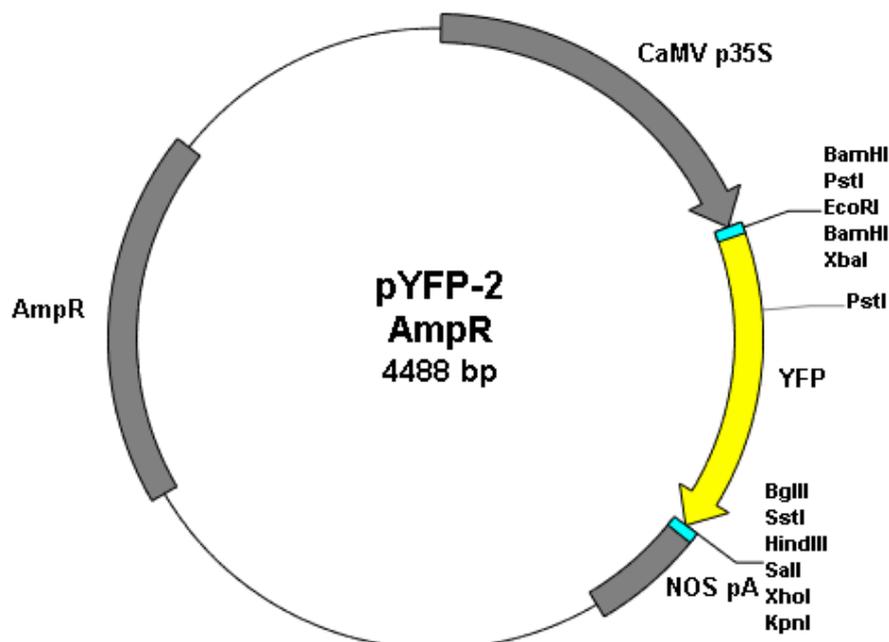
Die genaue Insertionsstelle der T-DNA ist **grau** hinterlegt.

7.7 Vektorkarten

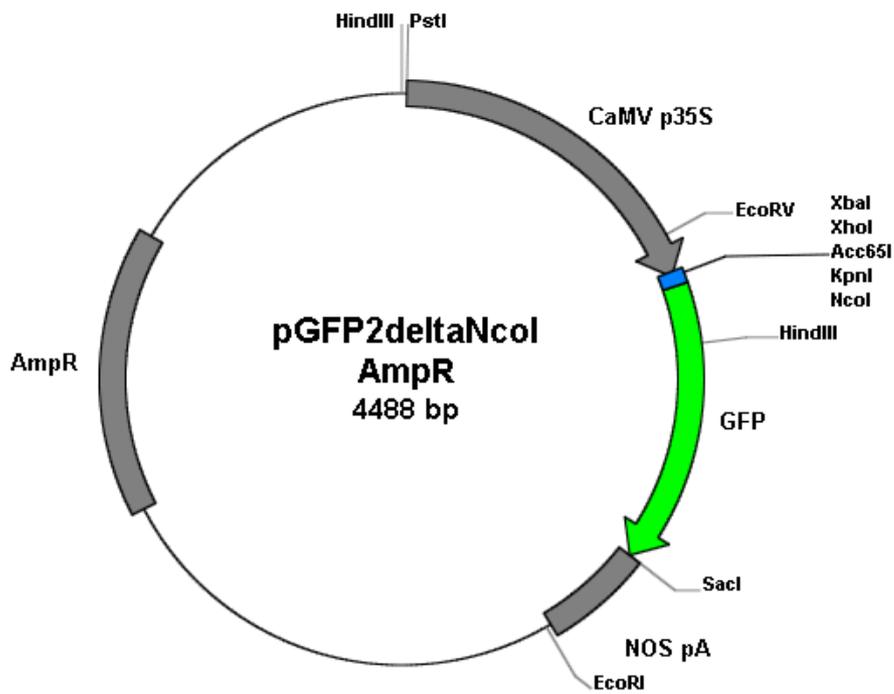
7.7.1 pOFP Δ NcoI (ursprünglicher Name pSY526)



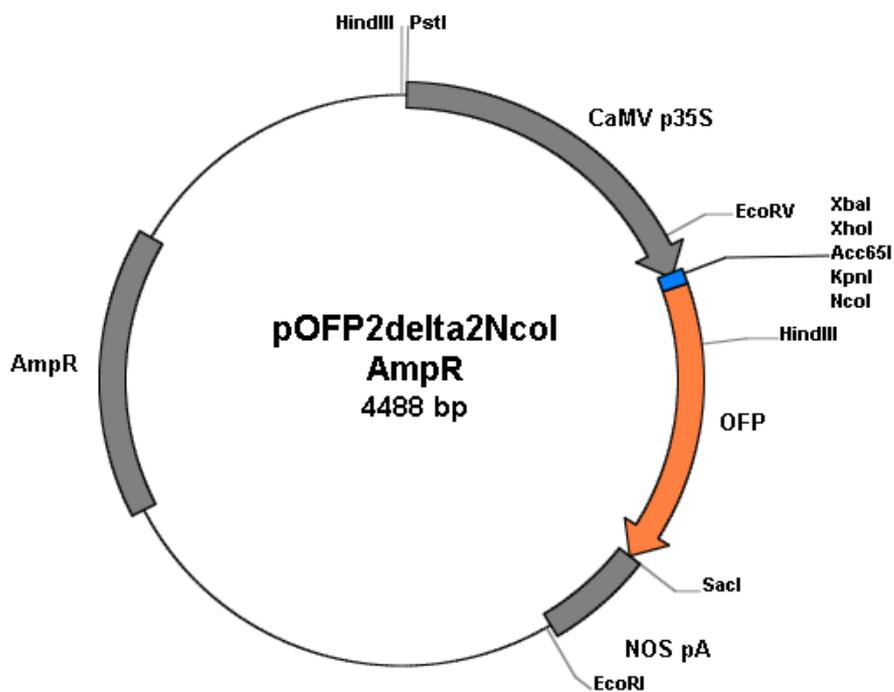
7.7.2 pYFP2



7.7.3 pGFP2 Δ NcoI



7.7.4 pOFP2 $\Delta\Delta$ NcoI



Eidesstattliche Versicherung

nach § 6 Abs 3 f

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe, nur unter Verwendung der vollständig in der Dissertation angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Desweiteren versichere ich, dass ich die Dissertation weder an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster noch anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Münster, den 24. März 2008

.....

Julia Frank

Lebenslauf

Name	Julia Gwendolin Frank	
geboren am	18. März 1976 in Pinneberg	
Familienstand	ledig	
Eltern	Ruth E. Frank, geb. Steinhart und Dr. Heinz E. Frank	
Tätigkeiten	ab Mai 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, AG Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik
	August 2002 – Juli 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Westfälische Wilhelm-Universität Münster, AG Molekulare Pflanzenphysiologie
	Mai 2002 – Juli 2002	Hilfswissenschaftlerin, AG Pflanzenphysiologie, Universität Osnabrück
Studium	August 2002 – Juli 2007	Promotionsstudiengang Biologie an der Westfälische Wilhelm-Universität Münster
	18. März 2002	Diplom im Fach Biologie an der Universität Osnabrück
	ab WS 95/96	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Osnabrück
Schulbesuche	17. Mai 1995	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Bad Iburg
	1988 – 1995	Gymnasium Bad Iburg
	1986 – 1988	Haupt- und Orientierungsstufe Bad Iburg
	1983 – 1986	Kath. Grundschule Bad Iburg
	1982 – 1983	Volksschule Thalfingen
Münster, den	24. März 2008	Julia Frank

DANKE DANKE DANKE

Frau Prof. Dr. Antje von Schaewen danke ich für die
freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe,
für die Betreuung und das Vertrauen, das sie in mich gesetzt hat.

Frau Prof. Dr. Bettina Tudzynski danke ich für die
Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Mitstreitern:

Tanja Meyer, Stephan Rips und Heidi Kaulfürst-Soboll danke ich für die
Unterstützung und Begleitung auf dem steinigen Weg der Forschung.
Tanja und Stephan - ohne Euch hätte ich es nicht geschafft!

Danke an Kerstin Fischer für die
unschätzbare Hilfe in allen Laborfragen und noch mehr.

Anke Scholz danke ich für ihre Freundschaft.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Liebe ♥ und ihr Vertrauen danken.
Sie haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin.
Ich weiß, dass ihr stolz auf mich seid.