

**Die Rolle der vier  
UDP-Glucose Dehydrogenasen  
in *Arabidopsis thaliana*  
bei der Synthese  
von Zellwandzuckern**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Michaela Katharina Karla Klinghammer  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2009

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter: Prof. Dr. Raimund Tenhaken

Prof. Dr. Gerhard Sandmann

Datum der Disputation: .....

*Für Bernd und Marie*

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Abteilung Pflanzliche Molekularbiologie und Genomforschung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Raimund Tenhaken durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Klinghammer M. & Tenhaken R. (2007)** Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in *Arabidopsis*, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 58 (13): 3609-3621

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
2.1	Die pflanzliche Zellwand	11
2.2	Die Bestandteile der pflanzlichen Primärzellwand	13
2.3	Die Primärzellwand – Die Synthese der Zucker	16
2.4	Die UDP-Glucose Dehydrogenase	18
2.5	Zielsetzung der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Übersicht über verwendete Plasmide, Bakterien-Stämme und transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	23
2.2	Chemikalien	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.4	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	29
2.5	Bestimmung der enzymatischen Parameter	32
2.6	Pflanzenanzucht	34
2.7	Herstellung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	34
2.8	Gus-Reportergen-Analyse	36
2.9	Isolierung homozygoter <i>knock out</i> -Mutanten	37
2.10	Untersuchung der Stomata von <i>knock out</i> -Mutanten	42
2.11	Untersuchung der Zellwände von <i>knock out</i> -Mutanten	43
2.12	Verwendete Software	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Die vier <i>UGD</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
3.2	Heterologe Expression von <i>UGD</i> 1, 2, 3 und 4 in <i>E. coli</i> , Protein-aufreinigung und biochemische Charakterisierung der Proteine	52

## 6 INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Expressionsmuster der <i>UGD</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
3.4	Isolierung funktioneller, homozygoter <i>UGD-knock out</i> -Mutanten	67
3.5	Screening der <i>UGD knock out</i> -Mutanten auf Unterschiede zu Wildtyp-Pflanzen	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1	Alle vier <i>UGD</i> -Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> codieren für UDP-Glucose Dehydrogenasen	82
4.2	Die vier <i>UGD</i> -Isoformen besitzen unterschiedliche biochemische Eigenschaften und werden differentiell exprimiert	83
4.3	Die Expression der <i>UGD</i> - und <i>MIOX</i> -Gene im Vergleich	87
4.4	Die <i>Arabidopsis thaliana UGD knock out</i> -Mutanten unterscheiden sich in ihren Phänotypen vom Wildtyp	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>110</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	alpha	etc.	et cetera
$\beta$	beta	EST	<i>expressed sequence tags</i>
$\mu$	Mikro (-gramm, -liter, - mol(ar))	f	Femto (-mol)
Abb.	Abbildung	FG	Frischgewicht
ADP	Adenosindiphosphat	g	Gramm bzw. Erdbe- schleunigung
amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz	GDP	Guanosindiphosphat
Asn	Asparagin	GC-MS	Gaschromatographie mit gekoppelt mit
Asp	Asparaginsäure		Massenspektrometrie
BASTA <sup>R</sup>	Phosphinotricin- Resistenz	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
bp	Basenpaare	Glu	Glutamat
bzw.	beziehungsweise	GUS	$\beta$ -Glucuronidase
c	Zenti (-meter)	h	( <i>hour</i> ) Stunde
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	His-Tag	Sequenz aus sechs Histidinaminosäuren
ca.	circa	H <sub>2</sub> O	Wasser
cam <sup>R</sup>	Chloramphenikol- Resistenz	HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
cDNA	komplementäre DNA	Hz	Frequenz (Herz)
C <sub>T</sub>	<i>cycle threshold</i>	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D- thiogalactopyranosid
Cys	Cystein	inkl.	inklusive
DEPC	Diethylpyrocarbonat	kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
d.h.	das heißt	kat	Katal
DNA	Desoxyribonuklein- (acid)säure	Kb	Kilobasenpaare
dNTP	Desoxynukleotid- triphosphat	kDa	Kilodalton
E	Licht (Einstein)	K <sub>i</sub> -Wert	Gleichgewichts- dissoziationskonstante eines Inhibitors
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	K <sub>m</sub> -Wert	Michaeliskonstante
EDTA	Ethylendiaminotetra- essigsäure		

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

l	Liter	pH	negativer dekadischer
lg	Dekadischer Logarithmus		Logarithmus der $H_3O^+$ - Konzentration
Lys	Lysin	RNA	Ribonukleinsäure
M	molar	RNAse	Ribonuklease
m	milli (-gramm, -liter, - meter, -molar)	rpm	<i>rounds per minute</i>
m	meter	RT	Raumtemperatur
m/z	Massen/Ladungs- verhältnis	s	Sekunde
		SD	Standardabweichung
		SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate</i> <i>polyacrylamide gel</i> <i>electrophoresis</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser</i> <i>Desorption Ionization</i> <i>-Time of Flight</i> <i>mass spectrometry</i>	Tab.	Tabelle
MCS	<i>multiple cloning site</i>	TDP	Thiamindiphosphat
min	Minute	Thr	Threonin
MIOX	<i>myo</i> -Inositoxygenase	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminoethan
mRNA	<i>messenger</i> RNA	U	Unit
n	nano (-gramm, -meter, - sekunde)	u.a.	unter anderem
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenin- dinukleotid (oxidierte Form)	UBQ5	Ubiquitin5
NADH	Nikotinamidadenin- dinukleotid (reduzierte Form)	UDP	Uridindiphosphat
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenin- dinukleotidphosphat	UDP-Glc	UDP-Glucose
OD	optische Dichte	UDP-GlcA	UDP-Glucuronsäure
p	pico (-mol)	UGD	UDP-Glucose Dehydrogenase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	UTR	<i>untranslated region</i>
		<i>uidA</i>	Gen der $\beta$ -Glucuronidase
		usw.	und so weiter
		V	Spannung (Volt)
		Vol	Volumen
		v/v	Volumenanteile pro Volumen

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 9

$v_{\max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms	XEG	Xyloglucan- endoglucanase
$w/v$	Gewichtsanteile pro Volumen	X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3- indolyl- $\beta$ -D- glucuronsäure
WT	Wildtyp	z.B.	zum Beispiel



# 1 EINLEITUNG

## 2.1 DIE PFLANZLICHE ZELLWAND

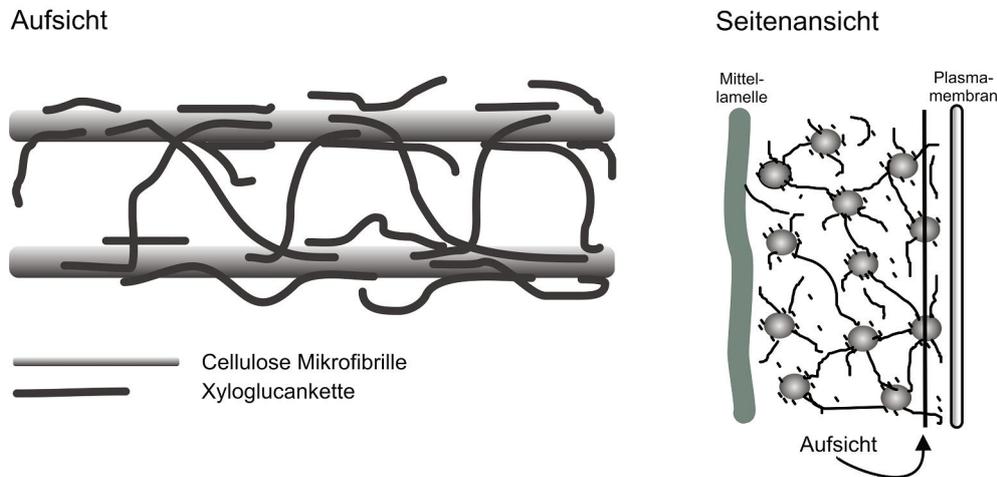
Pflanzenzellen sind von einer komplexen, mechanisch robusten Wand umgeben. Diese gibt den Zellen als Exoskelett ihre Form und ermöglicht den Aufbau eines hohen Turgordrucks. Daneben spielt die Zellwand bei der Zell-Zell-Adhäsion, der Zell-Zell-Signalübermittlung, der Pathogenabwehr und bei vielen weiteren Wachstums- und Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle (Cosgrove, 1997; Somerville *et al.*, 2004).

Die pflanzliche Zellwand setzt sich typischerweise aus Mittellamelle, Primär- und in vielen Fällen auch Sekundärzellwand zusammen. Die Mittellamelle verbindet als Kittsubstanz die Primärzellwände zweier benachbarter Pflanzenzellen miteinander. Sie unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von der restlichen Zellwand, z. B. durch ihren höheren Pektinanteil (Taiz & Zeiger, 1998). Die Primärzellwand entsteht während der Zellteilung entlang der sich zur Mittellamelle entwickelnden Zellplatte (Somerville *et al.*, 2004) und besteht zu etwa 90% aus Polysacchariden und zu etwa 10% aus Proteinen (Carpita & Gibeaut, 1993). In *Arabidopsis thaliana* setzt sich die Primärzellwand aus 14% Cellulose, 24% Hemicellulose, 42% Pektin und 14% Proteinen zusammen (Zabackis *et al.*, 1995). Dabei sind die genauen Anteile der verschiedenen Komponenten sowohl abhängig vom Zelltyp als auch vom Wachstums- und Entwicklungsstadium der Zelle (Richmond & Somerville, 2001; Willats *et al.*, 2001; Freshour *et al.*, 2003).

Wie die einzelnen Bestandteile in der Primärzellwand angeordnet sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Derzeit werden verschiedene Modelle diskutiert, wobei das so genannte *tethered*-Netzwerk von Fry (1989a) und Hayashi (1989) das favorisierte darstellt. Dieses Modell geht davon aus, dass Cellulosefibrillen durch lange Xyloglucanketten miteinander verbunden sind. Die Xyloglucanketten könnten dabei entweder zur Quervernetzung oder zur Verhinderung von Interaktionen benachbarter Cellulosefibrillen dienen (Abb.1.1). Pektine und Strukturproteine bilden in diesem Modell ein ähnlich komplexes, aber davon

## 12 EINLEITUNG

unabhängiges Netzwerk, dass die Cellulosefibrillen und Xyloglucanketten zwar umschlingt, mit diesen aber nicht kovalent verbunden ist.



**Abbildung 1.1:**  
**Modell der Zellwandstruktur nach Fry (1989a) und Hayashi (1989)**  
**(Abbildung verändert nach Cosgrove, 2001)**

Die Cellulosefibrillen werden durch lange Xyloglucanketten miteinander verbunden. Pektine und Strukturproteine bilden ein ähnlich komplexes, aber davon unabhängiges Netzwerk, das die Cellulosefibrillen und Xyloglucanketten umschlingt, mit diesen aber nicht kovalent verbunden ist. Aus Gründen der Übersicht wurde auf die Darstellung der Pektine und der Strukturproteine in den Räumen zwischen den Xyloglucanketten verzichtet.

In einem älteren Modell von Keegstra *et al.* (1973) wird dagegen postuliert, dass die Matrixpolysaccharide, bestehend aus kovalent miteinander verbundenen Xyloglucanen, Pektinen und Strukturproteinen, über Wasserstoffbrücken an die Cellulosefibrillen binden, wodurch ein gigantisches, makromolekulares Netzwerk gebildet wird. Kovalente Bindungen zwischen Pektinen und Xyloglucanen konnten bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Cosgrove, 2001). Ein weiteres Modell, das so genannte *multicoat*-Modell, stellten Talbott und Ray (1992) vor. Demnach sollen die Cellulosefibrillen von einer Reihe locker gebundener Polysaccharidschichten aus Pektinen und Hemicellulosen umgeben sein. Die Bindung zwischen den Cellulosemikrofibrillen soll in diesem Modell indirekt, über nicht kovalente Assoziationen zwischen den einzelnen Polysaccharidschichten zustande kommen. Ein viertes Modell (*stratified*-Modell), vorgestellt von Ha *et al.* (1997), geht von einer regelmäßigen Schichtung aus, bei der Pektinschichten als Abstandhalter zwischen Cellulose-/Hemicellulose-Lamellen dienen. Keines der vorgestellten Modelle gilt als gesichert, gibt es doch für jedes Beweise und

Gegenbeweise (Cosgrove, 2001). Neueste Untersuchungen an Zellwandmutanten von *Arabidopsis thaliana*, in denen kein Xyloglucan nachweisbar war, lassen vor allem am *tethered*-Modell Zweifel aufkommen: Die Mutanten zeigten zwar einen gegenüber dem Wildtyp veränderten Phänotyp bezüglich ihrer Biegefestigkeit, dieser war jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als man es anhand des Modells erwartet hätte (Cavalier et al, 2008).

Nach Abschluss des Zellwachstums wird der Primärzellwand oft noch eine zweite Schicht, die Sekundärzellwand, aufgelagert. Diese ist in ihrer Struktur und Zusammensetzung je nach Zelltyp hochspezialisiert und deutlich dicker als die Primärzellwand. Sie besitzt gegenüber dieser einen wesentlich höheren Anteil an Cellulose, und es werden andere Hemicellulosen verwendet als in der Primärzellwand. In einigen sekundären Zellwänden wird außerdem Pektin durch Lignin ersetzt (Taiz & Zeiger, 1998).

## 2.2 DIE BESTANDTEILE DER PFLANZLICHEN

### PRIMÄRZELLWAND

Wie oben beschrieben setzt sich die primäre Zellwand aus Cellulose, Hemicellulose, Pektinen und Proteinen zusammen. Aufbau und Funktion der einzelnen Zellwandbestandteile soll im Folgenden näher erklärt werden.

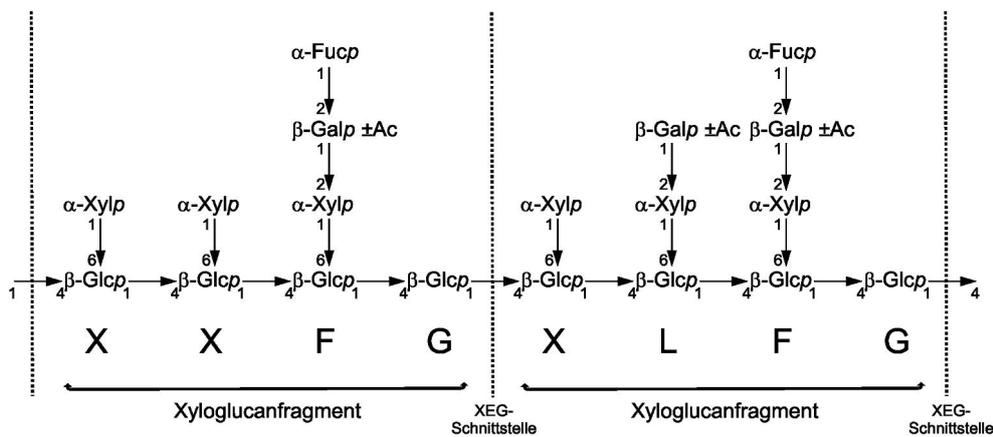
#### Cellulose

Cellulosefibrillen sind lange, unverzweigte Polysaccharide, die aus bis zu 14 000 über 1,4- $\beta$ -glycosidische Bindungen miteinander verknüpften  $\beta$ -D-Glucose-Molekülen bestehen. 30-36 dieser  $\beta$ -1,4-D-Glucose-Ketten bilden eine so genannte Mikrofibrille. Dabei halten die einzelnen Ketten durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammen (Somerville *et al.*, 2004). Die Mikrofibrillen haben eine sehr hohe Zugfestigkeit, sind nicht wasserlöslich, chemisch sehr stabil und relativ widerstandsfähig gegenüber enzymatischen Angriffen (Cosgrove, 1997). Die Synthese der Cellulose erfolgt durch Cellulose-Synthasen (CESA), welche so genannte Rosetten-Komplexe in der Plasmamembran bilden (Kimura *et al.*, 1999).

## Hemicellulose

Hemicellulose ist der Überbegriff für eine heterogene Gruppe nicht kristalliner Glycane, die fest in der Zellwand gebunden sind. Im Gegensatz zur Cellulose bilden Hemicellulosen verzweigte Ketten mit einem Rückgrat aus neutralen Zuckern (Cosgrove, 1997; Somerville *et al.*, 2004).

Die in Dikotylen am häufigsten vorkommende und am besten analysierte Hemicellulose ist das Xyloglucan (Cosgrove, 1997). In *Arabidopsis thaliana* macht der Xyloglucananteil 20% der Primärzellwand aus (Zablackis *et al.*, 1995). Xyloglucan besteht aus einem Rückgrat von 1,4-glycosidisch verbundenen Glucosemolekülen mit kurzen Seitenketten, die Xylose, Galactose und terminal oft Fucose enthalten (McNeil *et al.*, 1984; Fry, 1989b). Die molekulare Zusammensetzung und die Verteilung der Seitenketten sind abhängig vom Gewebetyp innerhalb einer Pflanze und von der Pflanzenart (Pauly *et al.*, 1999).



**Abbildung 1.2:**  
**Generelle Xyloglucanstruktur in Zellwänden dikotyler Pflanzen**  
 (Abbildung verändert nach Pauly *et al.*, 2001)

Der Einbuchstabencode nach Fry *et al.* (1993), bei dem jeder Seitenkettentyp einen bestimmten Buchstaben zugeordnet bekommt, ist für jeden  $\beta$ -D-Glucosylrest unterhalb der Struktur angegeben. Der Buchstabe G repräsentiert beispielsweise einen unverzweigten  $\beta$ -D-Glucosylrest, der Buchstabe X dagegen einen  $\beta$ -D-Glucosylrest mit einem  $\alpha$ -D-Xylosylsubstituenten usw.. Die Zahlen zeigen an, zwischen welchen C-Atomen innerhalb der Moleküle sich die glycosidischen Bindungen ausgebildet haben. Die Xyloglucane können durch Xyloglucanendoglucanasen (XEG) hydrolysiert werden. Diese schneiden das Xyloglucangerüst nach nicht substituierten Glucoseresten (gepunktete Linie). Es entstehen Xyloglucanfragmente definierter Länge.  $\beta$ -Glc $p$  = Glycopyranosyl,  $\alpha$ -Xyl $p$  = Xylopyranosyl,  $\beta$ -Gal $p$  = Galactopyranosyl,  $\alpha$ -Fuc $p$  = Fucopyranosyl, Ac = Acetylrest

Der Aufbau des Xyloglucans lässt sich durch den Verdau mit Xyloglucanendoglucanase (XEG) untersuchen. Diese schneidet das Xyloglucangerüst nach nicht substituierten Glucoseresten, und man erhält ein gewebe- und arttypisches, konserviertes Muster von Xyloglucanfragmenten unterschiedlicher Länge (Lerouxel *et al.*, 2002). Zur vereinfachten Darstellung der Fragmente wurde ein Einbuchstabencode eingeführt (Fry *et al.*, 1993; Abb.1.2). Dieser beruht darauf, dass jedem Seitenkettentyp ein bestimmter Buchstabe zugeordnet wird. Dabei ist der Buchstabe korreliert mit dem Anfangsbuchstaben des terminal stehenden Zuckerrests. Der Buchstabe G steht beispielsweise für einen unverzweigten  $\beta$ -D-Glucosylrest, der Buchstabe X dagegen für einen  $\beta$ -D-Glucosylrest mit einem  $\alpha$ -D-Xylosylsubstituenten usw.. Anzahl und Abfolge der Buchstaben geben die Länge wie auch die Zusammensetzung des Xyloglucanfragmentes an.

### **Pektin**

Auch die Pektine sind eine heterogene Gruppe von Polysacchariden, die durch ihre Hauptbestandteile, die Uronsäuren (z.B. Glucuron- und Galacturonsäure) charakterisiert sind (Cosgrove, 1997). Viele Carbonsäurereste der Pektine sind außerdem mit Methyl-, Acetyl- und anderen nicht identifizierten Gruppen verestert. Diese Modifikation beeinflussen die Konformation und Bindungsfähigkeit der Pektine in der Zellwand (Kim & Carpita, 1992; McCann *et al.*, 1994). Ein Teil der freien Carboxylgruppen wird durch Kalzium- und Magnesium-Ionen komplexiert. Ohne diese Ionen ist Pektin wasserlöslich. Im nativen Zustand mit Ionen bildet sich jedoch ein plastisch verformbares, sehr quellungsfähiges Gel (Heldt, 1999).

Das einfachste Pektin ist Homogalacturonan (HG), ein unverzweigtes Polymer aus 1,4-glycosidisch verbundenen D-Galacturonsäure-Molekülen. Komplexere, verzweigte Pektine sind Rhamnogalacturonan I und II (RGI und II) (Somerville *et al.*, 2004). In den Zellwänden von *Arabidopsis thaliana* enthält die Pektinmatrix 11% Rhamnogalacturonan I, 8% Rhamnogalacturonan II und 23% Homogalacturonan (Zablackis *et al.*, 1995).

### **Strukturproteine**

Zusätzlich zu den Polysacchariden enthalten pflanzliche Zellwände verschiedene Strukturproteine (Showalter, 1993). Typische Strukturproteine zeigen hoch repetitive Primärstrukturen und sind stark glycosyliert. Die Proteine sind zunächst wasserlöslich, werden jedoch im Laufe der Zellreifung oder bei Verwundung nahezu unlöslich (Cosgrove, 1997). Der genaue biochemische Mechanismus, der zu der Unlöslichkeit führt, ist bis heute nicht aufgeklärt. Unter anderem werden intermolekulare Diphenyletherbindungen zwischen den Tyrosinresten der Proteine vermutet (Fry, 1986, Wallace & Fry, 1994; Brady *et al.*, 1996). Je nach Zelltyp, Reifestadium der Zelle und Stimulation lassen sich verschiedene Strukturproteine in unterschiedlichen Mengen in der Zellwand nachweisen. So konnte gezeigt werden, dass sich die Expression vieler Strukturproteinen bei Pathogenangriffen, Verwundung oder Behandlung mit Elicitoren erhöht (Showalter, 1993).

### **2.3 DIE PRIMÄRZELLWAND Æ DIE SYNTHESE DER ZUCKER**

Die meisten für die Synthese der Primärzellwand benötigten Monosaccharide stammen von der aktivierten Form der D-Glucose, der UDP-D-Glucose, ab. Eine Ausnahme bilden die L-Fucose und die L-Galactose, die aus GDP-Mannose synthetisiert werden (Seifert, 2004). UDP-D-Galactose und UDP-L-Rhamnose werden direkt aus UDP-D-Glucose gebildet. Die meisten anderen für die Zellwand benötigten UDP-Zucker werden jedoch über UDP-D-Glucuronsäure hergestellt. So kann UDP-GlcA beispielsweise durch Epimerisierung in UDP-D-Galacturonsäure umgewandelt werden. Weiterhin können durch Decarboxylierung UDP-D-Xylose, welche wiederum zu UDP-L-Arabinose epimerisiert werden kann, und UDP-D-Apiose gebildet werden (Reiter & Vanzin, 2001; Seifert, 2004). Die Synthese der UDP-Zucker findet überwiegend im Cytoplasma statt. Von dort aus erfolgt die Weiterverarbeitung im Golgi-Apparat (Orellana, 2005).

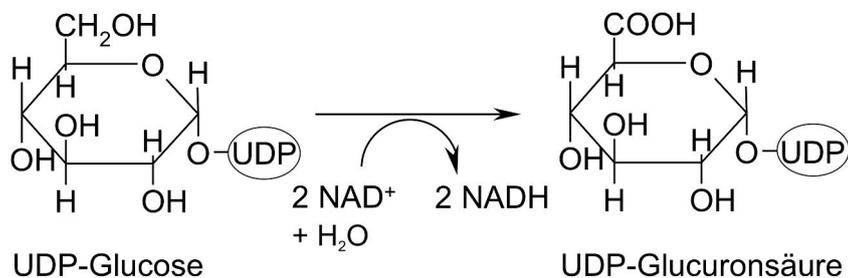
In Pflanzen existieren zwei Wege, UDP-D-Glucuronsäure (UDP-GlcA) zu synthetisieren (Abb.1.3). Zum einen kann UDP-GlcA durch die Oxidation von UDP-D-Glucose unter der Reduktion von zwei NAD<sup>+</sup>-Molekülen gebildet



Promotor des MIOX2-Gens aus *Arabidopsis thaliana* vor ein für die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) codierendes Gen kloniert worden war, und einer GFP-Reporterorganpflanze, die ein entsprechendes Konstrukt mit dem UGD2-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* vor dem für GFP (= grün fluoreszierendes Protein) codierenden Gen enthielt, gelang es erste Erkenntnisse über das Zusammenspiel beider Synthesewege in *Arabidopsis* zu gewinnen (Kanter, 2006). Die Ergebnisse aus diesem und weiteren Versuchen führten letztendlich zu der Vermutung, dass die Nucleotidzucker, die zur Biosynthese der Hemicellulosen und Pektine im Pollen und bei der Samenentwicklung benötigt werden, überwiegend über den Inosit-Oxidationsweg zur Verfügung gestellt werden (Kanter, 2006).

#### 1.4 DIE UDP-GLUCOSE DEHYDROGENASE

Die UDP-Glucose Dehydrogenase (UGD) katalysiert die Oxidation von UDP-Glucose (UDP-Glc) zu UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA) unter der Reduktion von zwei  $\text{NAD}^+$ -Molekülen (Abb.1.4).



**Abbildung 1.4:**  
Schematische Darstellung der UDP-Glucose Dehydrogenase-(Netto)-Reaktion

Die Reaktion erfolgt in drei Schritten unter der Bildung eines Aldehyd-, eines Thiohemiacetal- und eines Thioesterintermediates (Ge *et al.*, 2004). Diese scheinen mit dem Enzym fest verbunden zu bleiben, wie Versuche mit Aldehyd-fangenden Substanzen zeigten (Campbell & Tanner, 1999).

Der erste Nachweis einer UDP-Glucose Dehydrogenase-Aktivität gelang vor über 50 Jahren in Präparationen aus Kälberleber (Strominger *et al.*, 1954). Inzwischen wurden UDP-Glucose Dehydrogenasen in vielen anderen Organismen nachgewiesen. Im Jahre 2000 wurde von Campbell *et al.* die erste

Röntgenstruktur einer UGD aus *Streptococcus pyogenes* veröffentlicht. Im Zuge dieser Untersuchung konnten mehrere Aminosäurereste identifiziert werden, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle im aktiven Zentrum des Enzyms spielen. Dabei scheint besonders ein Cysteinrest an Position 260 essentiell zu sein. Der Cysteinrest führt vermutlich einen nukleophilen Angriff auf das Aldehydintermediat aus, wobei ein Thiohemiacetalintermediat entsteht, welches zu einem Thioester unter der Bildung von einem Molekül NADH oxidiert wird. Ein Austausch des Cysteins gegen Serin oder Alanin führte bei der UGD aus *Streptococcus* zu einem völlig inaktiven Enzym. Die Beteiligung eines Cysteinrests bei der Katalyse wurde schon früher bei den UDP-Glucose Dehydrogenasen aus Rinderleber (Ridley *et al.*, 1975) und *Streptococcus* nachgewiesen (Campbell *et al.*, 1997; Ge *et al.*, 1998). Weitere Reste, die potentiell eine Rolle beim Hydrid-Transfer (Thr118, Lys204, Asn208 und Asp264) und/oder der Hydrolyse (Glu141 und Glu145) spielen könnten, wurden ebenfalls in der Studie von Campbell *et al.* (2000) und in einer Folgestudie (Ge *et al.*, 2004) identifiziert. Sommer *et al.* (2004) fand außerdem bei einer aus *Homo sapiens* isolierten UGD einen Aminosäurerest, der an der Hexamerbildung des Enzyms beteiligt zu sein scheint (Lys279).

Interessanterweise übt das Produkt der UGD, die UDP-Glucuronsäure, im Organismus ganz unterschiedliche Funktionen aus. In Säugetieren wird UDP-GlcA unter anderem für die Produktion von Hyaluronan, welches ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und beteiligt an der Steuerung des normalen Zellwachstums und der Zellmigration ist, benötigt (Rodén, 1980). In der Leber dient UDP-GlcA außerdem als Substrat für die UDP-Glucuronosyl-Transferasen, die die Herstellung von Glucuronid-Konjugaten verschiedener Substanzen katalysieren und damit bei deren Exkretion helfen (Dutton, 1980). Auch in vielen pathogenen Bakterien, zum Beispiel in *Streptococcus pneumoniae*, wurden UDP-Glucose Dehydrogenasen gefunden; UDP-GlcA wird hier für die Konstruktion der antiphagocytischen Kapselpolysaccharide benötigt (Arrecubieta *et al.*, 1994).

Über pflanzliche UDP-Glucose Dehydrogenasen war lange Zeit nur wenig bekannt. 1996 wurde das erste UDP-Glucose Dehydrogenase-Gen aus einer Pflanze (*Glycine max*) kloniert (Tenhaken & Thulke, 1996). Weitere pflanzliche UGD-Gene folgten, wie zum Beispiel aus *Arabidopsis thaliana* (Seitz *et al.*, 2000; Oka & Jigami, 2006), aus Zuckerrohr (Turner & Botha, 2002), aus Pappel

(Johansson *et al.*, 2002), aus Mais (Kärkönen *et al.*, 2005) und aus Tabak (Bindschedler *et al.*, 2005). Die pflanzlichen UGD-Gene sind hochkonserviert und zeigen eine große Homologie zu tierischen UGD-Genen. Pflanzliche UGDs sind cytoplasmatisch (Kärkönen, 2005) und unterliegen einer *feedback*-Hemmung durch UDP-Xylose (Stewart & Copeland, 1999; Turner & Botha, 2002; Hinterberg *et al.*, 2002; Oka & Jigami, 2006). Weitere Versuche mit NADH als Hemmstoff lieferten Hinweise darauf, dass die UGD aus *Glycine max* über den Redoxstatus des NAD<sup>+</sup>/NADH-Pools reguliert werden könnte (Stewart & Copeland, 1999). Es wird vermutet, dass die nativen pflanzlichen UGDs als hexamere Komplexe aktiv sind (Stewart & Copeland, 1999; Oka & Jigami, 2006). Im Gegensatz dazu war die heterolog in *E. coli* exprimierte UGD aus *Glycine max* auch als Monomer aktiv (Hinterberg *et al.*, 2002), wobei die Autoren nicht ausschließen, dass eine Oligomerisation der Untereinheiten durch die Hexahistidin-Modifikation am N-Terminus des heterolog exprimierten Enzyms negativ beeinflusst worden sein könnte. Expressionstudien mittels Northern- und Western-Plots wie auch Reportergermpflanzen zeigten, dass die UGD-Expression in jungem, wachsendem Gewebe am höchsten ist, wie zum Beispiel in *Arabidopsis*-Keimlingen (Seitz *et al.*, 2000), in sich entwickelnden Soja-Wurzelknöllchen (Stewart & Copeland, 1999), in den Internodien von Zuckerrohr (Turner & Botha, 2002) oder in den sich entwickelnden Blättern von Mais (Kärkönen *et al.*, 2005).

## 2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Zu Beginn meiner Arbeit war über pflanzliche UDP-Glucose Dehydrogenasen wenig bekannt. Einzig die UGD aus *Glycine max* war heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend biochemisch näher charakterisiert worden (Hinterberg *et al.*, 2002). Auch die mögliche Existenz mehrerer UGD-Isoformen innerhalb einer Pflanze hatte bis dahin keine Beachtung gefunden. Die in älteren Studien untersuchten UDP-Glucose Dehydrogenasen wurden als Proteine aus entsprechendem Pflanzenmaterial isoliert, so dass anzunehmen ist, dass die Versuche mit Isoformgemischen durchgeführt wurden. Erst durch die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms wurde es möglich, gezielt nach pflanzlichen UGD codierenden Genen zu suchen.

Ziel meiner Arbeit war es, alle potentiell für eine UDP-Glucose Dehydrogenase codierende Gene in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, zu klonieren und diese Gene und ihre Genprodukte näher zu charakterisieren, wobei ein besonderes Augenmerk auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten der vier UGD-Isoformen gelegt werden sollte.

Dafür wurde zunächst analysiert, ob die identifizierten Gene tatsächlich für UDP-Glucose Dehydrogenasen codieren, indem die Enzyme heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht wurden. Neben den  $K_m$ -Werten wurde auch die Hemmung durch UDP-Xylose und die Substratspezifität der Enzyme bestimmt.

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurden Expressionsorte und-zeitpunkte der UGD-Gene aus *Arabidopsis thaliana* näher untersucht. Dazu wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen generiert, die jeweils ein UGD Promotor::GUS-Reportergenkonstrukt enthielten. Durch Färbung von Pflanzenorganen und Keimlingen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurden Erkenntnisse darüber gewonnen, zu welchen Zeitpunkten der Pflanzenmorphogenese und in welchen Geweben die verschiedenen UGD-Isoformen exprimiert werden. Im Anschluss wurde durch *real time*-PCR die Expressionsstärke der Isoformgene in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* analysiert. Die gewonnenen Expressionsdaten wurden mit entsprechenden Daten der vier MIOX-Gene aus *Arabidopsis thaliana* verglichen (Kanter *et al.*, 2005; Kanter, 2006), um Rückschlüsse zu ziehen, wann welcher Weg zur Synthese von UDP-GlcA in *Arabidopsis* verwendet wird.

Schließlich wurden funktionelle, homozygote *knock out*-Mutanten isoliert, bei denen jeweils ein UGD-Gen durch eine T-DNA-Insertion vollständig ausgeschaltet war. Durch Kreuzung dieser Mutanten wurden außerdem Doppelmutanten mit zwei defekten UGD-Genen generiert. In einem anschließenden Screening wurde untersucht, inwieweit sich die Mutanten in Morphologie und Zellwandaufbau von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyppflanzen unterscheiden. Als Methoden wurden unter anderem *real time*-PCR, HPLC- und MALDI-TOF MS-Analysen eingesetzt.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE PLASMIDE, BAKTERIEN-STÄMME UND TRANSGENEN ARABIDOPSIS-PFLANZEN

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Vektor-rückrat	Quelle
pQEGm-UGD1	Expressionsvektor mit der cDNA von <i>Gm-UGD1</i> aus <i>Glycine max</i>	amp <sup>R</sup>	pQE31	Hinterberg <i>et al.</i> (2002)
pQEUGD2	Expressionsvektor mit der Hybrid-cDNA von <i>Gm-UGD1</i> aus <i>Glycine max</i> und <i>UGD2</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	amp <sup>R</sup>	pQE31	diese Arbeit
pQEUGD3	Expressionsvektor mit der Hybrid-cDNA von <i>Gm-UGD1</i> aus <i>Glycine max</i> und <i>UGD3</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	amp <sup>R</sup>	pQE31	diese Arbeit
pQEUGD4	Expressionsvektor mit der Hybrid-cDNA von <i>Gm-UGD1</i> aus <i>Glycine max</i> und <i>UGD4</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	amp <sup>R</sup>	pQE31	diese Arbeit
pET21aUGD1	Expressionsvektor mit der cDNA von <i>UGD1</i>	amp <sup>R</sup>	pET21a	diese Arbeit
pGroESL	enthält das GroE-Operon aus <i>E. coli</i>	cam <sup>R</sup>	pGT10	Goloubinoff <i>et al.</i> (1989)
pGreenGUS 101.3	pGreen-Vektor, in den die MCS aus pBI101.3 kloniert wurde.	kan <sup>R</sup> und BASTA <sup>R</sup>	pGreenI 0029	Raimund Tenhaken
pGreen UGD4 Prom::GUS	Pflanzenvektor, in dem der Promotor des <i>UGD4</i> -Gens inkl. 5'-UTR vor das <i>uidA</i> -Gen aus <i>E. coli</i> kloniert wurde.	kan <sup>R</sup> und BASTA <sup>R</sup>	pGreen GUS 101.3	diese Arbeit

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Bakterien-Stämme

Bakterienstamm	Verwendungszweck	Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF <sup>7</sup>	Plasmidvermehrung, Klonierung, <i>Blue-White-Screening</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> Origami <sup>TM</sup>	Proteinexpression: Durch das Ausschalten der Thioredoxinreduktase und der Glutathionreduktase wird das Ausbilden von Disulfidbrücken bei der Faltung heterolog exprimierter Proteine erleichtert.	Novagen
<i>A. tumefaciens</i> GV301 (pMP90)	Vermittlung von Pflanzentransformation	Deblarker <i>et al.</i> (1985)

## 24 MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten transgenen *Arabidopsis thaliana*-Linien**

Mutante	Eigenschaften	Resistenz	Linie	Quelle
<i>AtUGD1</i> - Prom::GUS	Enthält eine T-DNA Insertion, bei der die Promotorsequenz des <i>UGD1</i> -Gens vor das <i>uidA</i> -Gen kloniert ist.	kan <sup>R</sup>	38/1	Christoph Klos
<i>AtUGD2</i> - Prom::GUS	Enthält eine T-DNA Insertion, bei der die Promotorsequenz des <i>UGD2</i> -Gens vor das <i>uidA</i> -Gen kloniert ist.	kan <sup>R</sup>	Feb. 2002	Seitz <i>et al.</i> (2000)
<i>AtUGD3</i> - Prom::GUS	Enthält eine T-DNA Insertion, bei der die Promotorsequenz des <i>UGD3</i> -Gens vor das <i>uidA</i> -Gen kloniert ist.	kan <sup>R</sup>	5-3	Christoph Klos
<i>AtUGD4</i> - Prom::GUS	Enthält eine T-DNA Insertion, bei der die Promotorsequenz des <i>UGD4</i> -Gens vor das <i>uidA</i> -Gen kloniert ist.	BASTA <sup>R</sup>	L4	diese Arbeit
Garlic 347_B03_21 $\Delta UGD1$	Durch eine T-DNA Insertion ist das <i>UGD1</i> -Gen funktionell ausgeschaltet. Die Insertion liegt homozygot vor.	BASTA <sup>R</sup>	L1-1	Syngenta Arabidopsis Insertion Library*
SALK_025303 $\Delta UGD1$	Durch eine T-DNA Insertion ist das <i>UGD1</i> -Gen funktionell ausgeschaltet. Die Insertion liegt homozygot vor.	kan <sup>R</sup>	L4	NASC (European Arabidopsis Stock Center) *
Garlic_1144_F10 $\Delta UGD2$	Durch eine T-DNA Insertion ist das <i>UGD2</i> -Gen funktionell ausgeschaltet. Die Insertion liegt homozygot vor.	BASTA <sup>R</sup>	L1-11	Syngenta Arabidopsis Insertion Library*
SALK_006234 $\Delta UGD3$	Durch eine T-DNA Insertion ist das <i>UGD3</i> -Gen funktionell ausgeschaltet. Die Insertion liegt homozygot vor.	kan <sup>R</sup>	L4-1	NASC (European Arabidopsis Stock Center) *
Wisconsin 9C40 $\Delta UGD4$	Durch eine T-DNA Insertion ist das <i>UGD4</i> -Gen funktionell ausgeschaltet. Die Insertion liegt homozygot vor.	kan <sup>R</sup>	L1-2	University of Wisconsin- Madison*
$\Delta UGD1 \times$ $\Delta UGD4$	Kreuzung aus Garlic 347_B03_21 L1-1 und Wisconsin 9C40 L1-2. <i>UGD1</i> - und <i>UGD4</i> -Gen sind funktionell ausgeschaltet. Beide Insertionen liegen homozygot vor.	BASTA <sup>R</sup> und kan <sup>R</sup>	L1-7	diese Arbeit
$\Delta UGD2 \times \Delta UGD3$	Kreuzung aus Garlic_1144_F10 L1-11 und SALK_006234 L4-1. Die Insertion im <i>UGD2</i> -Gen liegt homozygot vor, die im <i>UGD3</i> -Gen heterozygot.	BASTA <sup>R</sup> und kan <sup>R</sup>	L1-7 und L10-3	diese Arbeit

\*Nähere Informationen über Herstellung und Bezug der transgenen *knock out*-Linien auf <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

Als Kontrollpflanzen wurden in allen Experimenten Wildtyp-Pflanzen *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Col-0 oder WS-2 verwendet. Die Samen der Pflanzen des Ökotyps Col-0 wurden dabei aus dem NASC (European Arabidopsis Stock

Center) bezogen und entstammten der gleichen Linie, mit der dort auch die *knock out*-Mutanten gewonnen worden waren.

## 2.2 CHEMIKALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham, Biozym, Duchefa, Fluka, Merck, Roth, Qiagen, Serva und Sigma bezogen. Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer stammten von der Firma MBI Fermentas. Spezielle Chemikalien werden gesondert in den einzelnen Protokollen aufgeführt.

## 2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Alle molekularbiologischen Standard-Methoden wie Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, Restriktionsverdau, PCR, Ligation, Agarosegelelektrophorese, Anzucht und Transformation von *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989; Weigel & Glazebrook, 2002) oder nach Herstellerangaben der verwendeten Kits durchgeführt.

### **Isolierung kleiner Mengen genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* (nach Weigel & Glazebrook, 2002)**

100mg Pflanzenmaterial wurden in Stickstoff schockgefroren, pulverisiert (mit Wolframkarbidkugeln (Ø 3mm) von Qiagen in einer Schwingmühle Retsch MM200; 3x 30s mit einer Frequenz von 30Hz), in 300µl 65°C warmen CTAB-Puffer (100mM TRIS/HCl pH8.0, 20mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 1,4M NaCl, 2% (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), 1% PVP 40.000 (Polyvinylpyrrolidone)) rückgelöst und 30min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 300µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) zugegeben, gemischt und für 2min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge (Biofuge *pico*, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Die DNA wurde im Anschluss mit 0,7 Vol. Isopropanol für 10min bei RT gefällt und durch eine 15minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert.

## 26 MATERIAL UND METHODEN

Nachdem die DNA mit 500µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen worden war, wurde sie im Vakuum getrocknet und in 300µl TE-Puffer (10mM TRIS/HCl pH8.0 und 1mM EDTA) rückgelöst. Je PCR-Reaktion wurde 1µl DNA eingesetzt.

### **RNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana***

**(nach Chomczynski, 1993; US-Patent 5.346.994)**

100mg Pflanzenmaterial wurden in Stickstoff schockgefroren, pulverisiert (mit Wolframkarbidkugeln (Ø 3mm) von Quiagen in einer Schwingmühle Retsch MM200, 3x 30s mit einer Frequenz von 30Hz) und in 1ml TriReagent (0,4M Ammoniumthiocyanat, 0,8M Guanidinthiocyanat, 0,1M Natriumacetat, 5% (v/v) Glycerin, 38% (v/v) Phenol pH5.0) gelöst. Nach einer Inkubation von 10min bei RT wurden die Zellreste und die genomische DNA durch eine 10minütige Zentrifugation bei 13000g entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und mit 100µl Bromchlorpropan versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 10min bei RT inkubiert und anschließend bei 13000g für 10min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit je 0,5Vol RNAsefreiem Isopropanol und Natriumcitrat/Natriumchlorid-Lösung (1,2M NaCl, 0,8M Natriumcitrat, RNAsefrei) versetzt. Nach vorsichtigem Invertieren wurde für 15min bei RT gefällt. Anschließend wurde die RNA für 15min bei 13000g sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, die RNA zweimal mit jeweils 500µl 70%igem (v/v) RNAsefreiem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 50µl DEPC-Wasser (0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (Roth) in Millipore-Wasser unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert) rückgelöst.

Menge und Qualität der gewonnenen RNA wurden mittels eines 1%igen Agarose-TAE-Gels überprüft. Dazu wurden jeweils 2µl der RNA unter Verwendung eines formamidhaltigen Ladepuffers (67% (v/v) Formamid, 16,7% (v/v) Glycerin, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, 16,7mM TRIS/HCl pH7.6, 1,7mM EDTA) aufgetragen. Je PCR-Reaktion wurde 1µl RNA eingesetzt.

### Herstellung von cDNA

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit der RevertAid<sup>TM</sup>M-MuLV Reverse Transcriptase Kit (#EP0441) der Firma MBI Fermentas gemäß Herstellerangaben. Die cDNA wurde anschließend für den Einsatz in einer Standard-PCR 1:5 verdünnt, für den Einsatz in einer *real time*-PCR 1:20. In beiden Fällen wurde jeweils 1µl der Verdünnung für eine PCR-Reaktion verwendet.

### real time-PCR

Für die *real time*-PCR wurden 1µl der 1:20 verdünnten cDNA, 1x Reaktionspuffer (10x Reaktionspuffer, nach Karsai *et al.* (2002): 100mM TRIS/HCl pH8.5, 500mM KCl, 1.5% Triton X-100, 25mM MgCl<sub>2</sub>), 200µM dNTP's, 6pMol je Primer, Sybergreen 1:200 000 verdünnt (Roche, Mannheim, Germany) und 0,3 µl einer *homemade* Taq-Polymerase (Charge RT765) zu einem endgültigen Reaktionsvolumen von 30µl zusammengegeben. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die PCR erfolgte in einem Stratagene Mx3000P QPCR System (Statagene, La Jolla, USA) bei folgenden Bedingungen: 94°C für 3min, 40x (94°C für 30s; 65°C (*UGD1* und *3*), 57°C (*UGD2*) oder 58°C (*UGD4*) für 45s, 72°C für 1min), 95°C für 1min, 65°C für 30s. Jedes Primerpaar wurde so ausgewählt, dass nur ein einziges PCR-Produkt gebildet werden konnte.

Pro cDNA und Primerkombination wurden drei parallele PCR-Reaktionen durchgeführt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde außerdem in einer weiteren PCR-Reaktion statt cDNA die entsprechende Menge der noch nicht revers transkribierten RNA-Aufreinigung eingesetzt. Des Weiteren wurde, um das Signal der Primerdimere zu erfassen, ein PCR-Ansatz verwendet, der weder cDNA noch RNA enthielt.

Die in der *real time* PCR erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte wurden mit Hilfe der C<sub>T</sub>-Werte des Transkriptes des *housekeeping*-Gens Ubiquitin-5 (*UBQ5*: At3g62250) normalisiert (Karsai *et al.*, 2002). Für die Amplifikation des *UBQ5*-Gens wurden die in Tabelle 2.4 aufgelisteten Primer unter den folgenden Bedingungen verwendet: 94°C für 3min, 40x (94°C für 15s, 56°C für 20s, 72°C für 20s), 95°C für 1min, 65°C für 30s.

**Tabelle 2.4: In der real time-PCR verwendete Primerpaare**

\*Primersequenzen in Tabelle 2.8

Gen	Primerpaar	Produktgröße
<i>UGD1</i>	koT1K7fwd und koT1K7rev*	1400 bp
<i>UGD2</i>	UGD2_cDNAfwd und UGD2_cDNArev*	1100 bp
<i>UGD3</i>	koT20K14fwd und koT20K14rev*	1300 bp
<i>UGD4</i>	koUGD4_884rev und UGD4BspTI_neu*	1300 bp
<i>UBQ5</i>	UBQ5fwd (5'-AACCCCTTGAGGTTGAATCATCC-3') UBQ5rev (5'-GTCCCTCTTTCTGGTAAACGT-3')	426 bp

Für die Auswertung musste zunächst die Effizienz einer PCR-Reaktion mit einer bestimmten Primerkombination und einer bestimmten cDNA ermittelt werden. Dazu wurde zunächst für jedes Primerpaar bzw. jede cDNA eine Eichgerade erstellt, in der die DNA-Menge der Matrize gegen den erhaltenen  $C_T$ -Wert aufgetragen wurde. Dazu wurde die cDNA der vier *UGD*-Gene und des *UBQ5*-Gens mittels PCR amplifiziert (Verwendete Primer siehe Tabelle 2.4; als Matrize dienten im Falle der *UGD*-Gene die entsprechenden EST-Klone (siehe Kapitel 2.4), bei *UBQ5* *Arabidopsis*-DNA) und über Agarose Gelelektrophorese augetrennt. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend über Agarosegelextraktion (Nucleo Spin Kit, Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die DNA-Menge wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Anschließend wurden Verdünnungen angefertigt, die 1 bis  $1 \times 10^{-7}$  fmol DNA je  $\mu$ l enthielten. Jeweils 1 $\mu$ l einer jeden Verdünnung wurde dann in eine *real time*-PCR-Reaktion eingesetzt. Auch hier wurden drei parallele PCR-Reaktionen durchgeführt. Aus den Eichgeraden ließ sich die Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktionen nach folgender Formel berechnen:

$$C_T = (-1/\lg E) * \lg N_0 + (-1/\lg E) * \lg N_{CT} \quad , \text{ das entspricht:}$$

$$y = m * x + n$$

$$C_T = C_T\text{-Wert}$$

$$E = \text{Effizienz}$$

$$N_0 = \text{DNA-Ausgangsmenge, die in PCR eingesetzt wurde}$$

$$N_{CT} = N_0 * E^{CT}$$

Damit ist:  $m = -1/\lg E$ , also  $E = 10^{(-1/m)}$ .

Mit Hilfe der Effizienzen ließen sich nun die Ergebnisse der einzelnen *real time*-PCR-Reaktionen miteinander vergleichen.

Beispielrechnung (Vergleich Expression *UGD1* mit *UGD2*):

$$[(E_{UGD1-Mix}^{CT^{UGD1}})/(E_{UBQ5-Mix}^{CT^{UBQ5}})]^{-1} \text{ mit } [(E_{UGD2-Mix}^{CT^{UGD1}})/(E_{UBQ5-Mix}^{CT^{UBQ5}})]^{-1}$$

## 2.4 HETEROLOGE EXPRESSION IN *E. COLI*

### Herstellung der Expressionskonstrukte

Zur Herstellung der Expressionskonstrukte wurde der offene Leserahmen der *UGD*-Gene über PCR (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit, New England Biolabs) amplifiziert. Dabei wurden die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Primerkombinationen verwendet. Als Matrize dienten EST-Klone, die die cDNA des jeweiligen Gens in voller Länge enthielten (*UGD1*: M77J01, *UGD2*: AV43959, *UGD3*: 43C9T7, *UGD4*: 105N9T7 (alle European Arabidopsis stock center). Die PCR-Produkte wurden über die durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen in die Expressionsvektoren pQEG*m*-*UGD1* (Hinterberg *et al.*, 2002) bei der Klonierung von *UGD2-4* oder pET21a (Novagen, Darmstadt, Germany) bei der Klonierung von *UGD1* gebracht. Die fertigen Konstrukte wurden durch eine DNA-Sequenzierung verifiziert (Seqlab, Göttingen, Germany).

**Tabelle 2.5: Zur Herstellung der Expressionskonstrukte verwendete Primerpaare**

Gen	Primerpaare	Restriktionsschnittstellen
<i>UGD1</i>	5'-ATGGATCCAATGGTGAAGATATGCTGCATAG-3' 5'-GTCTCGAGCAATGCCACAGCAGGCATA-3'	<i>Bam</i> HI und <i>Xba</i> I
<i>UGD2</i>	5'-GCACTTAAGTGTCCAGACGTTGAAGTAG-3' 5'-ACGGTACCTGTCGAATACAAGTCCTCTT-3'	<i>Bsp</i> TI und <i>Kpn</i> I
<i>UGD3</i>	5'-GCTCTTAAGTGTCCATCTGTTGAAGTAG-3' 5'-ACGGTACCACCAAGGTACATAATTACC-3'	<i>Bsp</i> TI und <i>Kpn</i> I
<i>UGD4</i>	5'-GCACTTAAGTGTCCAGATATTGAAGTGGC-3' 5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3'	<i>Bsp</i> TI und <i>Hind</i> III

## 30 MATERIAL UND METHODEN

Die Expressionskonstrukte wurden zusammen mit dem Plasmid pGroESL (Goloubinoff *et al.*, 1989) in den *E. coli*-Stamm Origami<sup>TM</sup> (Novagen, Darmstadt, Germany) transformiert.

### **Heterologe Expression in *E. coli***

250ml LB Broth-Medium (idg #LAB173) mit 100µg/ml Ampizillin (ICN biomedical), 34µg/ml Chloramphenikol (Sigma), 20µg/ml Tetrazyklin (Sigma) und 50µg/ml Kanamycin (Duchefa) wurden aus einer über Nacht angezogenen Vorkultur 1:100 angeimpft und bei 37°C geschüttelt (200 Umdrehungen/min). Bei einer OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,4 (Photometer Hitachi U-1100) wurde die Kultur für 15min bei RT abgekühlt und die Expression durch Zugabe von 500µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid, Eppendorf) induziert. Die weitere Anzucht erfolgte bei 23°C für etwa 20h unter Schütteln (200 Umdrehungen/min).

### **Aufschluss der *E. coli*-Zellen und Aufreinigung der Enzyme**

Die *E. coli*-Kultur wurde für 15min auf Eis bewegt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 4500g für 10min sedimentiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden in 10ml/g FG kaltem Aufschlusspuffer (50mM Natriumphosphat, 10mM TRIS/HCl pH8.0, 10% (v/v) Glycerin, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM β-Mercaptoethanol, 1mM NAD<sup>+</sup> (Biomol), 0,2mM PMSF in Isopropanol (Phenylmethylsulphonylfluorid, Fluka) unter Vortexen aufgetaut. Zum Aufschluss wurden die *E. coli*-Zellen nach der Zugabe von 200µg/ml Lysozym (Boehringer) und 1% Nonidet-P40 (Fluka) auf Eis für 45min geschüttelt. Um die Zellreste und Membranen von den löslichen Proteinen zu trennen, wurde die Suspension anschließend für 10min bei 14500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 2,4U/ml Benzonase Nuklease HC (Novagen) versetzt und für 15min auf Eis geschüttelt, um die genomische DNA und die RNA zu verdauen.

Zur spezifische Aufreinigung der heterolog exprimierten UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* wurde eine Nickel beladene Matrix verwendet (Ni-NTA-Säule) (Quiagen), an die die sechs Histidinreste der UGD-Fusionsproteine binden konnten. Dazu wurde der Überstand mit 250mM NaCl versetzt und auf eine 1ml Ni-NTA-Säule gegeben. Die Säule wurde einmal mit 5ml NTA-1-Puffer (50mM

Natriumphosphat, 10mM TRIS/HCl pH8.0, 250mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin 0,5mM NAD<sup>+</sup>) und einmal mit NTA-2-Puffer (NTA-1-Puffer mit 20mM Imidazol (Merck) gewaschen, um die unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 2,5ml NTA-3-Puffer (NTA-1-Puffer mit 250mM Imidazol). Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Für die Enzymmessungen musste im Anschluss ein Pufferwechsel vorgenommen werden. Dazu wurde das Eluat auf eine PD10-Säule (Amersham Bioscience) gegeben. Die Elution erfolgte mit 3ml Enzymlagerungspuffer (20mM TRIS/HCl pH8,7, 50mM KCl, 10% (v/v) Glycerin, 0,5mM NAD<sup>+</sup>).

Die Enzyme verloren bei 4°C oder -20°C ziemlich rasch an Aktivität. Die Bestimmung der enzymatischen Parameter musste daher unmittelbar nach der Aufreinigung erfolgen. Eine andere Möglichkeit war das Schockgefrieren der Enzyme in flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -80°C. Hier konnte auch nach über sechs Monaten kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

### SDS-PAGE

Mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine der Molmasse nach aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie-Blue sichtbar gemacht. Es wurde die Apparatur BV101 von Serva nach Herstellerangaben verwendet. Trenn- und Sammelgele waren wie in Tabelle 2.6 beschrieben zusammengesetzt.

**Tabelle 2.6: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele**

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Mix (Rothiphorese Gel-30, Roth)	5 ml	0,83 ml
Trenngelmix (562mM TRIS/HCl pH8.8; 0,15% (w/v) SDS, 25% (v/v) Glycerin)	10 ml	
Sammelgelmix (155mM TRIS/HCl pH6.8, 0,12% (w/v) SDS)		4,12 ml
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat, Roth)	80 µl	40 µl
TEMED (Roth)	10 µl	5 µl

## 32 MATERIAL UND METHODEN

Zum Start der Polymerisierungsreaktion wurde APS erst kurz vor dem Gießen des Gels dazugeben. Durch das beigeseetzte Glycerin im Trenngelmix, was für eine scharfe Phasentrennung sorgte, konnten Trenn- und Sammelgel direkt hintereinander gegossen werden. Das Gel polymerisierte ca. in einer halben Stunde.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer (62,5mM Natriumphosphat pH7.0, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und für 5min im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen konnten sie in die Taschen des Gels gegeben werden. Als Molmassenstandard wurden 10 $\mu$ l eines Protein *Molecular Weight*-Markers (MBI Fermentas #SM0431) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei RT in 1x SDS-Laufpuffer (25mM TRIS, 192mM Glycin, 1% (w/v) SDS) zunächst bei 150V bis die Bromphenolblaubande die Sammel-/Trenngel-Grenze erreicht hatte, dann bei 200V.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine im Gel durch eine Färbung mit Coomassie-Blue sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel zunächst 5min in 10% (v/v) Essigsäure mit 25% (v/v) Isopropanol fixiert und anschließend für mindestens 16h in 10% Essigsäure mit 60mg/l Coomassie-Blue G250 gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde durch 10% Essigsäure entfernt, bis klare Banden erkennbar waren. Zur Konservierung wurden die Gele zwischen Einmachfolie (Weck) im Vakuum (Gel Slap Dryer Modell 240, BioRad) getrocknet.

## 2.5 BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN PARAMETER

### Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität von UGD2-4 wurde bei einer Wellenlänge von 340nm als Zunahme von NADH photometrisch (Beckmann Photometer DU640) bestimmt. Die Messung erfolgte für eine Minute bei RT. Die Enzymreaktion wurde in Enzymtestpuffer (40mM TRIS/HCl pH8.7, 0,8mM EDTA, 16% (v/v) Glycerol, 0,8mM NaN<sub>3</sub>) durchgeführt und enthielt standardmäßig Enzym, UDP-Glucose und NAD<sup>+</sup>. Das Reaktionsvolumen betrug 1ml. Einem Enzymtestansatz wurde dabei so viel an aufgereinigtem Enzym zugegeben, dass die Änderung der optischen Dichte bei 340nm und gesättigtem Gehalt von UDP-Glucose und

NAD<sup>+</sup> 0,03 OD-Einheiten pro Minute betrug. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte gemäß dem Lambert-Beersche Gesetz nach folgender Formel:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot d \cdot \varepsilon}$$

c = Substratkonzentration [mol/l]

t = Zeit [min]

E = gemessene Extinktion

d = Küvettendicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient des Substrates bei der verwendeten Messwellenlänge [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]

### **K<sub>m</sub>-Wert-Bestimmung**

Zur Bestimmung der K<sub>m</sub>-Werte wurde in Standardenzymtestansätzen (siehe oben) zum einen eine gesättigte NAD<sup>+</sup>-Konzentration (500μM) in Kombination mit verschiedenen UDP-Glucose-Konzentrationen (10 bis 1500μM) verwendet, zum anderen eine konstante UDP-Glucose-Konzentration (2000μM) mit verschiedenen NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen (10 bis 1500μM). Bei der Aufnahme der Sättigungskurven wurde jeweils nur Enzym aus einer Protein-Präparation verwendet. Pro Messpunkt wurden dabei drei Messungen durchgeführt. Die Berechnung der K<sub>m</sub>-Werte erfolgte im Computerprogramm Microcal Origin 6.0G Professional. Dabei wurde mit Hilfe des *least-square* Algorithmus eine hyperbole Kurve durch alle Punkte einer Messreihe gelegt.

### **Hemmung durch UDP-Xylose**

Zur Untersuchung der Hemmstoffwirkung von UDP-Xylose auf UGD2, 3 und 4 wurden Sättigungskurven von UDP-Glucose in Gegenwart unterschiedlicher UDP-Xylose-Konzentrationen (25μM bis 350μM) aufgenommen. Pro Messpunkt wurden wieder drei Messungen durchgeführt und jeweils nur Enzym aus einer Proteinaufreinigung verwendet. Die K<sub>m</sub>-Werte der Sättigungskurven wurden wie oben beschrieben berechnet und gegen die Hemmstoffkonzentrationen grafisch aufgetragen. Die K<sub>i</sub>-Werte ergaben sich aus dem Betrag des x-Wertes am Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse.

### **Substratspezifität**

Für die Bestimmung der Substratspezifität von UGD2-4 wurden in Standardenzymtestansätzen (siehe oben) UDP-Glucose oder NAD<sup>+</sup> durch

alternative Substrate ersetzt. Alle Nukleotidzucker und Kofaktoren wurden dabei in einer Konzentration von 1mM eingesetzt.

### 2.6 PFLANZENANZUCHT

#### **Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana*-Samen**

Zur Oberflächensterilisation wurden die Samen für 2min in 100% Isopropanol geschwenkt. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und gegen 2,5% (v/v) Natrium-Hypochlorid mit 0,05% (v/v) Tween-20 (Fluka) ausgetauscht. In dieser Lösung wurden die Samen noch einmal für 15min bewegt. Danach wurde das Natrium-Hypochlorid durch viermaliges Waschen mit sterilem Wasser entfernt. Die Samen wurden schließlich in sterilem Wasser aufgenommen und zur Stratifizierung für etwa 24h bei 4°C gelagert.

#### **Sterile Anzucht auf MS-Medium mit Phytigel**

Zur sterilen Pflanzenanzucht wurden sterilisierte und bei 4°C stratifizierte Samen in Petrischalen mit MS-Medium (0,5x MS-Salze (Duchefa #M0245), 0,5% (w/v) Saccharose, 0,25% (w/v) Phytigel<sup>TM</sup> (Sigma), pH(KOH)5.7) gleichmäßig ausplattiert. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und in der Klimakammer (Luftfeuchte: ca. 50%, Temperatur: ca. 23°C, Licht: 80 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) im Kurztag (8h hell/16h dunkel) oder in völliger Dunkelheit inkubiert.

#### **Kultivierung von *Arabidopsis*-Pflanzen im Gewächshaus auf Erde**

Die Samen wurden auf Einheitserde ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Kurztag (8h hell/16h dunkel) oder im Langtag (< 12h hell).

### 2.7 HERSTELLUNG TRANSGENER *ARABIDOPSIS THALIANA*-PFLANZEN

#### **Transformation**

200ml YEP-Medium (10g/l Hefeextrakt, 10g/l Pepton, 5g/l NaCl) mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit 5ml einer Agrobakterien-Vorkultur

inokuliert und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien durch eine 10minütige Zentrifugation bei 6600g und RT sedimentiert und in 600ml einer 5% (w/v) Saccharoselösung mit 0,02% (v/v) Silwett-L77 (osi Specialties) rückgelöst. In diese Bakteriensuspension wurden für etwa 30s die Blütenstände der *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen getaucht. Die Pflanzen wurden anschließend für 24h in Mini-Treibhäusern zugedeckt (Luftfeuchte 100%) im Schwachlicht liegend gelagert. Dann konnten sie aufrecht stehend in der Klimakammer (Luftfeuchte: ca. 50% Temperatur: ca. 23°C Licht: 80 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) bis zur Samenreife gehalten werden. Die entstandenen Samen wurden gesammelt und getrocknet.

Alle in den Transformationen verwendeten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden im Gewächshaus auf Einheitserde unter Kurztagbedingungen (8h hell/16h dunkel) angezogen. Dazu wurden jeweils fünf Pflanzen in einen Topf (Ø 8cm) pikiert. Für eine Transformation wurden vier bis sechs dieser Töpfe eingesetzt. Zur Blüteninduktion wurden die Töpfe aus den Kurztag- in Langtag-Bedingungen (< 12h hell) gestellt. Die beste Transformationseffizienz ließ sich dann erreichen, wenn die Pflanzen ihre ersten Blütenstände entwickelt hatten und noch keine Schoten sichtbar waren.

### **Selektion**

Die gesammelten Samen der transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden auf ihre erworbene Resistenz hin selektioniert:

#### Selektion auf Kanamycin-Resistenz (kan<sup>R</sup>):

Die gesammelten Samen wurden sterilisiert, bei 4°C stratifiziert und auf sterilen Petrischalen mit MS-Medium mit 0,25% Phytigel und 50 $\mu$ g/ml Kanamycin (Duchefa) ausgelegt. Nach ca. 2 Wochen Inkubation in der Klimakammer ließen sich die transformierten vitalen, grünen Keimlinge von den nicht transformierten abgestorbenen unterscheiden. Die transformierten Keimlinge wurden auf Erde übertragen und bis zur Samenernte in der Anzuchtskammer gehalten.

#### Selektion auf Phosphinotricin-Resistenz (BASTA<sup>R</sup>):

Die gesammelten Samen wurden für 2min in 100% Isopropanol sterilisiert.

Anschließend wurden sie auf Einheitserde ausgesät und nach einer 24stündigen Inkubation bei 4°C ins Gewächshaus verbracht. Dort wurden sie bei 100% Luftfeuchte zum Keimen gebracht. Ab einem Alter von ca. 5 Tage wurden die Keimlinge alle zwei bis drei Tage mit einer 0,3mM Lösung Glufosinat (WeedEx, Celaflor) besprüht. Nach zwei Wochen ließen sich die transformierten vitalen, grünen Keimlinge von den nicht transformierten, abgestorbenen Pflanzen unterscheiden. Die transformierten Keimlinge wurden in einzelne Töpfe pikiert. Von diesen Pflanzen wurden die Samen gesammelt.

### 2.8 GUS-REPORTERGEN-ANALYSE

#### Herstellung transgener Pflanzen mit Promotor::GUS-Konstrukt

Um die Expressionorte und -zeitpunkte der vier *UGD*-Gene in *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden transgene Pflanzen verwendet, die ein Promotor::GUS-Reportergenkonstrukt enthielten. Bei diesen Konstrukten waren die entsprechenden Promotoren der *UGD*-Gene vor das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) - Gen (*nidA*-Gen) aus *E. coli* kloniert worden. Dabei wurde darauf geachtet, das die Promotorfragmente die komplette 5'-UTR enthielten. Zur Untersuchung der Expression der Gene *UGD1*, *UGD2* und *UGD3* lagen bereits transgene Pflanzenlinien mit entsprechenden Promotor::GUS-Konstrukten vor (Hinterberg *et al.* (2002) und Christoph Klos). Für *UGD4* musste im Rahmen dieser Arbeit eine neue transgene Linie generiert werden. Dazu wurde mittels PCR (Primer: *UGD4*<sub>promfwd</sub>XhoI: 5'-ACCTCGAGA CGATATTGCCCATGTCT-3' und *UGD4*<sub>promrev</sub>Cfr9I: 5'-ATCCCGGGTC CAGCTCCAATACAACAG-3') der *UGD4*-Promotor inklusive 5'-UTR amplifiziert (Als Matrize diente genomische DNA von *Arabidopsis thaliana*.) und über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Cfr*9I in den Pflanzenvektor pGreenGUS 101.3 vor das *nidA*-Gen kloniert. Das fertige Konstrukt wurde über *Agrobacterium* vermittelte Transformation in *Arabidopsis thaliana* Col-0 gebracht. Nach erfolgreicher Selektion auf BASTA<sup>R</sup> wurden die Samen der heterozygoten F1-Generation für die Expressionsstudien verwendet.

**Durchführung der GUS-Färbereaktion (Jefferson, 1987)**

Die zu untersuchenden Pflanzenteile wurden in Färbelösung (100mM Natriumphosphat pH7-7.5, 10mM EDTA, 0,5% (v/v) Triton X-100 (Calbiochem), 0,5mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 0,5mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 1mM X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure) gegeben und 15min im Vakuum infiltriert. Anschließend wurden sie solange bei 37°C inkubiert, bis eine Blaufärbung erkennbar war. Dies konnte je nach Reportergenpflanze und Gewebetyp zwischen 5min und 24h dauern. Um die Reaktion abzustoppen und das Chlorophyll zu entfernen, wurde die Färbelösung gegen 70% (v/v) Ethanol ausgetauscht. Die gefärbten Pflanzenteile konnten in der Ethanol-Lösung dauerhaft gelagert werden.

**Analyse der gefärbten Pflanzenteile**

Die vollständig vom Chlorophyll befreiten, gefärbten Keimlinge wurden unter einem Binokular (Leica MZFL III mit angeschlossenen Schott KL1500LCD) analysiert und digital fotografiert (Canon PowerShot S40).

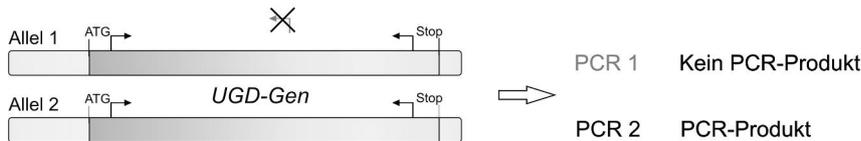
**2.9 ISOLIERUNG HOMOZYGOTER *KNOCK OUT*-MUTANTEN****Suche nach homozygoten knock out-Mutanten**

Um nähere Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen UGD-Isoformen innerhalb der Zellwandbiosynthese zu gewinnen, wurden verschiedene *Arabidopsis thaliana*-Mutanten untersucht, bei denen jeweils eine UGD-Isoform durch eine T-DNA-Insertion ausgeschaltet war. Die Samen dieser *knock out*-Linien wurden vom NASC (European Arabidopsis Stock Center) bezogen. In Tabelle 2.3 sind die einzelnen verwendeten *knock out*-Mutantenlinien aufgelistet. Die vom NASC bereitgestellte Samenmischung war heterozygot, d.h. eine homozygote Mutante musste erst isoliert werden.

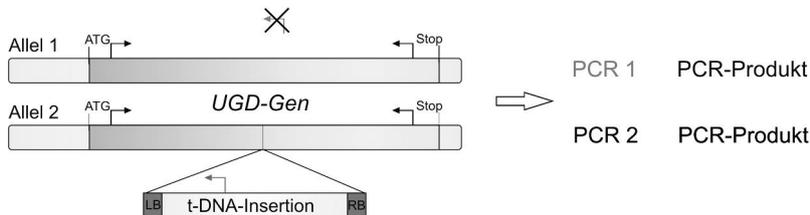
Für die Suche nach homozygoten *knock out*-Pflanzen wurden die Samenmischungen auf Einheitserde im Gewächshaus ausgesät. Anschließend wurde aus den Blättern der erhaltenen Pflanzen genomische DNA isoliert. Jeweils 1 $\mu$ l der DNA wurde in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Pro DNA wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt (Abb.2.1). In einer ersten PCR wurde überprüft, ob eine T-DNA-Insertion im Gen vorhanden war, indem ein

genspezifischer (schwarz) und ein T-DNA-spezifischer Primer (grau) verwendet wurden. In einer zweiten PCR wurde anschließend überprüft, ob sich die Insertion auf beiden (homozygot, C) oder nur auf einem Allel (heterozygot, B) befand, indem ein die Insertion überspannendes genspezifisches Primerpaar (schwarz) verwendet wurde.

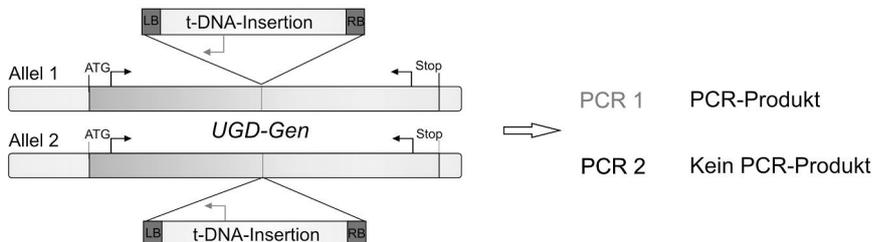
### A Wildtyp



### B heterozygote Mutante



### C homozygote Mutante



#### Abbildung 2.1:

#### Schematische Übersicht über die durchgeführten PCR-Reaktionen zur Identifikation der homozygoten knock-out-Mutanten

Dargestellt sind jeweils beide Allele eines *UGD*-Gens in einer Wildtyp-Pflanze (A), in einer heterozygoten *knock-out* Mutante (B) und in einer homozygoten *knock-out* Mutante (C). Die schwarzen Pfeile symbolisieren die genspezifischen Primer, der graue Pfeil gibt den T-DNA-spezifischen Primer an.

Lag die Insertion homozygot vor, so war kein PCR-Produkt zu erwarten, da die Fragmentgröße (T-DNA: ca. 4,5 bis 7,5kb + Genfragment: ca. 1kb = Fragmentgesamtlänge: 5,5 bis 8,5kb) zu groß war, um von der *Taq*-Polymerase erfolgreich amplifiziert zu werden. War jedoch noch eine intakte Genkopie vorhanden, so ließ sich ein Fragment nachweisen, welches die gleiche Größe hatte

wie das entsprechende Fragment beim Wildtyp.

Die Samen der homozygot getesteten Pflanzen wurden gesammelt und in den Experimenten verwendet. Die Tabellen 2.7 und 2.8 zeigen, welche Primer verwendet wurden und geben Aufschluss darüber, in welcher Kombination und zu welchem Zweck sie eingesetzt wurden.

**Tabelle 2.7: Übersicht über die Primerkombinationen, die zur Suche von homozygoten knock out-Mutanten verwendet wurden**

Primerkombination	Fragmentgröße	Verwendungszweck
GarlicLB3 x At1g26570rev_1566	1166bp	Nachweis der T-DNA-Insertion im <i>UGD1</i> -Gen der Mutante Garlic_347_B03_21. Die Primer binden im <i>left-border</i> -Bereich der T-DNA und im Promotorbereich des <i>UGD1</i> -Gens.
SALKLB_470 x koT1K7rev	1300bp	Nachweis der T-DNA-Insertion im <i>UGD1</i> -Gen der Mutante SALK_025303. Die Primer binden im <i>left-border</i> -Bereich der T-DNA und am 3'-Ende des <i>UGD1</i> -Gens.
koT1K7fwd x koT1K7rev	1423bp	Nachweis mindestens einer intakten Kopie von <i>UGD1</i> durch ein die mögliche Insertion überspannendes Primerpaar. Die Primer binden am 5'- und im 3'-Ende des <i>UGD1</i> -Gens.
GarlicLB3 x At3g29630_rev_-1636	1100bp	Nachweis der T-DNA-Insertion im <i>UGD2</i> -Gen der Mutante Garlic_1144_F10. Die Primer binden im <i>left-border</i> -Bereich der T-DNA und am 3'-Ende des <i>UGD2</i> -Gens.
UGD2_480_Muo_fwd x Muo10_rev_+751	1200bp	Nachweis mindestens einer intakten Kopie von <i>UGD2</i> durch ein die mögliche Insertion überspannendes Primerpaar. Die Primer binden am 5'- und im 3'-Ende des <i>UGD2</i> -Gens.
UGD3-30_T20K14fwd x SALKLB_470	1200bp	Nachweis der T-DNA-Insertion im <i>UGD3</i> -Gen der Mutante SALK_006234. Die Primer binden im <i>left-border</i> -Bereich der T-DNA und am 5'-Ende des <i>UGD3</i> -Gens.
koT20K14fwd x koT20K14rev	1370bp	Nachweis mindestens einer intakten Kopie von <i>UGD3</i> durch ein die mögliche Insertion überspannendes Primerpaar. Die Primer binden am 5'- und im 3'-Ende des <i>UGD3</i> -Gens.
JL_202 x koUGD4_884fwd	1100bp	Nachweis der T-DNA-Insertion im <i>UGD4</i> -Gen der Mutante Wisconsin 9C40. Die Primer binden im <i>left-border</i> -Bereich der T-DNA und im Promotorbereich des <i>UGD4</i> -Gens.
koUGD4_884fwd x koUGD4_2411rev	1300bp	Nachweis mindestens einer intakten Kopie von <i>UGD4</i> durch ein die mögliche Insertion überspannendes Primerpaar. Die Primer binden am 5'- und im 3'-Ende des <i>UGD4</i> -Gens.

**Tabelle 2.8: Auflistung aller Primer, die bei der Suche nach homozygoten, funktionellen knock out-Mutanten eingesetzt wurden**

Primer	Sequenz
At1g26570rev_1566	5'-AGCTAAGGCAGATTCAGCAAATACAT-3'
At3g29630rev_-1636	5'-CAAAATTGAAGCGACATTTGTCGA-3'
GarlicLB3	5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC-3'
JL_202	5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC-3'
koT1K7fwd	5'-TGAAGATATGCTGCATAGGAGCTGGTTAT-3'
koT1K7rev	5'-ATCCITGAGCCATGAATCAAGCGGTTTAC-3'
koT20K14fwd	5'-GTCCAACCATGGCTGTCATTGCTCTAAAG-3'
koT20K14rev	5'-GGTCCAATGGCTTACCAATGGAGTAAACA-3'
koUGD4_2411rev	5'-GGGTCAAAGTGGCTTACCAAT-3'
koUGD4_884fwd	5'-TCCTTGCACACCAAGTGTTTC-3'
Muo10_rev_+751	5'-AACCGCGTAAGACACTTGCCT-3'
SALK_LB470	5'-GCACCTCGACCCCAAAAAACT-3'
UGD2_480_Muo_fwd	5'-CTCTGGTTCGGTCAGGGGCAA-3'
UGD2cDNA-fwd	5'-AACACACCGACTAAGACTAGAG-3'
UGD2cDNA-rev	5'-TAGCTTTTGCAGATTCATAATGTTTC-3'
UGD3-30_T20K14fwd	5'-CAGGAGGTGATTCAGTTTACAAGCAA-3'
UGD4_BspTI_neu	5'-GCACCTAAGTGTCCAGATATTGAAGTGCC-3'

### Kreuzung von *Arabidopsis thaliana* zur Herstellung von Doppelknock out-Mutanten (nach Weigel & Glazebrook, 2002)

Um *Arabidopsis thaliana*-Mutanten zu erhalten, bei denen zwei *UGD*-Isoformen gleichzeitig ausgeschaltet waren, wurden Mutanten-Linien, bei denen eine der *UGD*-Isoformen homozygot zerstört war, untereinander gekreuzt. Gekreuzt wurde die Linie Wisconsin 9640  $\Delta UGD4$  L1-7 in die Linie Garlic 347\_B03\_21  $\Delta UGD1$  L1-1 und die Linie SALK\_006234  $\Delta UGD3$  L4-1 in die Linie Garlic 1144F10  $\Delta UGD2$  L1-11. Dazu wurden die Pflanzen im Gewächshaus auf Einheitserde ausgesät und im Langtag bis zur Blüte angezogen. Zur Durchführung der Kreuzung wurden bei Pflanzen des einen Genotyps („Empfänger“) Knospen ausgewählt, bei denen die Spitzen der weißen Kelchblätter schon zu sehen waren, die Knospen jedoch noch nicht aufgeblüht waren. Bei Pflanzen des anderen Genotyps („Bestäuber“) wurden voll aufgeblühte Blüten mit reifem Pollen verwendet. An den Knospen des „Empfängers“ wurden Kron-, Kelch- und Staubblätter mit einer feinen Pinzette entfernt, so dass nur noch der Stempel vorhanden war. Dieser wurde dann manuell mit Pollen von

Pflanzen des „Bestäubers“ bestäubt. Um eine Austrocknung, hervorgerufen durch das Fehlen der schützenden Blütenblätter, zu verhindern, wurde der Stempel anschließend mit Zellophanfolie umwickelt. Es entwickelte sich im Idealfall eine Schote. Die Samen dieser Schote (F1-Generation) wurden gesammelt und ausgesät. Anschließend wurden die sich entwickelnden Pflanzen auf den Erfolg der Kreuzung hin überprüft. Dazu wurde aus den Blättern genomische DNA isoliert und mittels PCR, durch den Einsatz eines genspezifischen und eines T-DNA-spezifischen Primers (siehe Abb.2.1 und Tab.2.8) auf das Vorhandensein der T-DNA-Insertionen in beiden *UGD*-Genen überprüft. Von Pflanzen, in denen beide Insertionen nachgewiesen werden konnten, wurden die Samen gesammelt (F2-Generation) und erneut ausgesät. Wieder wurde aus den Blättern der sich entwickelnden Pflanzen die genomische DNA isoliert. In der F2-Generation waren nach Mendel neben Wildtyp-, heterozygoten und einfach homozygoten Pflanzen nun auch doppelt homozygote Pflanzen zu erwarten, und zwar in einem Verhältnis 9:3:3:1. Der Nachweis erfolgte mittels PCR mit den oben genannten Primerkombinationen (Tab.2.7 und 2.8). Die Samen der doppelt homozygot getesteten Pflanzen wurden gesammelt und für anschließende Experimente verwendet.

### **Nachweis der tatsächlichen Funktionalität der knock outs bei den Mutanten**

Die über PCR auf der Basis genomischer DNA ermittelten homozygoten *knock out*-Mutanten wurden im Anschluss noch einmal auf tatsächliche Funktionalität des *knock outs* überprüft, indem kontrolliert wurde, ob in den Pflanzen noch mRNA des ausgeschalteten Gens nachweisbar war. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus Blättern isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde jede cDNA mittels PCR überprüft. Dabei sollten die cDNAs aller *UGD*-Isoformen bis auf die des ausgeschalteten Gens nachweisbar sein. Für die PCR-Reaktionen wurden die gleichen Primerkombinationen verwendet wie zur Suche nach homozygoten *knock out*-Mutanten (Tab.2.8), mit Ausnahme der Primerkombinationen zum Nachweis von *UGD2*- und *UGD4*-cDNA. Zum Nachweis der *UGD2*-cDNA wurde die PrimerUGD2cdna-fwd und –rev verwendet, zum Nachweis der *UGD4*-cDNA koUGD4\_2411rev und

UGD4\_Bsp<sup>TI</sup>\_neu. Grund hierfür war, dass die bei der Suche nach homozygoten *knock out*-Mutanten verwendeten Vorwärts-Primer UGD2\_480\_Muo\_fwd und koUGD4\_884fwd nicht innerhalb des offenen Leserahmens, sondern im Promotorbereich der Gene banden und deshalb zum Nachweis von cDNA nicht geeignet waren. Alle verwendeten Primerkombinationen waren außerdem isoformspezifisch, d.h. es konnte pro Kombination nur die cDNA einer bestimmten Isoform nachgewiesen werden. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Mutantenlinien zu ermöglichen, wurde in jede PCR-Reaktion die gleiche Menge cDNA eingesetzt. Als Kontrolle diente cDNA aus Wildtyppflanzen *Arabidopsis thaliana* Col-0. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte über die Auftrennung in einem 1%igem Agarosegel.

## 2.10 UNTERSUCHUNG DER STOMATA VON *KNOCK OUT*-MUTANTEN

### Bestimmung des Wasserverlustes (nach Klein et al., 2004)

Für die Bestimmung des Wasserverlustes wurden in jeweils drei Schalen mit gesiebter Einheitserde vier Wildtyp- und vier *knock out*-Mutantenpflanzen abwechselnd ausgesät (Abb.2.2) und im Kurztag in der Klimakammer (Luftfeuchte: ca. 50%, Temperatur: ca. 23°C, Licht: 80µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) angezogen.



**Abbildung 2.2:**

**Aussaatschema für Pflanzen, die zur Bestimmung des Wasserverlustes eingesetzt wurden.**

Dargestellt ist eine Anzuchtsschale. WT= Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Col-0 oder WS-2; k.o.= *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD1$ ,  $\Delta UGD4$  oder  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$

Nach vier Wochen wurden die Blattrosetten von den Wurzeln getrennt und ihr Frischgewicht bestimmt. Anschließend wurden die Blattrosetten bei einer Temperatur von 22-24°C und einer Luftfeuchte von 28-31% auf der Laborbank gelagert. Fünf Stunden lang wurde in einem Abstand von einer Stunde jeweils das Gewicht der Blattrosetten bestimmt. Der Wasserverlust wurde anschließend als % des ursprünglichen Frischgewichtes bezogen auf die Zeit grafisch aufgetragen.

### **Bestimmung der Stomataöffnung (nach Klein et al., 2004)**

Zur Bestimmung der Stomataöffnung wurden Pflanzen in jeweils drei Schalen mit gesiebter Einheitserde ausgesät. Dabei enthielt jede Schale sowohl Pflanzen des Wildtyps *Arabidopsis thaliana* Col-0 als auch Pflanzen der *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD1$  oder  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ . Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag in der Klimakammer angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge für 16h dunkel adaptiert. Um die Öffnung der Stomata zu induzieren, wurden die Pflanzen zunächst für 2,5h in 20mM KCl, 0,5% CaCl<sub>2</sub> im Licht inkubiert. Im Anschluss wurde ein Nagellackabzug der oberen Epidermis der Keimblätter hergestellt. Dieser wurde dann auf einen Objektträger befestigt. Unter dem Lichtmikroskop wurden Breite und Länge der Stomata bestimmt. Pro Genotyp wurden mindestens 70 Stomata unterschiedlicher Blätter ausgezählt. Dafür waren zuvor Mischproben mit mindestens fünf Keimlingen pro Anzuchtsschale genommen worden.

## **2.11 UNTERSUCHUNG DER ZELLWÄNDE VON *KNOCK OUT*-MUTANTEN**

### **Zellwandpräparation**

Die Zellwandpräparation erfolgte nach einer abgewandelten Methode von Fry (1988), bei der alle in 70% (v/v) Ethanol unlöslichen Reste als Zellwand definiert werden. Pro Probe wurden für die MALDI-TOF MS-Analysen jeweils 15 Keimlinge, für die HPLC-Analysen etwa 200mg Pflanzenmaterial gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, pulverisiert (mit rostfreien Edstahlkugeln (Ø 5mm) von VWR in einer Schwingmühle Retsch MM200, 3x 1min mit einer Frequenz von 30Hz) und in 1ml 70% (v/v) Ethanol rückgelöst. Um die Metallkugeln zu entfernen wurde die Suspension in ein neues Gefäß übertragen und anschließend für 10min bei 13000rpm (Biofuge *pico*, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment für die MALDI-TOF MS-Analysen zweimal, für die HPLC-Analysen viermal mit 1ml Chloroform/Methanol (1:1) gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschstreitte mit Aceton, bevor das Sediment im Vakuum getrocknet wurde.

**Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) zur Bestimmung der Xyloglucanzusammensetzung (nach Lerouxel et al., 2002)**

Für die MALDI-TOF MS-Analysen wurden sechs Tage alte, steril im Licht angezogene Keimlinge verwendet. Die Zellwand wurde wie oben beschrieben isoliert. Als nächstes erfolgte der Verdau der Zellwand mit 1U Xyloglucan-*endo*glucanase XEG in 40mM Ammoniumformiatpuffer pH 5.0 (Endvolumen 50µl) für 4h bei 37°C unter leichter Bewegung. Anschließend wurde für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 5-10 Biorex MSZ 501 Kationentauscherkugeln (Bio-Rad) dazugegeben. Nach 15min wurde der Überstand abgenommen und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

**Tabelle 2.9: Nominale Massen, Kompositionen und putative Strukturen von Xyloglucanfragmenten bei MALDI-TOF MS-Analysen (Tabelle nach Lerouxel et al., 2002)**

<sup>a</sup> Nominale Masse der Xyloglucanfragmente [M+Na]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Hex = Hexose, Pen = Pentose, Dox = Deoxyhexose, OAc = O-Acetyl-Substituent

<sup>c</sup> nach Pauly *et al.* (2001), Nomenklatur nach Fry *et al.* (1993), nähere Erläuterung zur Verwendung der Nomenklatur siehe Kapitel 1.2

Nominale Masse <sup>a</sup>	Komposition <sup>b</sup>	Putative Struktur <sup>c</sup>
791,233	Hex <sub>3</sub> Pen <sub>2</sub>	XXG
953,286	Hex <sub>4</sub> Pen <sub>2</sub>	GXXG
1085,328	Hex <sub>4</sub> Pen <sub>3</sub>	XXXG
1247,381	Hex <sub>5</sub> Pen <sub>3</sub>	XXLG/XLXG
1289,391	Hex <sub>5</sub> Pen <sub>3</sub> OAc <sub>1</sub>	XXLG/XLXG + 1 OAc
1393,439	Hex <sub>5</sub> Pen <sub>3</sub> Dox <sub>1</sub>	XXFG
1435,449	Hex <sub>5</sub> Pen <sub>3</sub> Dox <sub>1</sub> OAc <sub>1</sub>	XXFG + 1 OAc
1555,491	Hex <sub>6</sub> Pen <sub>3</sub> Dox <sub>1</sub>	XLFG
1597,502	Hex <sub>6</sub> Pen <sub>3</sub> Dox <sub>1</sub> OAc <sub>1</sub>	XLFG + 1 OAc

Die Messung der molekularen Massen der Xyloglucanfragmente erfolgte an einer Voyager DE STR *Biospectrometry Workstation* (Applied Biosystems). Dazu wurden die Überstände aus dem Verdau 1:1 (v/v) mit einer DHBS-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure; 20mg/ml, gelöst in 30% (v/v) Acetonitril) gemischt und auf eine Metallplatte gespottet. Die Spektren wurden im *negative reflectron mode* bei 20000V und einer *extraction delay time* von 150ns aufgenommen. Das Spektrum

einer Probe setzte sich dabei aus den Spektren von 10 verschiedenen Messpunkten zusammen. An jedem Messpunkt wurden mit dem Laser 50 Schuss abgegeben. Pro untersuchtem Genotyp wurden jeweils zehn unabhängige Zellwandpräparationen in die Messungen eingesetzt. Durch den Vergleich der erhaltenen Spektren mit Daten aus der Literatur (Lerouxel *et al.*, 2002) konnten die einzelnen Ionensignale eindeutig bestimmten Xyloglucanfragmenten zugeordnet werden (Tab.2.9). Zur Auswertung der Spektren wurden die Flächen unterhalb der einzelnen Ionensignale bestimmt und anschließend zur Gesamtfläche unterhalb aller Ionensignale in Relation gesetzt.

### **HPLC-Analysen**

Für die HPLC-Analysen wurden sechs Tage alte, steril im Licht angezogene Keimlinge verwendet. Die Zellwand wurde wie oben beschrieben isoliert. Im Anschluss wurde die isolierte Zellwand verdaut. Dazu wurde sie zunächst in 800µl 250mM Natriumacetat pH4.0 rückgelöst, für 20min auf 80°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurde der pH-Wert mit 1M Natronlauge auf pH5.0 eingestellt. Nach der Zugabe von Natriumazid (0,01% Endkonzentration) und je 0,5mg  $\alpha$ -Amylase (Sigma) und Pullulanase (aus *Bacillus acidopullulyticus* von Sigma) wurde die Zellwand über Nacht bei 37°C unter leichter Bewegung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Suspension 10min im Wasserbad gekocht und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde sie für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Es folgten vier Waschschrte mit Wasser, um die bei dem Verdau freigewordenen Hexosen zu entfernen. Der Erfolg der Waschschrte wurde in einem Anthron-Test (s.u.) überprüft. Das Sediment wurde schließlich im Vakuum getrocknet. Als letzter Schritt der Zellwandaufarbeitung erfolgte eine Hydrolyse. Dazu wurden zu je 3mg Zellwand 50µg *myo*-Inosit (Duchefa) als interner Standard gegeben und anschließend in 250µl 2M TFA (Trifluoressigsäure, Fluka) für eine Stunde bei 121°C hydrolysiert. Die Proben wurden bei 40°C durch Begasung mit Luft evaporiert. Im Anschluss wurde dreimal mit jeweils 300µl Isopropanol gewaschen und zwischendurch immer wieder evaporiert. Nach dem letzten Evaporationsschritt wurde die Zellwand bis zur Verwendung in der HPLC-Analyse bei -80°C gelagert.

Die hydrolysierten Zellwandproben wurden in jeweils 1ml Wasser pro 3mg

Zellwand rückgelöst. Diese Lösung wurde noch einmal 1:10 mit Wasser verdünnt und über Micro-Spin© Filter Tubes (#24137, Alltech) filtriert. Jeweils 10µl der gefilterten Zuckerlösung wurden über eine HPLC-Säule aufgetrennt. Das verwendete HPLC-Gerät stammte von der Firma Dionex BioLC und enthielt einen ED50 *Electrochemical Detector*, eine GS50 *Gradient pump* und einen AS50 *Autosampler*. Die Auftrennung erfolgte über eine CarboPac™ PA20 Guard 3x30 mm Vorsäule und eine CarboPac™ PA20 Analytical 3x150 mm Säule. Das Gerät wurde mit einer Durchflussrate von 0,5ml min<sup>-1</sup> unter Verwendung des folgenden Programms betrieben (Tab.2.10).

**Tabelle 2.10: Verwendetes HPLC-Programm zur Zuckerauftrennung**

Zeit (min)	Eluent		
	200 mM NaOH	10 mM NaOH	
- 25	100 %	0 %	Regeneration
- 15,05	100 %	0 %	
- 15	0 %	100 %	Equilibrierung
0	0 %	100 %	Probeninjektion
12	0 %	100 %	Laufende

Um die erhaltenen Peaks der HPLC-Diagramme eindeutig zuordnen zu können, wurden 10mM Zucker-Stammlösungen der zu erwartenden Zucker (Arabinose, Glucose, Xylose, Galactose, Fucose und Rhamnose) hergestellt und jeweils in einer Konzentration von 0,1mM auf die HPLC aufgetragen. Jedem Zucker konnte so eine bestimmte Retentionszeit zugeordnet werden, anhand derer die einzelnen Zucker der Zellwandproben eindeutig identifiziert werden konnten. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden pro untersuchten Genotyp jeweils fünf unabhängige Zellwandpräparationen in die HPLC-Messungen eingesetzt. Es erfolgte pro Zellwandpräparation eine Messung an der HPLC. Zur Auswertung der HPLC-Diagramme wurde die Fläche unter den Zuckerpeaks bestimmt und die Peakflächen anschließend zueinander in Relation gesetzt. Dabei wurde die Summe aller gemessener Zucker gleich 100% gesetzt.

**Anthron-Test zum Nachweis von Hexosen (nach Dische & Borenfreund, 1951)**

100µl Zellwand wurden mit 200µl Anthron-Reagenz (0,2% (w/v) Anthron in konzentrierter Schwefelsäure) gemischt, 5min gekocht und anschließend im Photometer (Hitachi U-1100) bei 620nm gemessen. Der endgültige Hexosegehalt wurde mit Hilfe einer Glucose-Standard-Eichkurve bestimmt.

**2.12 VERWENDETE SOFTWARE**

Folgende Computersoftware wurde für diese Arbeit verwendet:

Berechnen des Molekulargewichts von Proteinen:

[http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)

Sequenzanalysen und Alignments:

ClustalX2 1.81, GENEDOC 2.6.002 und Dendroscope 2.3 (Huson *et al.*, 2007)

Statistische und graphische Auswertung von Messdaten:

Microsoft Exel 2002 und Statistica 6.0

Bestimmung der enzymatischen Parameter:

Microcal Origin 6.0G Professional

Bearbeitung von Digitalfotos und Erstellen von Grafiken:

Adobe Photoshop 8.0.1 und Corel Draw 10 und X3

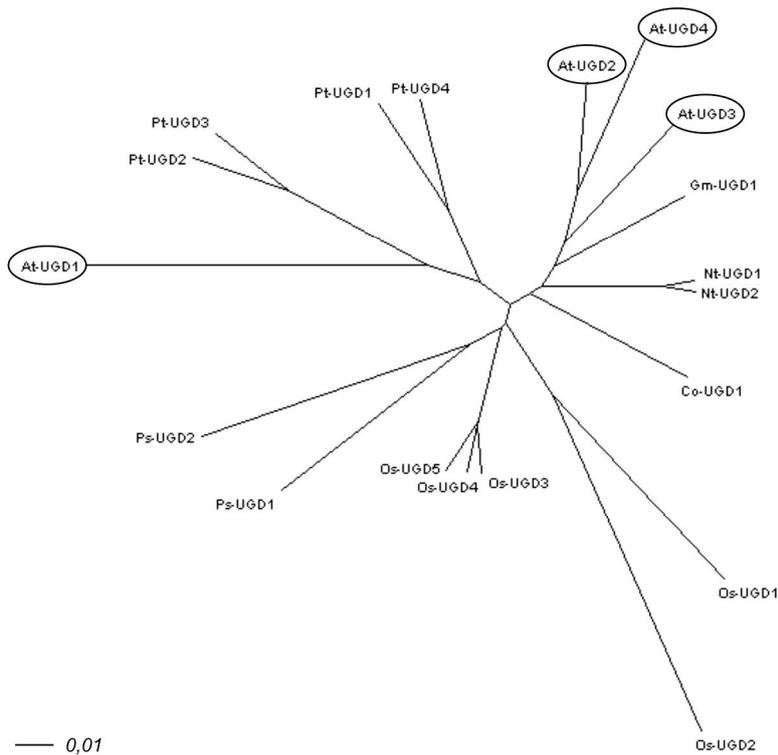


## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 DIE VIER *UGD*-GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Mit Hilfe der durch das *Arabidopsis* Genom-Projekt und verschiedenen EST-Datenbanken zur Verfügung stehenden Daten (<http://www.arabidopsis.org>) konnten im Rahmen dieser Arbeit im Genom von *Arabidopsis thaliana* vier Gene identifiziert werden, die potentiell für UDP-Glucose Dehydrogenasen codieren: *UGD1* (At1g26570), *UGD2* (At3g29360), *UGD3* (At5g15490) und *UGD4* (At5g39320). Alle Gene enthalten ein Intron unterschiedlicher Länge im Bereich der 5'-UTR. Die offenen Leserahmen selbst sind ohne weitere Introns und 1446bp (*UGD1*) bzw. 1443bp (*UGD2-4*) groß. Ein fünftes, als Pseudogen identifiziertes Gen, befindet sich am äußersten Rand von Chromosom 3 an Position At3g01010. Sein offener Leserahmen ist nur 474 bp lang und damit um rund zwei Drittel kürzer als die Leserahmen der anderen vier *UGD*-Gene. Sequenzvergleiche zeigten, dass es sich um den Anfang eines *UGD*-Gens handeln könnte, allerdings liegt die Homologie zu den ersten 474 bp der anderen *UGD*-Gene bei nur etwa 30%.

Die Gene *UGD1*, 2, 3 und 4 codieren für sehr ähnliche Proteine mit einer Länge von 480 (*UGD2-4*) bis 481 (*UGD1*) Aminosäuren und einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 53kDa. Dabei ist die Homologie zwischen *UGD2*, 3 und 4 sehr hoch (89-92%), während sich *UGD1* in seiner Aminosäuresequenz von den anderen Isoformen unterscheidet (Homologie 82-84%). Besonders deutlich wird dieser Unterschied, wenn man die Aminosäuresequenzen der vier *UGD*-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* mit denen anderer bekannter, pflanzlicher UDP-Glucose Dehydrogenasen vergleicht. Dazu wurde mit Hilfe der Computerprogramme ClustalX2 und Dendroscope 2.3 ein *bootstrapped neighbour-joining tree* erstellt (Abb.3.1). Laut Stammbaum sind *UGD2*, 3 und 4 nahe verwandt und clustern mit *Gm-UGD1* aus *Glycine max*. Hingegen befindet sich *UGD1* auf einem ganz anderen Zweig und clustert mit den vier *UGD*-Isoformen aus *Populus trichocarpa*. Analog dazu zeigen die fünf *UGD*-Isoformen aus Reis (*Oryza sativa*) ein ähnliches Muster. Auch hier clustern jeweils drei bzw. zwei Isoformen. Die *UGD*-



**Abbildung 3.1:**

**Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* mit Sequenzen anderer pflanzlicher UDP-Glucose Dehydrogenasen**

Der *bootstrapped neighbour-joining tree* wurde mit ClustalX2 und Dendroscope 2.3 erstellt.

At-UGD1-4: *Arabidopsis thaliana* (diese Arbeit); Co-UGD1: *Cinnamomum osmophloeum* gi|40317278; Gm-UGD1: *Glycine max* gi|6136119; Nt-UGD1: *Nicotiana tabacum* gi|48093457; Nt-UGD2: *Nicotiana tabacum* gi|48093459; Ps-UGD1: *Pinus taeda* Unigene Pta.24139; Ps-UGD2: *Pinus taeda* Unigene Pta.8150; Os-UGD1: *Oryza sativa* Os03g31210; Os-UGD2: *Oryza sativa* Os03g40720; Os-UGD3: *Oryza sativa* Os03g55070; Os-UGD4: *Oryza sativa* Os12g25690; Os-UGD5: *Oryza sativa* Os12g25700; Pt-UGD1: *Populus trichocarpa* eugene3.00041110; Pt-UGD2: *Populus trichocarpa* eugene3.00101501; Pt-UGD3: *Populus trichocarpa* estExt\_fgenesh4\_pm.C\_LG\_VIII0382; Pt-UGD4: *Populus trichocarpa* estExt\_fgenesh4\_pm.C\_LG\_XVII0156

Isoformen aus *Nicotiana tobaccum*, *Pinus taeda* und *Populus trichocarpa* sind dagegen jeweils nahe miteinander verwandt und clustern zusammen.

Ein multiples *Alignment* und anschließende Sequenzvergleiche zeigten, dass sich Aminosäurereste, die bei der UGD aus *Streptococcus pyogenes* (Campbell *et al.*, 2000) bzw. der humanen UGD (Sommer *et al.*, 2004) sowohl für die Substratbindung als auch für die Katalyse und die Hexamerbildung essentiell zu sein scheinen (siehe Kapitel 1.4), bei allen UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* finden lassen (Abb.3.2; gelb markierte Aminosäurereste). So sitzt an Position 272 jeweils ein Cysteinrest, der Cys260 der UGD aus *Streptococcus* bzw. Cys276 der menschlichen UGD entsprechen könnte.

```

UGD1 : ---MVKICCI GAGYVGGPTMAVIALKCPDVEVAVVDISVPRINAWNSDRLPIIYEPGLE : 55
UGD2 : ---MVKICCI GAGYVGGPTMAVIALKCPDVEVAVVDISVPRINAWNSDRLPIIYEPGLD : 55
UGD3 : ---MVKICCI GAGYVGGPTMAVIALKCPDVEVAVVDISVPRINAWNSDRLPIIYEPGLD : 55
UGD4 : ---MVKICCI GAGYVGGPTMAVIALKCPDIEVAVVDISVPRINAWNSDRLPIIYEPGLD : 55
H. s. UGD : MFEIKKICCI GAGYVGGPTCSVIAHMCPEIRVTVVDVNESRINAWNSPTLPIIYEPGLK : 58
S. p. UGD : ----MKIAVA GSGYVG ---LSLGV LSLQNEVTIIVDILPSKVDKINNGLSPTQDEYIE : 51

UGD1 : DVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVFE S D I V F V S V N T P T K T Q C L G A C K A A D L T Y W E S A A R M I : 113
UGD2 : DVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVRE A D I V F V S V N T P T K T R C L G A C K A A D L T Y W E S A A R M I : 113
UGD3 : DVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVRE A D I V F V S V N T P T K T R C L G A C K A A D L T Y W E S A A R M I : 113
UGD4 : D I V K Q C R G K N L F F S T D V E K H V R E A D I V F V S V N T P T K T T C L G A C K A A D L T Y W E S A A R M I : 113
H. s. UGD : E V V E S C R G K N L F F S T N I D D A I K E A D L V F I S V N T P T K T Y C M C K C R A A D L K Y T E A C A R R I : 116
S. p. UGD : Y Y L K S K Q - L S I K A T L D S K A A Y K E A E L V I I A T P T N Y N S R - - - - I N Y F D T Q H V E T V I K E V : 104

UGD1 : A D V S K S S K I V V E K S T V P W R T A B A I E K I L T H N S K - G I E F O I L S N P E F L A E G T A I K D L Y N : 170
UGD2 : A D V S V S D K I V V E K S T V P W K T A B A I E K I L T H N S K - G I K F O I L S N P E F L A E G T A I K D L F N : 170
UGD3 : A D V S V S D K I V V E K S T V P W K T A B A I E K I L T H N S K - G I K F O I L S N P E F L A E G T A I E D L F M : 170
UGD4 : A D V S V S D K I V V E K S T V P W K T A B A I E K I L M H N S K - G I K F O I L S N P E F L A E G T A I A D L F N : 170
H. s. UGD : V Q N S N G Y K I V T E K S T V P W R A E S I R R I F D A N T K P N L N L Q V L S N P E F L A E G T A I K D L K N : 174
S. p. UGD : L S V N - S H A T L I I K S T I P I G F I T E M R Q K F Q T D R I - - - - - I F S E E F F R E S K L Y D N L Y : 154

UGD1 : P D R V L I G G R D - - T A A G Q K A I K A L R D V Y A H V P V E - - Q I C T N L W S A E L S K L A A N A F L A : 224
UGD2 : P D R V L I G G R E - - T P E G F K A V Q T L K N V Y A H V P E G - - Q I I T T N L W S A E L S K L A A N A F L A : 224
UGD3 : P D R V L I G G R E - - T E G F A A V K A L K D I Y A Q V V P E E - - R L L T T N L W S A E L S K L A A N A F L A : 224
UGD4 : P D R V L I G G R E - - T P E G F K A V Q T L K E V Y A N V P E G - - Q I I T T N L W S A E L S K L A A N A F L A : 224
H. s. UGD : P D R V L I G G D E - - T P E G Q R A V Q A L C A V Y E H V P R E - - K L L T T N W S E L S K L A A N A F L A : 228
S. p. UGD : E S R I I V S C E E N D S E K V K A D A E K F A L L L K S A A K N N V P V L I M G A S E A P A V K L F A N T Y L A : 212

UGD1 : Q R I S S V N A M S A L C E A T G A D V T Q V A H A V G T D T R I G P K F L N A S V G F G G S C F O K D I L N L V Y : 282
UGD2 : Q R I S S V N A M S A L C E A T G A D V T Q V S Y A V G T D S R I G P K F L N S S V G F G G S C F O K D I L N L V Y : 282
UGD3 : Q R I S S V N A M S A L C E A T G A N V S E V S Y A V G K D S R I G P K F L N S S V G F G G S C F O K D I L N L V Y : 282
UGD4 : Q R I S S V N A M S A L C E S T G A D V T Q V S Y A V G T D S R I G S K F L N A S V G F G G S C F O K D I L N L V Y : 282
H. s. UGD : Q R I S S I N S I S A L C E A T G A D V E E V A T E I C M D Q R I G N K F L K A S V G F G G S C F O K D V L N L V Y : 286
S. p. UGD : L R V A Y F N E L D T Y A E S R K L N S H M I I Q G I S Y D D R I G M H Y N N P S G Y G G C L P K D T K Q L L A : 270

UGD1 : I C E C N G L P E V A E Y W K Q V I K I N D Y Q K T R F V N R I V S S M F N T V S - G K K I A I L G F A F K K D T G : 339
UGD2 : I C E C N G L P E V A E Y W K Q V I K I N D Y Q K S R F V N E V V S S M F N S V S - N K K I A V L G F A F K K D T G : 339
UGD3 : I C E C N G L P E V A E Y W K Q V I K I N D Y Q K T R F V N R I V S S M F N T V S - N K K I A V L G F A F K K D T G : 339
UGD4 : I C Q C N G L P E V A E Y W K Q V I K I N D Y Q K N R F V N R I V S S M F N T V S - N K K V A I L G F A F K K D T G : 339
H. s. UGD : L C E A L N L P E V A R Y W Q V I D M N D Y Q R R F A S R I I D S L F N T V T - D K K I A I L G F A F K K D T G : 343
S. p. UGD : N Y N N - - - - I P Q T L I E A I V S S N N V R K S Y I A K Q I I N V L K E Q E S P V K V V G V Y R L I M K S N S D : 324

UGD1 : D T R E T P A I D V C N R I V A D K A K L S I Y D P Q V L E E Q I R R D L S M A R F D W D H P V P L Q Q I K A E G I : 397
UGD2 : D T R E T P A I D V C K G L E D K A R L S I Y D P Q V T E D Q I Q R D L S M N K F D W D H P L H L Q P M S P T T V : 397
UGD3 : D T R E T P A I D V C K G L L G D K A R L S I Y D P Q V T E E Q I Q R D L T M N K F D W D H P L H L Q P M S P T T V : 397
UGD4 : D T R E T P A I D V C K G L L G D K A Q I S I Y D P Q V T E E Q I Q R D L S M K K F D W D H P L H L Q P M S P T T V : 397
H. s. UGD : D T R E S S S I Y I S K Y L M D E G A H L H I Y D P K V P R E Q I V V D L S H P G V S E D D - - - - - Q V : 391
S. p. UGD : N F R E S A I K D V I D I L K S K D I K I I Y E P M L N K L E S E - - - - - : 358

UGD1 : S E Q V N V S D A Y E A T K D A H G L C V L T E W D E F K S L D F K K I F D N M Q K P A F V F D G R N V V D - - A : 453
UGD2 : K - Q V T V T W D A Y E A T K D A H G I C I M T E W D E F K N L D F Q K I F D N M Q K P A F V F D G R N I M N - - L : 452
UGD3 : K - Q V S V A W D A Y T A T K D A H G I C I L T E W D E F K L D F Q R I F E N M Q K P A F V F D G R N V V D - - A : 452
UGD4 : K - Q V S V T W D A Y E A T K D A H A V C V L T E W D E F K S L D Y Q K I F D N M Q K P A F V F D G R N I M N - - V : 452
H. s. UGD : S R L V T I S K D P Y E A C D G A H A V V I C T E W D M F K E L L Y E R I H K K M L K P A F I F D G R R V D L G L H : 449
S. p. UGD : - - D Q S V L V N D L E N F K K Q A N I I V T N R Y D N E L Q D V K N K V Y S - - - - - R D I F G - - : 400

UGD1 : V K L R E I G F I V Y S I G K P L D S - - - - - W L K D M P A V A - - - - - : 481
UGD2 : Q K L R E I G F I V Y S I G K P L D D - - - - - W L K D M E A V A - - - - - : 480
UGD3 : D K L R E I G F I V Y S I G K P L D Q - - - - - W L K D M E A L A - - - - - : 480
UGD4 : N K L R E I G F I V Y S I G K P L D P - - - - - W L K D M P A F V - - - - - : 480
H. s. UGD : N E L Q T I G F Q I E T I G K K V S S K R I P Y A P S G E I P K F S I Q D P E N K K P K V - - - - - : 494
S. p. UGD : - - - R D - - - - - : 402

```

**Abbildung 3.2:**  
**Vergleich der Aminosäuresequenzen von UGD1, 2, 3 und 4 aus *Arabidopsis thaliana* mit den UGDs aus *Homo sapiens* (accession number AF061016) und *Streptococcus pyogenes* (accession number P0C0F4).**

Das Alignment wurde mit dem Programm GENEDOC erstellt und unter der Verwendung der Blossum62-Matrix farblich markiert. Konservierte Bereiche sind schwarz, Bereiche mit einer Homologie von 80% dunkelgrau und Bereiche mit einer Homologie von 60% hellgrau markiert. Der rot markierte Bereich zeigt die mögliche NAD<sup>+</sup>-Bindestelle, der blau markierte das katalytische Zentrum (Hempel *et al.*, 1994; Tenhaken & Thulke, 1996). Die gelb markierten Bereiche geben Aminosäurereste an, die bei der Katalyse und der Hexamerbildung eine wichtige Rolle spielen könnten (Erläuterungen siehe Text; Campbell *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2004).

Auch die anderen bei *Streptococcus* gefundenen aktiven Reste Thr118, Glu141, Glu145, Lys204, Asn208 und Asp264 lassen sich bei den UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* an folgenden Positionen nachweisen: Thr128, Glu157, Glu161, Lys216, Asn220 und Asp276. Ein Lysinrest, der sich an Position 279 der humanen UGD befindet und vermutlich eine Rolle bei der Hexamerbildung spielt (Sommer *et al.*, 2004), ist bei den UGDs aus *Arabidopsis thaliana* an Position 275 nachweisbar. Durch Sequenzvergleiche mit *Gm*-UGD1 aus *Glycine max* (Tenhaken & Thulke, 1996) konnten außerdem konservierte Sequenzmotive für eine NAD<sup>+</sup>-Bindestelle und ein katalytisches Zentrum (Abb.3.2 rot markierte Aminosäurereste) gefunden werden.

### **3.2 HETEROLOGE EXPRESSION VON UGD1, 2, 3 UND 4 IN *E. COLI*, PROTEINAUFREINIGUNG UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINE**

#### **Klonierung der Expressionsvektoren**

Die vier UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* wurden in *Escherichia coli* heterolog exprimiert und anschließend über eine Nickel-Chelat-Matrix aufgereinigt. Dazu wurde zunächst der komplette offene Leserahmen (*UGD1*) oder ein Teil des Leserahmens (*UGD2-4*) über PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte über die durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen (siehe Tab. 2.5) in die Expressionsvektoren pQEG*m*-UGD1 (Hinterberg *et al.*, 2002) für *UGD2-4* oder pET21a (Novagen, Darmstadt, Germany) für *UGD1* kloniert. Beide Vektoren ermöglichten eine Kontrolle der Genexpression durch einen Promotor mit *lac*-Operon (Induktion mit IPTG). Bei der Translation wurde außerdem am N-terminalen (pQE) bzw. C-terminalen Ende (pET21a) eine Sequenz von sechs Histidinaminosäuren (His-Tag) angehängt, die zur Aufreinigung über eine Nickel-NTA-Säule diente. Bei den Klonierungen von pQE*UGD2, 3* und *4* entstand jeweils ein Plasmid mit einer Hybrid-cDNA, bei der die ersten 68 Basenpaare einschließlich der *Bsp*TI-Restriktionsschnittstelle von *Gm*-UGD1 aus *Glycine max*, die restlichen Basenpaare aber von einer der drei *Arabidopsis*-UGDs stammten. Dieses Verfahren wurde

angewandt, weil die Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenzen von *UGD1*, 2, 3 und 4 in pQE-Vektoren zu keiner Protein-Expression in *E. coli* geführt hatte. Eigenschaften und Funktionen der resultierenden Hybridproteine sollten sich von denen der Originalproteine nicht unterscheiden. Denn, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, sind die ersten 25 Aminosäuren von *Gm-UGD1* und UGD2, 3 und 4 identisch.

		*			20		*																
<i>Gm-UGD1</i>	:	MVK	ICC	I	GAG	Y	VGG	P	TMA	V	I	A	L	K	C	P	S	I	E	V	A	:	30
UGD1	:	MVK	ICC	I	GAG	Y	VGG	P	TMA	V	M	A	L	K	C	P	E	I	E	V	V	:	30
UGD2	:	MVK	ICC	I	GAG	Y	VGG	P	TMA	V	I	A	L	K	C	P	D	V	E	V	A	:	30
UGD3	:	MVK	ICC	I	GAG	Y	VGG	P	TMA	V	I	A	L	K	C	P	S	V	E	V	A	:	30
UGD4	:	MVK	ICC	I	GAG	Y	VGG	P	TMA	V	I	A	L	K	C	P	D	I	E	V	A	:	30

**Abbildung 3.3:**  
**Vergleich der ersten 30 Aminosäuren von Gm-UGD1 aus Glycine max mit UGD1, UGD2, UGD3 und UGD4 aus Arabidopsis thaliana**

Die gelbe Markierung zeigt den Unterschied zwischen UGD1 und *Gm-UGD1* an Position 20. Das Restriktionsenzym *Bsp*TI schneidet die cDNA von *Gm-UGD1* zwischen den beiden Codons, die für die rot markierten Aminosäuren codierenden. Die cDNA von *UGD1* besitzt gleicher Position eine *Bsp*TI-Restriktionsschnittstelle, während die *Bsp*TI-Restriktionsschnittstelle für die Klonierung von *UGD2-4* bei der PCR durch die verwendeten Primer eingeführt wurde.

UGD1 und *Gm-UGD1* unterscheiden sich dagegen an Position 20. UGD1 besitzt an dieser Stelle anstatt eines Isoleucins ein Methionin. Ein pQE-Vektor mit einer entsprechenden Hybrid-cDNA wurde daher nicht hergestellt, sondern für die Expression von UGD1 wurde der Vektor pET21a gewählt, in den der komplette offene Leserahmen von *UGD1* kloniert wurde.

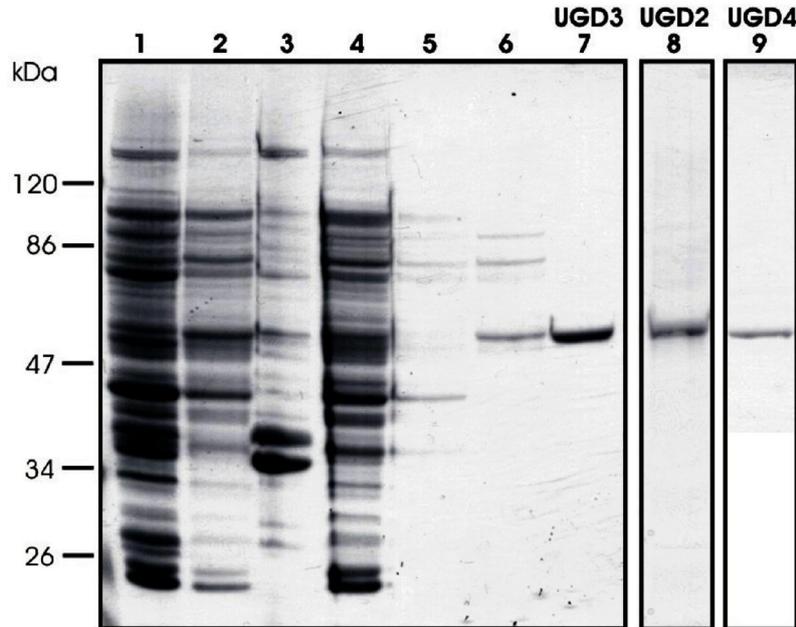
**Expression der Proteine in Escherichia coli und Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Matrix**

Die Expressionskonstrukte wurden in unterschiedliche *E. coli*-Stämme transformiert, die teilweise noch Hilfsplasmide zur Verbesserung des Expressionsergebnisses enthielten. Bakterienstämme und Hilfsplasmide wurden bezüglich gebildeter Proteinmenge und Enzymaktivität der heterolog exprimierten Proteine miteinander verglichen. Sowohl für UGD2 als auch für UGD3 und 4 konnte die Expression eines aktiven Proteins in ausreichender Menge erreicht werden. Dabei erwies sich die Kombination aus dem *E. coli*-Stamm Origami™

(Novagen, Darmstadt, Germany) und dem Hilfsplasmid pGroESL (Goloubinoff *et al.*, 1989) als die günstigste. Für einen optimalen Ertrag mussten außerdem die richtige Temperatur und der beste Induktionszeitpunkt erarbeitet werden. Wurden die Bakterienzellen erst spät mit IPTG behandelt ( $OD_{600nm} > 0,6$ ), konnte im Anschluss zwar viel heterolog exprimiertes Protein aus den Zellen gewonnen werden, ein Großteil davon lag jedoch in einem enzymatisch inaktiven Zustand vor. Bei einer frühen Induktion dagegen wurde nur sehr wenig, dafür enzymatisch aktives Protein gebildet. Es zeigte sich, dass der günstigste Zeitpunkt für die Induktion der Proteinexpression bei einer  $OD_{600nm}$  von etwa 0,4 lag. Eine Verbesserung von Proteinmenge und enzymatischer Aktivität konnte außerdem dadurch erreicht werden, dass die Bakterienzellen nach der Induktion nicht mehr bei 37°C, sondern nur noch bei 23°C kultiviert wurden. Zellaufschluss und Aufreinigung der Proteine wurden zunächst nach dem Protokoll von Hinterberg *et al.* (2002) durchgeführt. In Anpassung an die besonderen Eigenschaften von UGD1, 2, 3 und 4 aus *Arabidopsis thaliana* mussten jedoch einige Modifikationen vorgenommen werden (siehe Kapitel 2.3). Expression und anschließende Proteinaufreinigung wurden mittels SDS-PAGE überprüft. In Abbildung 3.4 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Aufreinigungsschritte für UGD3 (Spuren 1-7) gezeigt. Die Spuren 8 und 9 zeigen jeweils die aufgereinigten Enzyme UGD2 und UGD4. Alle drei Proteine konnten sauber und in ausreichender Menge (zwischen 1,2 und 1,6mg l<sup>-1</sup> *E. coli*-Kultur) aufgereinigt werden. Dabei entsprach die Größe der aufgereinigten Enzyme der erwarteten Größe von etwa 53kDa.

Die Enzymaktivität der Proteine wurde direkt nach der Aufreinigung überprüft. Um sicher zu gehen, dass die Bildung von NADH ausschließlich auf die Aktivität von UGD und nicht auf Verunreinigungen durch *E. coli*-Enzyme zurückzuführen war, wurden außerdem Proben gemessen, die bis auf UDP-Glucose alle anderen Bestandteile des Enzymtests enthielten. Bei keiner Aufreinigung konnte ohne die Zugabe von UDP-Glucose ein NAD<sup>+</sup>-Umsatz nachgewiesen werden. Die Bildung von NADH ließ sich damit ausschließlich auf die Aktivität von UGD zurückführen. Obwohl alle entsprechenden Parameter, wie Temperatur, Induktionszeitpunkt etc., konstant gehalten wurden, kam es zwischen den einzelnen Aufreinigungen zu Schwankungen der Enzymaktivität.

Daher wurde zur Aufnahme der Sättigungskurven jeweils nur Enzym aus einer Aufreinigung eingesetzt.



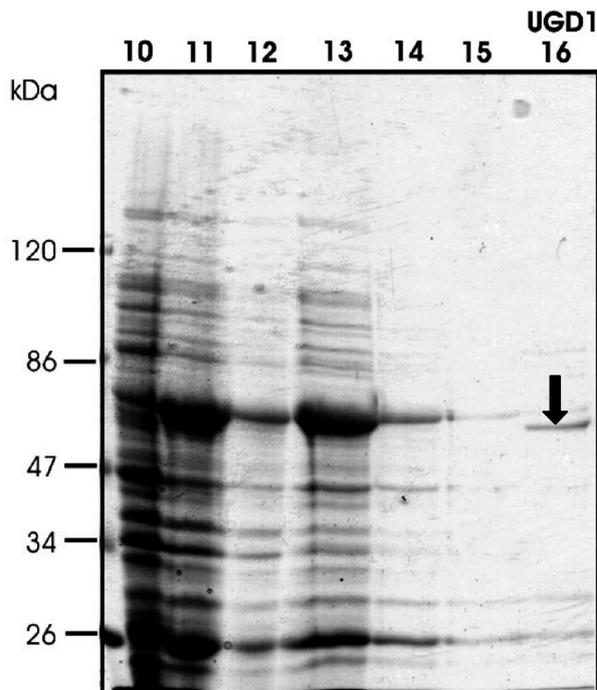
**Abbildung 3.4:**

**Das Coomassie-Blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigt die einzelnen Schritte der Aufreinigung von UGD3 und die aufgereinigten Enzyme UGD2 und 4**

- 1 Zellhomogenat Origami™ + pGroESL + pQEUGD3, nicht induziert
- 2 lösliche Bestandteile des Zellhomogenates 20h nach Induktion mit 500µM IPTG
- 3 unlösliche Bestandteile des Zellhomogenates 20h nach Induktion mit 500µM IPTG
- 4 Durchfluss nach Auftrag auf Nickel-NTA-Säule
- 5 Durchfluss erster Waschschrift mit NTA1-Puffer
- 6 Durchfluss zweiter Waschschrift mit NTA-2-Puffer (mit 20mM Imidazol)
- 7 Mit 250mM Imidazol eluierte Fraktion mit aufgereinigter UGD3
- 8 Aufgereinigte UGD2
- 9 Aufgereinigte UGD4

Während sich UGD2, 3 und 4 in ausreichenden Mengen heterolog exprimieren und aufreinigen ließen, war es schwierig eine entsprechende Expression von UGD1 nachzuweisen. Eine Klonierung des offenen Leserahmens von *UGD1* in einen pQE-Vektor, hatte zu keinerlei Expression in *E. coli* geführt. Daher erfolgte die Umklonierung in einen pET21a-Vektor. Dieser bot ähnliche Eigenschaften für die Expression in *E. coli* wie ein pQE-Vektor (His-Tag und *lac*-Operon). Der His-Tag befand sich allerdings durch den pET21a-Vektor am C-terminalen Ende anstatt am N-terminalen des heterolog exprimierten Proteins. Für die Expression wurde, wie schon bei den anderen Isoformen, der *E. coli*-Stamm Origami™ in

Kombination mit dem Hilfsplasmid pGroESL gewählt. Anzucht und Induktion der *E. coli*-Zellen erfolgten gemäß des für die anderen Isoformen verwendeten Protokolls (siehe Kapitel 2.3). Gleiches galt für die Aufreinigung über die Nickel-Chelat-Matrix. Allerdings wurde zweimal mit NTA-1-Puffer ohne Imidazol gewaschen, da die Affinität des His-Tags von UGD1 zu den Nickel-Ionen der Matrix wesentlich geringer war als bei den anderen Isoformen und sich daher das Protein schon bei geringen Imidazol-Konzentrationen von der Säule löste. In Abbildung 3.5 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Aufreinigungsschritte für UGD1 (Spuren 10-16) gezeigt. Ein Protein mit der erwarteten Größe von etwa 53kDa konnte aufgereinigt werden (Pfeil; Abb.3.5, Spur 16).



**Abbildung 3.5:**

**Das Coomassie-Blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigt die einzelnen Schritte der Aufreinigung von UGD1.**

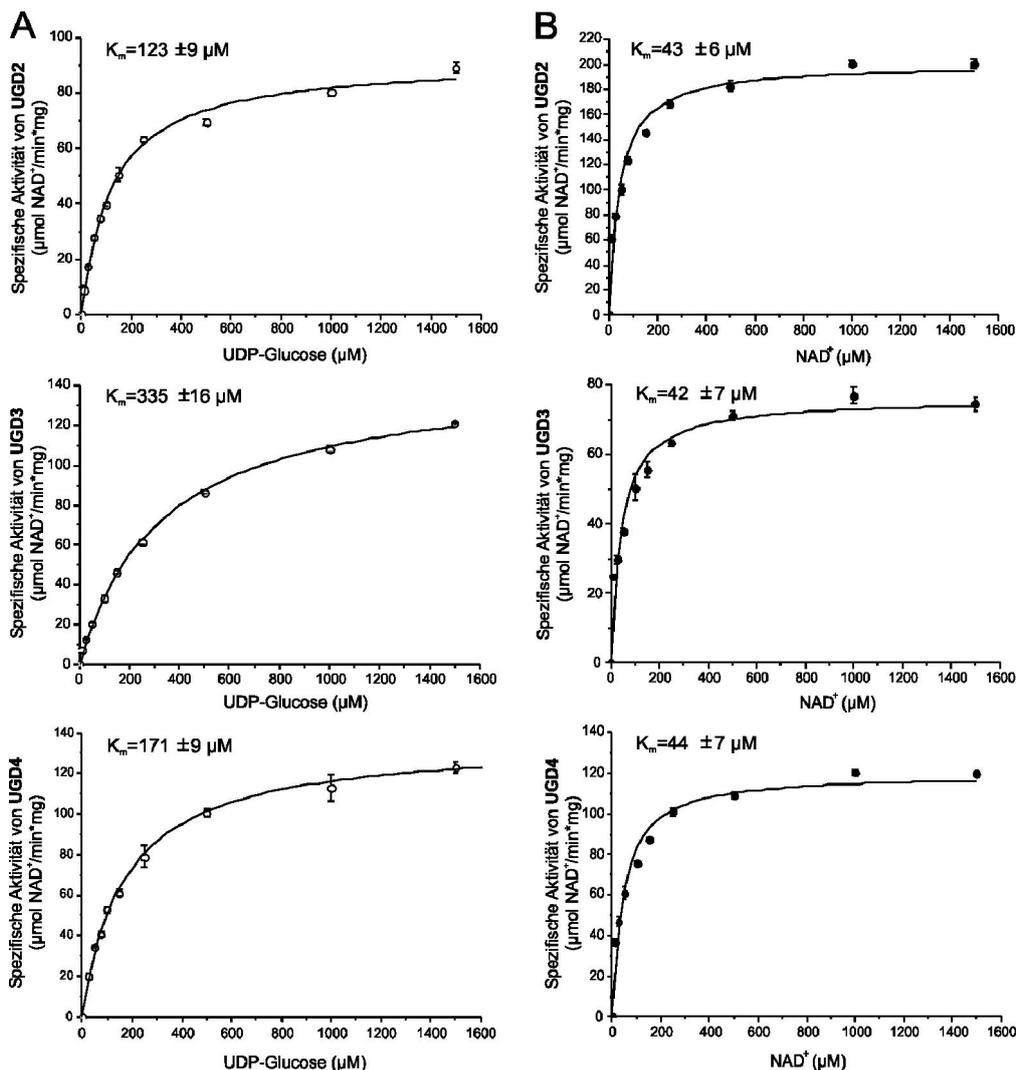
- 10 Zellhomogenat Origami<sup>TM</sup> + pGroESL + pET21aUGD1, nicht induziert
- 11 lösliche Bestandteile des Zellhomogenates 20 h nach Induktion mit 500  $\mu$ M IPTG
- 12 unlösliche Bestandteile des Zellhomogenates 20 h nach Induktion mit 500  $\mu$ M IPTG
- 13 Durchfluss nach Auftrag auf Ni-NTA-Säule
- 14 Durchfluss erster Waschschrift mit NTA1-Puffer
- 15 Durchfluss zweiter Waschschrift mit NTA-1-Puffer
- 16 Eluierte Fraktion (250mM Imidazol) mit aufgereinigter UGD1 (Pfeil)

Die Proteinmenge lag jedoch mit etwa  $0,56\text{mg l}^{-1}$  *E. coli*-Kultur deutlich unter den Werten, die bei der Expression der anderen Isoformen erreicht wurden. Außerdem enthielt das Eluat neben der potentiellen UGD1 auch noch einige Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine. Wie bei UGD2, 3 und 4 wurde die Enzymaktivität direkt nach der Aufreinigung überprüft. Allerdings ließ sich in keinem Eluat eine UGD-Aktivität nachweisen. Um auszuschließen, dass UGD1 nicht UDP-Glucose, sondern einen anderen, ähnlichen Zucker als Substrat benötigt, wurden außerdem ADP-Glucose, TDP-Glucose, UDP-Galactose, GDP-Mannose, UDP-*N*-Acetylgalactosamin, und UDP-*N*-Acetylglucosamin in einer Konzentration von  $500\mu\text{M}$  bei gesättigter  $\text{NAD}^+$ -Konzentration und  $500\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  bei gesättigter UDP-Glucose-Konzentration angeboten. Auch mit diesen Substraten war keine Aktivität nachweisbar. Weitere Modifikationen bei der Bakterienanzucht, dem Induktionszeitpunkt, dem Zellaufschluss und der Proteinaufreinigung führten ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis.

#### **Bestimmung der $K_m$ - und $v_{\max}$ -Werte von UGD2, 3 und 4 für UDP-Glucose und $\text{NAD}^+$**

Für UGD2, 3 und 4 wurden die  $K_m$ - und die  $v_{\max}$ -Werte für UDP-Glucose und  $\text{NAD}^+$  bestimmt. Dazu wurden die aufgereinigten Enzyme mit steigenden UDP-Glucosekonzentrationen ( $10\text{-}1500\mu\text{M}$ ) in Gegenwart einer gesättigten  $\text{NAD}^+$ -Konzentration ( $500\mu\text{M}$ ) oder mit steigenden  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen ( $10\text{-}1500\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von UDP-Glucose in gesättigter Konzentration ( $1500\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Enzymaktivität wurde für 1min als die Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in NADH bei  $340\text{nm}$  im Photometer gemessen. Pro Messpunkt wurden drei Messungen durchgeführt und gemittelt. Jede Sättigungskurve wurde mindestens dreimal pro Enzym und Substrat aufgenommen. Innerhalb einer Messreihe wurde nur Enzym aus einer Aufreinigung verwendet. Die  $K_m$ -Werte für UDP-Glucose betragen  $123 \pm 9\mu\text{M}$  bei UGD2,  $335 \pm 16\mu\text{M}$  bei UGD3 und  $171 \pm 9\mu\text{M}$  bei UGD4 (Abb.3.6, A). Die  $K_m$ -Werte für  $\text{NAD}^+$  lagen bei allen drei Isoformen bei etwa  $43\mu\text{M}$  (Abb.3.6, B). Während sich die  $K_m$ -Werte immer wieder reproduzieren ließen, schwankten die  $v_{\max}$ -Werte bei der Verwendung von Enzym aus unterschiedlichen Aufreinigungen stark. So reichten die  $v_{\max}$ -Werte von  $36\mu\text{mol NAD}^+\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  Enzym (=  $0,60\mu\text{kat mg}^{-1}$ ) bis  $200\mu\text{mol NAD}^+\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (=

3,33 $\mu\text{kat mg}^{-1}$ ). In Abbildung 3.6 sind jeweils die Kurven gezeigt, in denen die höchsten  $v_{\text{max}}$ -Werte erreicht wurden. Bei UGD2 lag dieser für UDP-Glucose bei 1,54 $\mu\text{kat mg}^{-1}$  Enzym und für  $\text{NAD}^+$  bei 3,33 $\mu\text{kat mg}^{-1}$  Enzym, bei UGD3 für UDP-Glucose bei 2,43 $\mu\text{kat mg}^{-1}$  Enzym und für  $\text{NAD}^+$  bei 1,27 $\mu\text{kat mg}^{-1}$  Enzym und bei UGD4 für UDP-Glucose bei 2,27 $\mu\text{kat mg}^{-1}$  Enzym und für  $\text{NAD}^+$  bei 2,00 $\mu\text{kat mg}^{-1}$  Enzym.



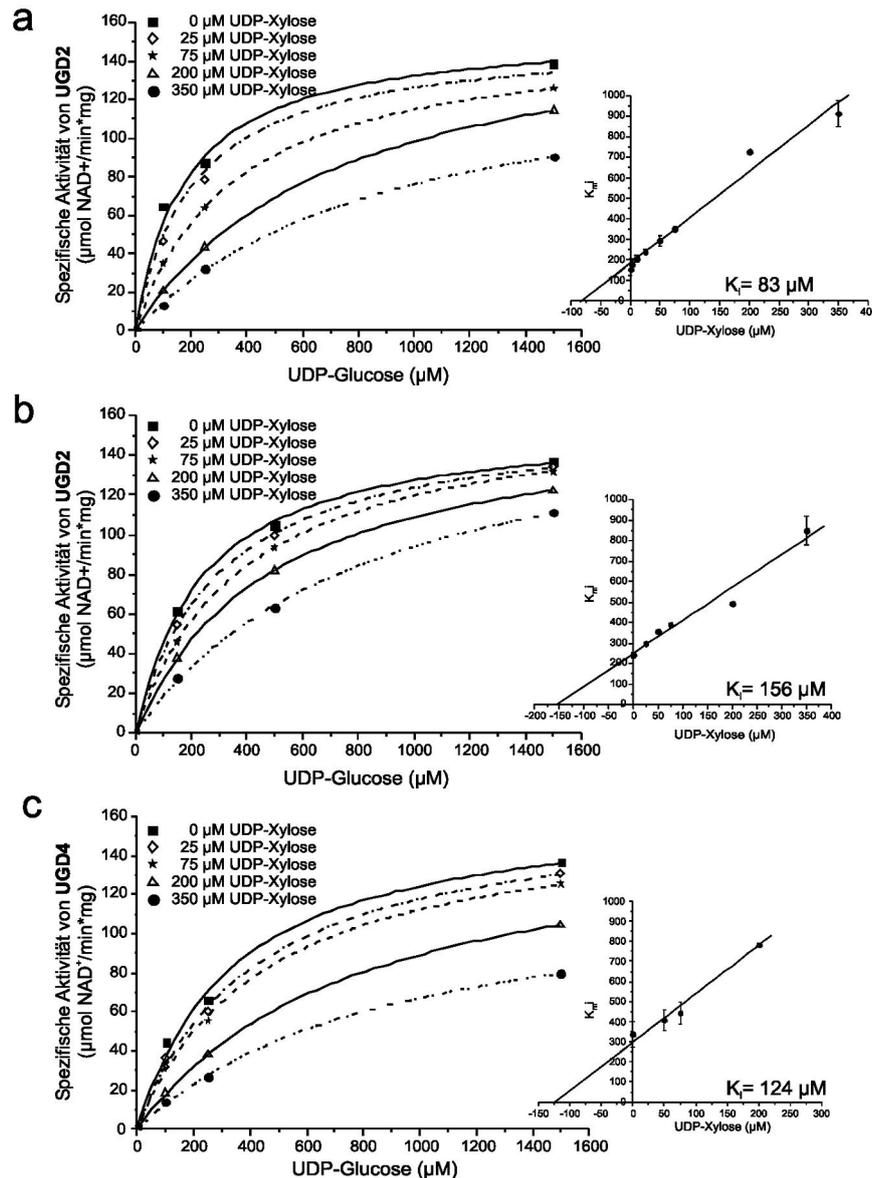
**Abbildung 3.6:**

**Bestimmung der  $K_m$ -Werte für UDP-Glucose (A) und  $\text{NAD}^+$  (B) von UGD2, 3 and 4 aus *Arabidopsis thaliana*.**

Aufgereinigtes, rekombinantes Enzym wurde mit steigenden UDP-Glucosekonzentrationen (10-1500 $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart einer gesättigten  $\text{NAD}^+$ -Konzentration (500 $\mu\text{M}$ ) oder mit steigenden  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen (10-1500 $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von UDP-Glucose in gesättigter Konzentration (1500 $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Enzymaktivität wurde für 1 min als die Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in  $\text{NADH}$  bei 340nm im Photometer gemessen. Pro Messpunkt wurden drei Messungen durchgeführt, gezeigt sind die Mittelwerte und  $\pm$  SD der drei Messungen. Zur Aufnahme der Sättigungskurven wurde jeweils nur Enzym aus einer Aufreinigung verwendet.

**Hemmung der Aktivität von UGD2, 3 und 4 durch UDP-Xylose**

Neben den  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werten wurde auch die Hemmstoffwirkung von UDP-Xylose auf die Aktivität von UGD2, 3 und 4 untersucht. Dazu wurden für jedes Enzym Sättigungskurven in Gegenwart verschiedener UDP-Xylose-Konzentrationen (0 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 75 $\mu$ M, 200 $\mu$ M und 350 $\mu$ M) aufgenommen.



**Abbildung 3.7:**

**Die hemmende Wirkung von UDP-Xylose auf die Aktivität von UGD2, 3 und 4**

Sättigungskurven in Gegenwart verschiedener UDP-Xylose-Konzentrationen (0 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 75 $\mu$ M, 200 $\mu$ M und 350 $\mu$ M). Die  $K_i$ -Werte ergaben sich durch den Auftrag der UDP-Xylose-Konzentrationen gegen die  $K_m$ -Werte der einzelnen Sättigungskurven. Pro Messpunkt wurden drei Messungen durchgeführt, gezeigt sind die Mittelwerte und  $\pm$  SD der drei Messungen. Zur Aufnahme aller 5 Sättigungskurven wurde jeweils nur Enzym aus einer Aufreinigung verwendet. a: UGD2; b: UGD3; c: UGD4

Durch das Auftragen der UDP-Xylose-Konzentrationen gegen die  $K_{mi}$ -Werte der einzelnen Sättigungskurven ließ sich der  $K_i$ -Wert, als Maß für die Affinität des Inhibitors zum Enzym, bestimmen (Abb.3.7, a-c). Die  $K_i$ -Werte für UDP-Xylose betragen bei UGD2 83 $\mu$ M, bei UGD3 156 $\mu$ M und bei UGD4 124 $\mu$ M.

### Substratspezifität von UGD2, 3 und 4

Zur Bestimmung der Substratspezifität von UGD2, 3 und 4 wurde in einem Standardenzymtestansatz (siehe Kapitel 2.5) entweder UDP-Glucose oder  $NAD^+$  durch ein alternatives Substrat ersetzt. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Alternativsubstrate aufgeführt. Außerdem wird gezeigt, welche dieser Substrate zu wie viel Prozent im Vergleich zur Kontrollaktivität umgesetzt wurden.

**Tabelle 3.1: Substratspezifität von UGD2, 3 and 4 aus *Arabidopsis thaliana***

In einem Standardenzymtestansatz wurden entweder UDP-Glucose oder  $NAD^+$  durch ein alternatives Substrat ersetzt. Alle Nukleotidzucker und Kofaktoren wurden in einer Konzentration von 1mM verwendet. Jede Messung wurde dreifach durchgeführt. 100% Kontrollaktivität entsprechen ca. 80nkat pro 1ml Assay.

n.n.: nicht nachweisbar; die Nachweisbarkeitsgrenze wurde auf 3% der Kontrollaktivität festgesetzt.

Nukleotidzucker	Kofaktor	Enzymaktivität der Isoformen (% der Kontrollaktivität)		
		UGD2	UGD3	UGD4
UDP-Glucose	$NAD^+$	100 %	100 %	100 %
UDP-Glucose	$NADP^+$	20 %	20 %	23 %
ADP-Glucose	$NAD^+$	n.n.	n.n.	n.n.
TDP-Glucose	$NAD^+$	n.n.	n.n.	n.n.
UDP-Galactose	$NAD^+$	n.n.	n.n.	n.n.
GDP-Mannose	$NAD^+$	n.n.	n.n.	n.n.
UDP-N-Acetylglucosamin	$NAD^+$	n.n.	n.n.	n.n.
UDP-N-Acetylgalactosamin	$NAD^+$	n.n.	n.n.	n.n.

Alle drei Isoformen konnten  $NADP^+$  statt  $NAD^+$  als Kofaktor verwenden. Allerdings betrug die Aktivität der Enzyme dann nur noch ein Fünftel der Ursprungsaktivität. Die angebotenen, alternativen Zuckersubstrate dagegen konnten von keiner der drei Isoformen umgesetzt werden.

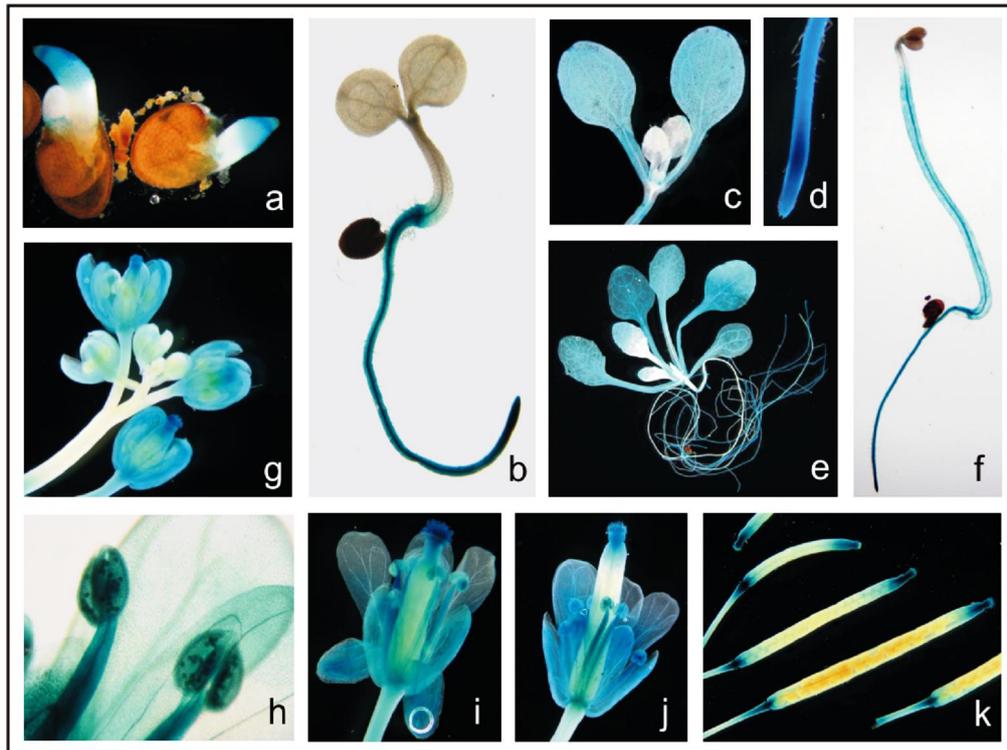
### 3.3 EXPRESSIONSMUSTER DER *UGD*-GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

#### Expressionsanalysen mittels Promotor::*GUS*-Reportergermpflanzen

Um zu untersuchen, welches *UGD*-Gen zu welchem Zeitpunkt der Morphogenese von *Arabidopsis thaliana* in welchem Gewebe exprimiert wird und in wieweit sich die Expressionmuster der einzelnen Isoformen gleichen oder unterscheiden, wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen generiert, die ein Promotor::*GUS*-Reportergermpflanzen enthielten. Bei diesen Konstrukten waren die entsprechenden Promotoren der *UGD*-Gene vor das für eine  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) codierende Gen (*uidA*) aus *E. coli* kloniert. In den transgenen Pflanzen wurde *GUS* also dann gebildet, wenn der zu untersuchende Promotor angeschaltet war. Um die Expression sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff X-Gluc verwendet, welcher eigentlich farblos ist und erst durch *GUS* zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. Zur Untersuchung der Expressionmuster von *UGD1*, *2* und *3* lagen zu Beginn der Arbeit bereits transgene *Arabidopsis*-Linien vor (Seitz *et al.*, 2000; persönliche Kommunikation Christoph Klos). Das *UGD4* Promotor::*GUS*-Konstrukt und die dazugehörige transgene *Arabidopsis*-Linie wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Alle transgenen *UGD* Promotor::*GUS*-*Arabidopsis*-Linien wurden systematisch auf eine *GUS*-Expression hin untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Keimung und die Blüten- und Schotenentwicklung gelegt. Aber auch Blattrosette, cauline Blätter und Stengel wurden näher analysiert. Es wurden sowohl im Licht als auch im Dunkeln gewachsene Keimlinge verwendet.

Abbildung 3.8 zeigt die *GUS*-Expression in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien transgener *UGD2* Promotor::*GUS*-Pflanzen. Direkt nach der Keimung ließ sich *GUS*-Aktivität nur in der Primärwurzel nachweisen (Abb.3.8a/b). Erst vier Tage nach der Keimung zeigte sich auch eine leichte *GUS*-Aktivität in der Spitze der Keimblätter. Nach sieben Tage hatte sich diese schließlich über das gesamte Keimblatt ausgebreitet (Abb.3.8c). In der Primärwurzel war vor allem die Wurzelspitze von starker *GUS*-Aktivität geprägt (Abb.3.8d). Diese war in Differenzierungs- und Streckungszone am stärksten, im Wurzelmeristem etwas schwächer. Auch Calyptra und junge Wurzelhaare zeigten

GUS-Aktivität. Bei etiolierten Keimlingen entsprach das GUS-Aktivitätsmuster der Wurzeln dem Muster der bei Licht gewachsenen Keimlingen. In den Keimblättern der etiolierten Keimlinge zeigte sich keine Aktivität. Dagegen war im Hypokotyl eine starke GUS-Aktivität nachweisbar, vor allem im Bereich des Zentralzylinders (Abb.3.8f).



**Abbildung 3.8:**

**Reporter-Gen-Expression in transgenen UGD2-Promotor::GUS-Arabidopsis-Pflanzen**

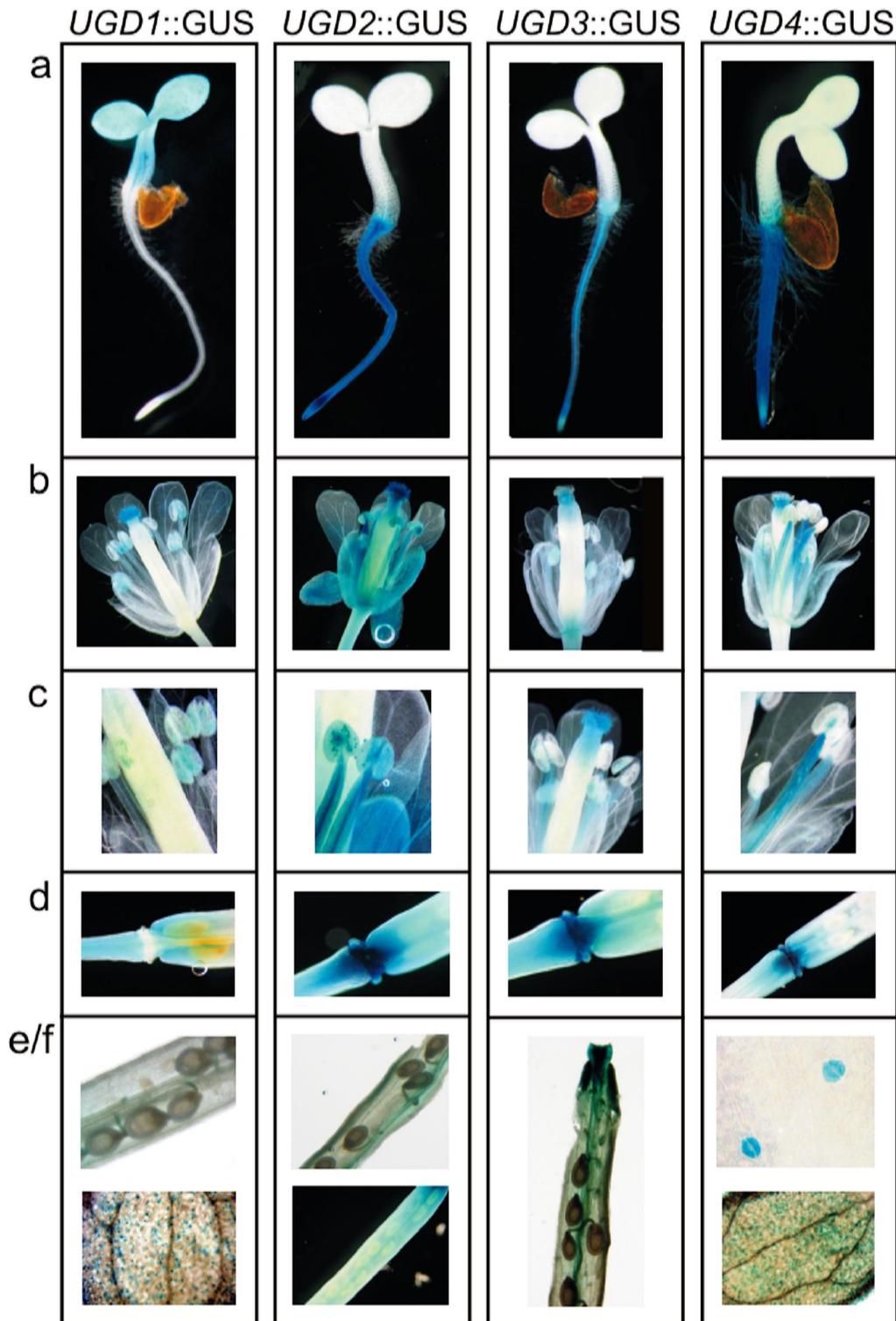
Es sind unterschiedliche Gewebe und verschiedene Entwicklungsstadien gezeigt. Die Pflanzen wurden im Licht (a-e, h-k) oder bei Dunkelheit (f) angezogen.

**a)** einen Tag alte Keimlinge; **b)** drei Tage alter Keimling; **c)** Keimblätter eines sieben Tage alten Keimlings; **d)** Wurzelspitze; **e)** zwei Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanze; **f)** etiolierter vier Tage alter Keimling; **g)** Knospen und junge Blüten; **h)** Pollensäcke mit reifem Pollen; **i)** ältere Blüte; **j)** bestäubte Blüte mit sich entwickelnder Schote; **k)** Schoten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Bei zwei Wochen alten Pflanzen zeigte sich in allen Blättern eine GUS-Aktivität. Dabei waren in jungen Blättern nur die Blattspitzen betroffen, in älteren Blättern die gesamte Blattspalte, besonders die Bereiche um die Blattadern, und die Blattstiele. Stomata, Trichome und Hypokotyl blieben ohne GUS-Aktivität. In den Wurzelspitzen der Haupt- und der Seitenwurzeln ließ sich das gleiche GUS-Aktivitätsmuster nachweisen wie in den Primärwurzeln. In jungen Knospen wurde nur im sich entwickelnden Stempel GUS-Aktivität, insbesondere im Griffel und in

der Narbe, gefunden. In späteren Knospenstadien kam außerdem eine GUS-Aktivität in den Kelch- und Staubblättern hinzu (Abb.3.8g). Der Pollen selbst wies zunächst keine GUS-Aktivität auf, erst im reifen Zustand ließ sich eine deutliche GUS-Aktivität nachweisen (Abb.3.8h). In offenen Blüten konnte außerdem in den Kronblättern eine GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität im Stempel beschränkte sich in diesem Stadium allein auf Griffel und Narbe, inklusive der Haare auf der Narbe (Abb.3.8i/j). In den Schoten schien sich die GUS-Aktivität auf die Schotenspitze und auf den Stielansatzpunkt der Schoten zu beschränken. Die sich entwickelnden Samen blieben zu jedem Zeitpunkt ohne Aktivität (Abb.3.8k).

Bei den anderen transgenen *UGD* Promotor::GUS-Linien konnten ähnlich differenzierte GUS-Aktivitätsmuster beobachtet werden. Hierbei fiel auf, dass die GUS-Aktivitätsmuster von *UGD2* Promotor::GUS- und *UGD3* Promotor::GUS-Pflanzen fast identisch waren. Auch *UGD4* Promotor::GUS-Pflanzen zeigten ein ähnliches Muster. *UGD1* Promotor::GUS-Pflanzen dagegen unterschieden sich in ihrem Aktivitätsmuster deutlich von denen der anderen Linien. In Abbildung 3.9 werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der GUS-Aktivität der einzelnen *UGD* Promotor::GUS-Linien gegenüber gestellt. Keimlinge der *UGD1* Promotor::GUS-Pflanzen zeigten eine starke GUS-Aktivität in Kotyledonen und im Hypokotyl, während in der Primärwurzel nur eine leichte Aktivität im Zentralzylinder nachweisbar war (Abb.3.9a). Dieses Aktivitätsmuster blieb während der gesamten weiteren Keimlingsentwicklung bestehen. *UGD2*, *3* und *4* Promotor::GUS-Linien, die in den ersten Tage nach der Keimung nur in der Primärwurzel eine GUS-Aktivität aufwiesen, zeigten dagegen im Laufe der Zeit (ab etwa dem vierten Tag nach der Keimung) auch eine deutliche Aktivität in den Keimblättern und im Hypokotyl. In *UGD1* Promotor::GUS-Pflanzen ließ sich außerdem eine GUS-Aktivität in den Schließzellen der Stomata, sowohl in Keimblättern ab dem zweiten Tag nach der Keimung als auch in jungen Blättern 14 Tage alter Blattrosetten, nachweisen. Ähnlich verhielt es sich bei *UGD4* Promotor::GUS-Pflanzen, die eine GUS-Aktivität in den Schließzellen der Stomata in Keimblättern und im Hypokotyl zeigten (Abb.3.9f). *UGD2*- und *UGD3* Promotor::GUS-Pflanzen dagegen wiesen zu keiner Zeit eine GUS-Aktivität in Stomatas auf.



**Abbildung 3.9:**

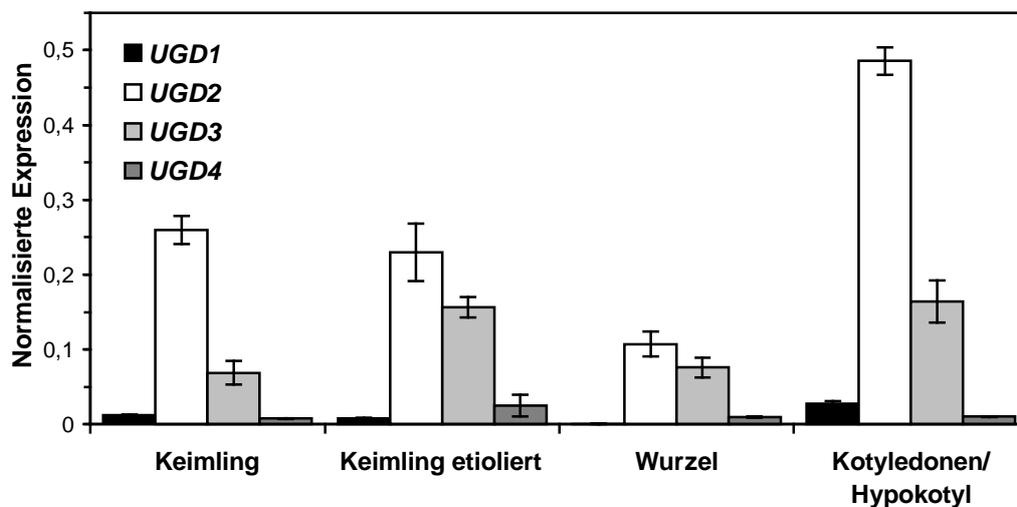
**Unterschiede in der Promotor::GUS-Aktivität zwischen den einzelnen Isoformen**

**a)** zwei Tage alte Keimlinge; **b)** ältere Blüte; **c)** Pollensäcke mit reifem Pollen; **d)** Stielansatzpunkt der Schote; **e/f)** Schoteninneres (manuell geöffnet; *UGD1, 2, 3* Promotor::GUS-Pflanzen), Kotyledonen mit gefärbten Stomata (*UGD1, 4* Promotor::GUS-Pflanzen)

Auch bei der Blüten- und Schotenentwicklung gab es einige Unterschiede in den GUS-Aktivitätsmustern zwischen den einzelnen *UGD* Promotor::GUS-Linien. So wiesen zum Beispiel die Filamente der Staubblätter und der reife Pollen in den Blüten aller *UGD* Promotor::GUS-Linien GUS-Aktivität auf, während sich jedoch nur bei der *UGD2* Promotor::GUS-Linie zusätzlich eine GUS-Aktivität in den Pollensäcke nachweisen ließ (Abb.3.9c). Ähnlich verhielt es sich bei Kron- und Kelchblättern. Hier wurde nur in den Blütenblättern der *UGD2* Promotor::GUS-Pflanzen GUS-Aktivität gefunden (Abb.3.9b). Bei den Schoten der *UGD2*, 3 und 4 Promotor::GUS-Linien wies der Stielansatzpunkt eine starke GUS-Aktivität auf. In einigen Entwicklungsstadien ließ sich außerdem auch eine leichte GUS-Aktivität in der Schotenhülle nachweisen. Dagegen zeigten *UGD1* Promotor::GUS-Pflanzen am Schotenansatzpunkt eine genau gegenteilige GUS-Aktivität (Abb.3.9d). Bei *UGD1*, 2 und 3 Promotor::GUS-Pflanzen ließ sich außerdem in den Versorgungsbahnen der Samen innerhalb der Schoten GUS-Aktivität nachweisen (Abb.3.9e/f). Die Samenanlagen und reifen Samen blieben dagegen zu jedem Zeitpunkt bei allen *UGD* Promotor::GUS-Pflanzen ohne GUS-Aktivität.

### **Quantitative Expressionsanalysen mittels real time-PCR**

Durch die Untersuchungen an den Promotor::GUS-Pflanzen ließen sich Aussagen über die Expressionsorte und –zeitpunkte der vier *UGD*-Gene in *Arabidopsis thaliana* treffen. Es war jedoch mit dieser Methode nicht möglich auch auf die gebildeten Transkriptmengen, also auf die Expressionsstärke, zu schließen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit auch quantitative Expressionsanalysen mittels *real time*-PCR durchgeführt. Dafür wurde aus sechs Tage alten, steril im Licht oder im Dunkel gewachsenen *Arabidopsis*-Keimlingen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es wurden entweder ganze Keimlinge verwendet oder die Primärwurzeln bzw. die oberen Pflanzenteile (Kotyledonen/Hypokotyle) lichtgewachsener Keimlinge. In jede *real time*-PCR-Reaktion wurde immer die gleiche cDNA-Menge eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen wurden dreifach und zusammen mit einer Nullkontrolle, die keine cDNA enthielt, durchgeführt. Die erhaltenen  $C_T$ -Werte wurden gemittelt und durch den Bezug auf die  $C_T$ -Werte des *house keeping*-Gens *UBQ5* normalisiert.



**Abbildung 3.10:**

**Quantitative Expressionsanalyse (real time-PCR) der UGD-Transkripte in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*.**

Für die Analysen wurden sechs Tage alte Keimlinge verwendet, die steril auf MS-Medium mit 0,5% Saccharose im Licht oder im Dunkeln angezogen wurden. Keimlingswurzeln und Kotyledonen/Hypokotyle stammen von im Licht gewachsenen Keimlingen. Die Daten sind dargestellt als normalisierte Expression bezogen auf die Menge an *UBQ5*-Transkript, die eingesetzt wurde. Die einzelnen Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen zusammen, gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse der *real time*-PCR-Analyse dargestellt. Für jedes *UGD*-Gen ist die normalisierte Expression im gesamten Keimling (hell oder dunkel gewachsen), in der Primärwurzel oder in Kotyledonen/Hypokotyl angegeben. Man sieht deutlich, dass sich die Gene in ihrer Expressionsstärke voneinander unterscheiden. *UGD2* wird sowohl in Licht als auch in Dunkel gewachsen Keimlingen stärker exprimiert als die Gene der anderen drei Isoformen. Die Expression von *UGD1* und *UGD4* ist dagegen in Keimlingen gering, wobei das *UGD4*-Gen in etiolierten Keimlingen stärker exprimiert wird als in Licht gewachsenen Keimlingen. Vergleicht man die Expressionsstärke der verschiedenen Isoformen in Primärwurzel und Kotyledonen/Hypokotyl, zeigt sich, dass *UGD2* in den Keimblättern und im Hypokotyl sehr stark exprimiert wird. In der Wurzel dagegen ist die Expression viel geringer und ähnlich hoch wie die Expression von *UGD3*. Eine Expression *UGD1* in der Primärwurzel konnte nicht nachgewiesen werden. Sie scheint sich auf Kotyledonen und Hypokotyl zu beschränken. *UGD4*-Expression ließ sich sowohl in der Primärwurzel als auch in

Kotyledonen und Hypokotyl nachweisen, wenn auch in wesentlich geringerem Maße als bei *UGD2* und *UGD3*.

### 3.4 ISOLIERUNG FUNKTIONELLER, HOMOZYGOTER *UGD*- *KNOCK OUT*-MUTANTEN

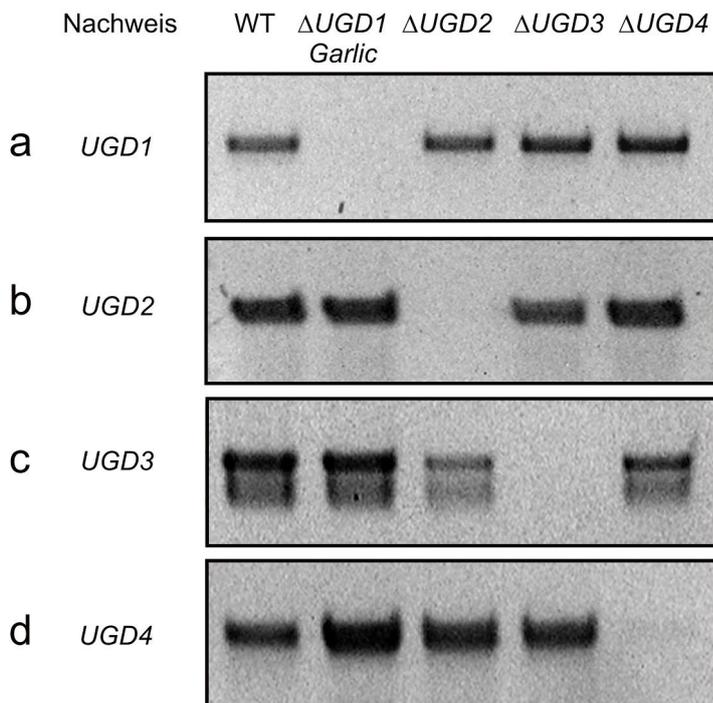
Um die Funktionen der vier *UGD*-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* und ihr Zusammenspiel innerhalb der Zellwandbiosynthese näher untersuchen zu können, wurden *Arabidopsis*-Mutanten verwendet, bei denen jeweils eine der *UGD*-Isoformen durch eine T-DNA-Insertion im offenen Leserahmen ausgeschaltet war. Die Mutanten wurden nicht selbst hergestellt, sondern vom NASC (European Arabidopsis Stock Center) bezogen. Dieses stellte eine heterozygote Samenmischung bereit, aus der zunächst homozygote Mutanten isoliert werden mussten. Dazu wurden die Samen ausgesät und die DNA der Pflanzen über eine erste PCR-Reaktion auf das Vorhandensein der T-DNA-Insertion im *UGD*-Gen hin überprüft. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde überprüft, ob die Insertion auf beiden Allelen vorlag (homozygot) oder ob noch eine intakte *UGD*-Genkopie vorhanden war (heterozygot, siehe Abb.2.1). Von Pflanzen, in denen die Insertion homozygot vorlag, wurden Samen gesammelt und für weitere Analysen verwendet. Für jede *UGD*-Isoform konnte mindestens eine *knock out*-Mutantenlinie isoliert werden, welche die entsprechende T-DNA-Insertion homozygot enthielt (Tab.3.2).

**Tabelle 3.2: Homozygote T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana*, bei denen jeweils eines der vier *UGD*-Gene durch eine T-DNA-Insertion ausgeschaltet ist.**

ausgeschaltete Isoform	homozygote T-DNA-Insertionslinie
UGD1	$\Delta UGD1$ Garlic 347_B03_21 L1-1 $\Delta UGD1$ SALK_025303 L4
UGD2	$\Delta UGD2$ Garlic_1144_F10 L1-11
UGD3	$\Delta UGD3$ SALK_006234 L4-1
UGD4	$\Delta UGD4$ Wisconsin 9C40 L1-2

Um ganz sicher zu gehen, dass die *UGD*-Gene in den Mutantenlinien tatsächlich durch die T-DNA-Insertionen ausgeschaltet waren, wurde aus den Blättern der

Pflanzen die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mittels PCR überprüft, welche cDNAs der *UGD*-Gene noch in welcher Mutante nachweisbar waren. Dabei sollten in einer Mutante die cDNAs aller Isoformen bis auf die des ausgeschalteten Gens nachweisbar sein. Die Primerkombinationen für die PCR-Reaktionen wurden hierbei so gewählt, dass pro Kombination nur die cDNA einer bestimmten Isoform nachgewiesen werden konnte (siehe Tab.2.8). Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Mutantenlinien zu ermöglichen, wurde in jede PCR-Reaktion die gleiche Menge cDNA eingesetzt. Als Kontrolle diente cDNA aus Wildtyppflanzen *Arabidopsis thaliana* Col-0. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte über die Auftrennung in einem 1%igem Agarosegel.



**Abbildung 3.11:**

**Überprüfung der T-DNA-Insertionsmutanten auf Funktionalität der knock outs**

Gezeigt sind Ausschnitte aus vier verschiedenen Agarosegelen, auf denen jeweils die PCR-Produkte der folgenden PCR-Reaktionen der Größe nach aufgetrennt wurden:

- a) Primerkombination koT1K7fwd und -rev zum spezifischen Nachweis von *UGD1*-cDNA;
- b) Primerkombination *UGD2*cdna-fwd und -rev zum spezifischen Nachweis von *UGD2*-cDNA;
- c) Primer-kombination koT20K14fwd und -rev zum spezifischen Nachweis von *UGD3*-cDNA;
- d) Primerkombination koUGD4\_2411rev und *UGD4*\_BspTI zum spezifischen Nachweis von *UGD4*-cDNA.

Als Matrize diente in allen PCR-Reaktionen cDNA, die aus der Gesamt-RNA von Blättern gewonnen wurde. WT= Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Col-0;  $\Delta UGD1$  *Garlic*=  $\Delta UGD1$  *Garlic* 347\_B03\_21 L1-1;  $\Delta UGD2$ =  $\Delta UGD2$  *Garlic*\_1144\_F10 L1-11;  $\Delta UGD3$ =  $\Delta UGD3$  SALK\_006234 L4-1;  $\Delta UGD4$ =  $\Delta UGD4$  *Wisconsin* 9C40 L1-2.

Abbildung 3.11, a-d, zeigt, dass sich in jeder Mutantenlinie die Expression aller *UGD*-Gene nachweisen ließ bis auf die des Gens, in dem homozygot eine T-DNA-Insertion vorhanden war. Die Insertionen schalteten die entsprechenden Gene also vollständig aus. In der Wildtyppflanze (WT) wurden dagegen alle *UGD*-Gene exprimiert. In gleicher Vorgehensweise wurde auch die Mutantenlinie  $\Delta UGD1$  SALK\_025303 L4 auf Funktionalität des *knock outs* überprüft. Das Ergebnis war hierbei identisch mit dem der Linie  $\Delta UGD1$  Garlic 347\_B03\_21 L1-1 (Daten nicht gezeigt).

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination der Gesamt-RNA bzw. cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurden alle PCR-Reaktionen mit RNA als Matrize wiederholt. Dabei wurde die RNA in gleicher Verdünnung wie die cDNA in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Da die RNA selbst nicht PCR-fähig ist, deuten erhaltene PCR-Produkte auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass keine der verwendeten Gesamt-RNA-Isolierungen Spuren von genomischer DNA enthielt (Daten nicht gezeigt).

### **Herstellung von Doppelmutanten**

Zur Herstellung von Mehrfachmutanten wurden verschiedene homozygote *UGD*-Insertionslinien untereinander gekreuzt: Zum einen wurde die Linie  $\Delta UGD4$  Wisconsin 9640 L1-7 in die Linie  $\Delta UGD1$  Garlic 347\_B03\_21 L1-1, zum anderen die Linie  $\Delta UGD3$  SALK\_006234 L4-1 in die Linie  $\Delta UGD2$  Garlic 1144F10 L1-11 gekreuzt. Samen mit potentiell gekreuztem Erbgut wurden ausgesät und die DNA der erhaltenen Pflanzen mittels PCR auf das Vorhandensein der Insertionen in beiden Genen überprüft. Diese erste Generation (F1) war bei erfolgreicher Kreuzung bezüglich beider T-DNA-Insertionen heterozygot. Samen von Pflanzen, die beide Insertionen enthielten wurden, erneut ausgesät. In dieser nächsten Generation (F2) sollten sich laut Mendelschen Regeln unter 16 getesteten Pflanzen eine zweifach homozygote und eine Wildtyppflanze finden lassen. Alle anderen Pflanzen sollten nur homozygot bezüglich einer Insertion, heterozygot bezüglich einer oder beider Insertionen und/oder in einem der beiden Gene ohne Insertion sein. Auch aus diesen Pflanzen wurde die DNA

isoliert und zunächst mit Hilfe von PCR überprüft, ob die Insertionen in beiden Genen vorhanden waren. Aus den positiv getesteten Pflanzen wurde anschließend RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer weiteren PCR-Reaktion wurde überprüft, ob es sich bei den Pflanzen um zweifach homozygote Pflanzen handelt, bei denen beide *UGD*-Gene vollständig ausgeschaltet sind, oder ob es sich um einfach homozygote oder heterozygote Pflanzen handelt.

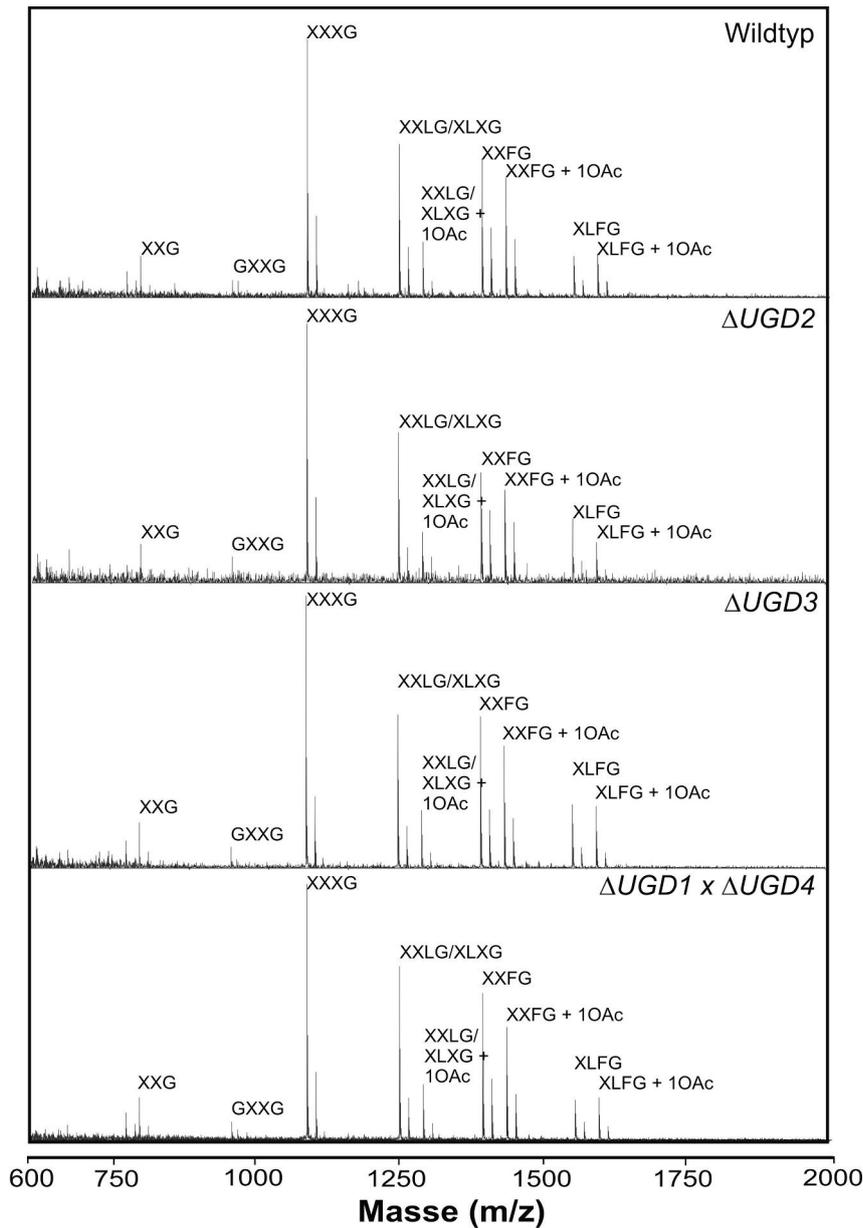
Die Linien  $\Delta UGD4$  Wisconsin 9640 L1-7 und  $\Delta UGD1$  Garlic 347\_B03\_21 L1-1 konnten erfolgreich gekreuzt werden. In der F2-Generation wurden 32 Pflanzen auf homozygote Insertionen im *UGD1*- und im *UGD4*-Gen hin untersucht. Es konnten drei zweifach homozygote Pflanzen identifiziert werden:  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  Linie 1-2, 1-5 und 1-7. Linie 1-7 wurde für weitere Analysen verwendet. Auch die Linien  $\Delta UGD3$  SALK\_006234 L4-1 und  $\Delta UGD2$  Garlic 1144F10 L1-11 ließen sich erfolgreich kreuzen. In der F2-Generation wurden ebenfalls 32 Pflanzen auf homozygote Insertionen im *UGD2*- und im *UGD3*-Gen hin untersucht. Nach den Mendelschen Regeln hätten bei dieser Pflanzenanzahl etwa 2 Pflanzen homozygote Insertionen in beiden Genen gleichzeitig enthalten müssen. Es konnten jedoch keine zweifach homozygoten Pflanzen gefunden werden. Zwei Linien enthielten jedoch die Insertion im *UGD2*-Gen homozygot, während die entsprechende Insertion im *UGD3*-Gen heterozygot vorlag. Die Samen dieser Pflanzen (F3-Generation) wurden erneut ausgesät und 39 Pflanzen anschließend auf homozygote Insertion im *UGD2*- und im *UGD3*-Gen überprüft. Wie erwartet enthielten alle untersuchten Pflanzen die Insertion im *UGD2*-Gen homozygot. Unter den untersuchten Pflanzen wurden jedoch nur solche gefunden, die im *UGD3*-Gen keine Insertion mehr enthielten oder bei denen die Insertion heterozygot vorlag. Pflanzen mit homozygoter Insertion konnten nicht identifiziert werden. Laut Mendelschen Regeln hätte dies bei etwa 10 Pflanzen der Fall sein sollen.

### 3.5 SCREENING DER *UGD KNOCK OUT*-MUTANTEN AUF UNTERSCHIEDE ZU WILDTYP-PFLANZEN

Die funktionellen, homozygoten *UGD knock out*-Mutanten wurden näher mit dem Ziel untersucht, Unterschiede im Zellwandaufbau und in der -funktion zwischen Mutanten- und Wildtyppflanzen zu finden. Alle Mutanten waren auf den ersten Blick nicht von den Wildtyppflanzen zu unterscheiden. Sie zeigten einen unauffälligen Wuchs und waren fertil.

#### Analyse der Zellwandzusammensetzung bei $\Delta UGD2$ , $\Delta UGD3$ und $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ knock out-Mutanten

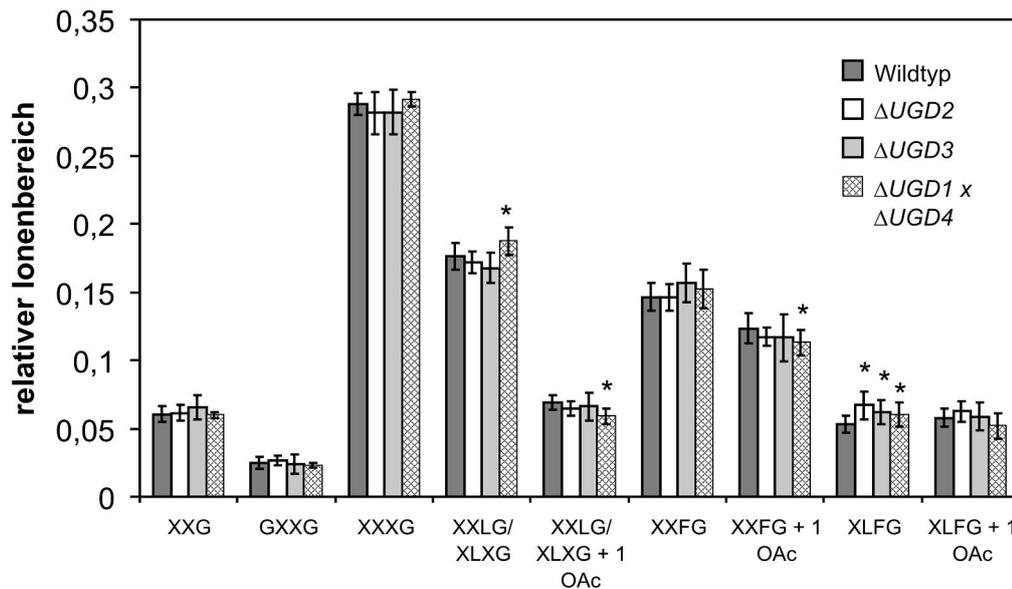
Die Zellwände der *UGD knock out*-Mutanten  $\Delta UGD2$  Garlic\_1144\_F10 L1-11,  $\Delta UGD3$  SALK\_006234 L4-1 und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  L1-7 wurden mittels MALDI-TOF MS- und HPLC-Analysen näher auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Dafür wurde zunächst die Zellwand von sechs Tage alten Keimlingen isoliert. Für die MALDI-TOF MS-Analysen wurde diese anschließend mit Xyloglucanendoglucanase (XEG), die das Xyloglucangerüst nach nicht substituierten Glucoseresten schneidet, verdaut. Dadurch erhielt man definierte Xyloglucanfragmente unterschiedlicher Länge (siehe auch Abb.1.2). Die Fragmente wurden durch MALDI-TOF MS näher analysiert. Die einzelnen Ionensignale in den erhaltenen Spektren wurden durch den Vergleich mit Literaturwerten identifiziert (Lerouxel *et al.*, 2002). Eine quantitative Auswertung erfolgte durch die Integration der Fläche unter den jeweiligen Signalen. Diese wurde in Bezug zur Gesamtfläche unterhalb aller Signale gesetzt. Pro untersuchten Genotyp wurden jeweils zehn unabhängige Zellwandpräparationen von zehn unterschiedlichen Pflanzen in den Untersuchungen verwendet. In Abbildung 3.12 sind die MALDI-TOF MS-Spektren gezeigt. Auf den ersten Blick scheint es keinen Unterschied in der Zusammensetzung des Xyloglucans von *knock out*-Mutanten gegenüber dem von Wildtyppflanzen zu geben. Alle Xyloglucanfragmente, die sich in der XEG-verdauten Zellwand des Wildtyps nachweisen ließen, waren auch bei den Mutanten zu finden. Weder fehlten bestimmte Fragmenttypen, noch konnten neue Typen nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.12:**  
**MALDI-TOF Massen-Spektren der XEG verdauten Xyloglucanfragmenten aus sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der knock out-Mutanten  $\Delta UGD2$ ,  $\Delta UGD3$  und  $\Delta UGD1x\Delta UGD4$**

Die Identifizierung der Xyloglucanfragmente erfolgte durch den Vergleich der in den Messungen gewonnenen Daten mit Literaturwerten (Lerouxel *et al.*, 2002). Nomenklatur der Xyloglucanfragmente nach Fry *et al.* (1993), siehe Abb.1.2.

Erst die quantitative Auswertung der gewonnenen Daten lieferte Hinweise darauf, dass es Unterschiede im Xyloglucanaufbau zwischen Wildtyp und *knock out*-Mutanten geben könnte (Abb.3.13). Vor allem die Doppelmutante  $\Delta UGD1x\Delta UGD4$  zeigte mehrere signifikante Abweichungen zum Wildtyp.



**Abbildung 3.13:**

**Quantitative Auswertung der in den MALDI-TOF MS-Analysen gewonnenen Daten von Xyloglucanfragmenten aus sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps Col-0 und der knock out-Mutanten  $\Delta UGD2$ ,  $\Delta UGD3$  und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$**

Zur Bestimmung des relativen Ionenbereichs wurde die Fläche unterhalb der einzelnen Ionensignale in Bezug zur Gesamtfläche unterhalb aller Signale eines Spektrums gesetzt. Die Daten repräsentieren jeweils den Mittelwert  $\pm$  SD aus Messungen zehn unabhängiger Zellwandpräparationen. \* signifikant verändert gegenüber Wildtyp ( $P < 0,05$ )

So war beispielsweise der Anteil der XXLG/XLXG-Fragmente bezogen auf die Gesamtmenge aller Xyloglucanfragmente leicht erhöht, während der Anteil der entsprechende O-acetylierte Variante von XXLG/XLXG erniedrigt war. Des Weiteren war der Anteil an O-acetylierten XXFG-Fragmenten in der Doppelmutante leicht erniedrigt, der Anteil an XLFG-Fragmenten leicht erhöht. Die *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD2$  und  $\Delta UGD3$  zeigten nur in Bezug auf die XLFG-Fragmente eine leichte Erhöhung des Anteils verglichen mit dem Wildtyp.

Auch für die HPLC-Analysen wurde die Zellwand sechs Tage alter Keimlinge verwendet. Bei dieser wurden zunächst alle Hexosen entfernt. Schließlich wurde nach einer Hydrolyse das Gemisch aus Monozuckern und Uronsäuren über eine HPLC-Säule aufgetrennt. Durch den Vergleich mit Zuckerstandards (siehe Kapitel 2.11) ließen sich die einzelnen Zucker der Zellwandproben eindeutig identifizieren und quantifizieren. Die Auswertung erfolgte durch die Integration der Flächen unter den jeweiligen Zuckerpeaks, dabei wurde die Summe aller gemessener Zucker gleich 100% und die einzelnen Peaks zueinander in Relation gesetzt. Eine Darstellung der freien Uronsäuren war in diesem Versuch aufgrund

des für Uronsäuren ungeeigneten Lösungsmittels nicht möglich. Pro untersuchten Genotyp wurden jeweils fünf unabhängige Zellwandpräparationen in die HPLC-Messungen eingesetzt.

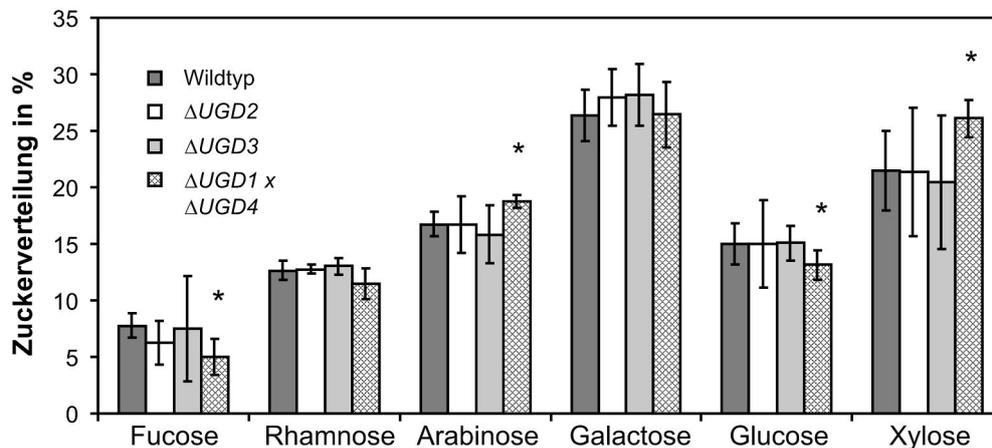


Abbildung 3.14:

**Relative Zuckerverteilung in Zellwänden sechs Tage alter Keimlinge des Wildtyps Col-0 und der knock out-Mutanten  $\Delta UGD2$ ,  $\Delta UGD3$  und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$**

Die Monozuckergesamtmenge wurde gleich 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren jeweils den Mittelwert  $\pm$  SD aus Messungen fünf unabhängiger Zellwandpräparationen. \*signifikant verändert gegenüber dem Wildtyp ( $P < 0,05$ )

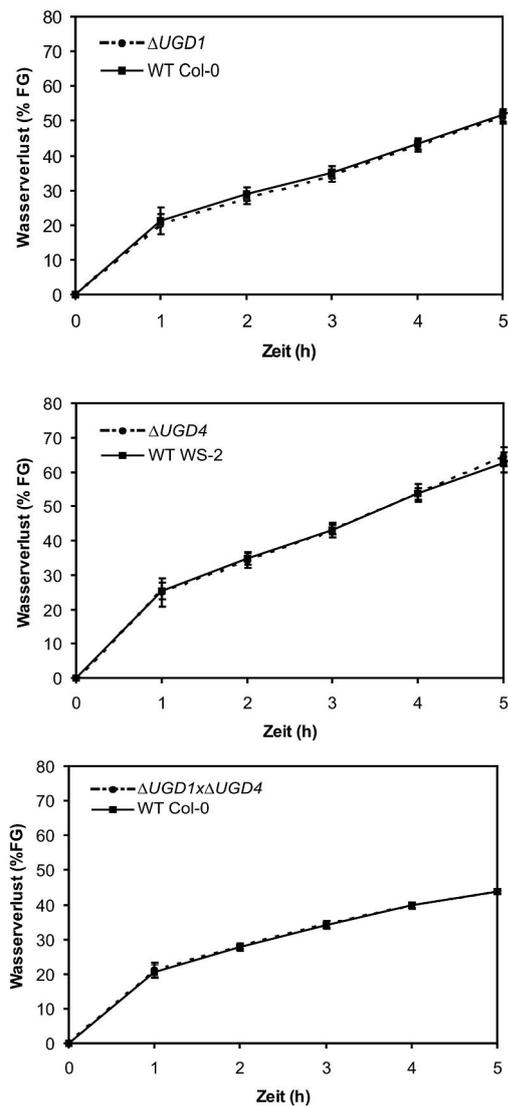
Die *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD2$  und  $\Delta UGD3$  zeigten keinen Unterschied in der Zuckerzusammensetzung der Zellwände gegenüber dem Wildtyp (Abb.3.14). Bei der Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  dagegen konnten Veränderungen festgestellt werden. So war der Anteil an Fucose (-36%) und Glucose (-12%) am Gesamtzuckergehalt der Zellwände signifikant erniedrigt ( $P < 0,05$ ), während der Anteil an Arabinose (+12%) und Xylose (+22%) erhöht war ( $P < 0,05$ ). Der Anteil an Rhamnose und Galactose war in der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

**Untersuchung der Stomata von  $\Delta UGD1$ -,  $\Delta UGD4$ - und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  knock out-Mutanten**

Die Analysen der *UGD1* Promotor::*GUS*- und *UGD4* Promotor::*GUS*-Pflanzen hatten gezeigt, dass sich ab dem vierten Tag nach der Keimung in den Stomata der Keimblätter eine *UGD1* Promotor::*GUS*- und eine *UGD4* Promotor::*GUS*-

Aktivität nachweisen ließ. Eine *UGD4* Promotor::GUS-Aktivität wurde außerdem in den Stomata der Blattstiele und der Hypokotyle gefunden. Eine *UGD1* Promotor::GUS-Aktivität konnte außerdem in den Stomata junger Blätter von 14 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen nachgewiesen werden (siehe auch Abb.3.8). Es lag also nahe anzunehmen, dass das Ausschalten des *UGD1*- oder des *UGD4*-Gens bzw. beider Gene eine Veränderungen in Funktion oder Aufbau der Stomata mit sich bringt. In allen Versuchen wurden die *knock out*-Mutantenlinien  $\Delta UGD1$  Garlic 347\_B03\_21 L1-1,  $\Delta UGD4$  Wisconsin 9C40 L1-2 und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  L1-7 verwendet. Als Kontrolle dienten Wildtyppflanzen *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Col-0 und WS-2. Zunächst wurden die Stomata der *knock out*-Mutanten im Mikroskop auf sichtbare Veränderungen im Aufbau untersucht. Optisch war jedoch kein Unterschied zwischen den Stomata der Mutanten und den Stomata des Wildtyps zu erkennen.

Des Weiteren wurde untersucht, in wieweit die Mutanten in der Lage waren bei Trockenstress durch Schließen der Stomata einen Wasserverlust zu verhindern. Dazu wurden bei vier Wochen alten Pflanzen die Blattrosetten von den Wurzeln getrennt und bei 22-24°C und einer Luftfeuchte von 28-31% liegend gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde das Gewicht der Blattrosetten bestimmt. Die Abnahme des Frischgewichtes (FG) im Laufe der Zeit wurde als Maß für den Wasserverlust genommen. Bei einer Veränderung in der Funktionalität der Stomata der Mutanten sollte es zu einem stärkeren oder einem schwächeren Wasserverlust in der gleichen Zeit kommen als beim Wildtyp. Wie in Abbildung 3.15 zu sehen, kam es bei keiner der drei untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten zu einer Veränderung in der Geschwindigkeit des Wasserverlusts gegenüber der Wildtyp-Kontrolle. Der Wasserverlust selbst verlief zunächst schnell, so dass nach einer Stunde schon 20-25% des Frischgewichtes verloren gegangen waren, später dann langsamer. Nach fünf Stunden hatten die Pflanzen des Ökotyps Col-0 (WT Col-0,  $\Delta UGD1$  und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ ) knapp 50% ihres ursprünglichen Frischgewichtes eingebüßt, die Pflanzen des Ökotyps WS-2 (WT WS-2 und  $\Delta UGD4$ ) sogar 60%.

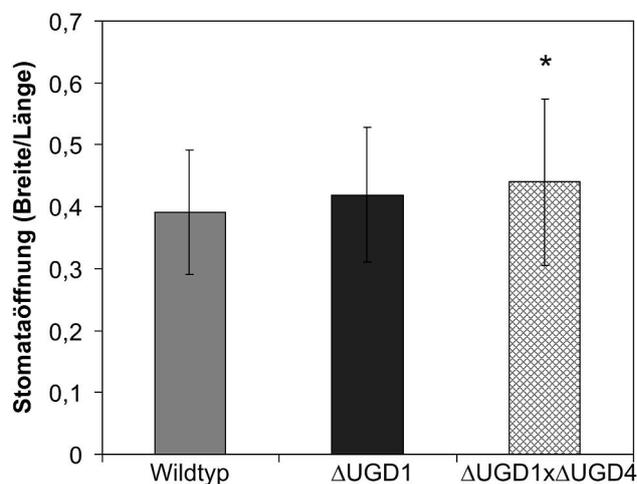


**Abbildung 3.15:** Wasserverlust (als % des ursprünglichen Frischgewichtes FG) in von Wurzeln getrennten Blattosetten von  $\Delta UGD1$ ,  $\Delta UGD4$  und  $\Delta UGD1x\Delta UGD4$  knock out-Mutanten und Wildtyppflanzen (WT Col-0 oder WS-2) im Laufe der Zeit

Mutanten und Wildtyppflanzen wurden jeweils in einem Topf angezogen. Pro Versuch wurden jeweils 12 Pflanzen eines Genotyps eingesetzt, gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

In einem weiteren Versuch wurde die Öffnung der Stomata in Keimblättern untersucht. Dazu wurden 14 Tage alte Keimlinge der *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD1$  und  $\Delta UGD1x\Delta UGD4$  und des Wildtyps *Arabidopsis thaliana* Col-0 für 16h dunkel adaptiert und für 2,5h in 20mM KCl, 0,5% CaCl<sub>2</sub> im Licht inkubiert, um die Öffnung der Stomata zu induzieren. Anschließend wurden von der oberen Epidermis der Keimblätter Nagellackabzüge hergestellt, die unter dem Lichtmikroskop untersucht wurden. Als Maß für die Stomataöffnung wurde das Verhältnis von Breite zu Länge des Spalts bestimmt. Pro Genotyp wurden mehr als 70 Stomata unterschiedlicher Blätter ausgezählt. Die Blätter stammten aus Mischproben von mindestens fünf verschiedenen Keimlingen. Die Messungen

ergaben eine durchschnittliche Stomataöffnung (Breite/Länge) von  $0,39 \pm 0,10$  für die Stomata der Kotyledonen des Wildtyps,  $0,42 \pm 0,11$  für die der  $\Delta UGD1$ - und  $0,44 \pm 0,13$  für die der  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ -Keimblätter nach 2,5h Inkubation im Licht (Abb. 3.16). Die durchschnittliche Stomataöffnung des Wildtyps in diesem Versuch entspricht damit Werten in der Literatur (Klein *et al.*, 2004). Die durchschnittliche Größe des stomatären Spalts bei den Doppelmutanten dagegen war gegenüber der Größe bei den Wildtyppflanzen signifikant um 13% erhöht ( $P < 0,05$ ). Zwischen Wildtyp und  $\Delta UGD1$ -Mutanten ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.



**Abbildung 3.16:**

**Stomataöffnung (Breite/Länge) bei  $\Delta UGD1$  und**

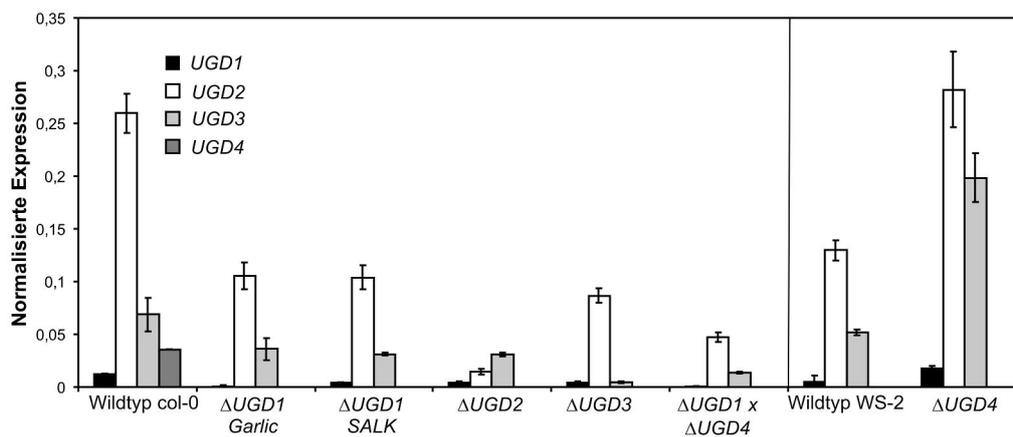
**$\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  knock out-Mutanten und Wildtyppflanzen (Ökotyp Col-0)**

14 Tage alte Keimlinge wurden zunächst 16h dunkel adaptiert, dann 2,5h im Schwachlicht inkubiert. Anschließend wurde die Stomataöffnung bestimmt ( $n > 70$ ), gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. \* signifikant verändert gegenüber Wildtyp ( $P < 0,05$ ).

**Die Expression von UGD1, 2, 3 und 4 in sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der knock out-Mutanten**

Auf der Suche nach Unterschieden zwischen *knock out*-Mutanten und Wildtyppflanzen wurde auch untersucht, ob sich das Ausschalten eines bzw. zweier *UGD*-Gene auf die Expression der anderen, noch intakten Isoformgene auswirkt. Dabei wäre beispielsweise eine Kompensation denkbar, d.h. das Ausfallen einer Isoform würde durch eine andere Isoform aufgefangen, in dem diese vermehrt exprimiert würde. Für diesen Versuch wurde die Gesamt-RNA aus

sechs Tage alten, steril im Licht gewachsenen Keimlingen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde anschließend in einer *real time*-PCR-Reaktion eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen wurden dreifach und zusammen mit einer Nullkontrolle, die keine cDNA enthielt, durchgeführt und enthielten jeweils die gleiche Menge an cDNA. Die erhaltenen  $C_T$ -Werte wurden gemittelt und durch den Bezug auf die  $C_T$ -Werte des *house keeping*-Gens *UBQ5* normalisiert. In Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse der *real time*-PCR dargestellt. Auch in dieser Analyse wurde noch einmal bestätigt, dass es sich bei den verwendeten Mutanten um echte *knock out*-Mutanten handelt, bei denen die Expression der entsprechenden *UGD*-Gene ausgeschaltet ist (siehe auch Kapitel 3.4). Des Weiteren zeigten die beide unabhängigen *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD1$  Garlic und  $\Delta UGD1$  SALK ein fast identisches Verhalten.



**Abbildung 3.17:**

**Quantitative Expressionsanalyse (real time-PCR) der UGD-Transkripte in Keimlingen der *knock out*-Mutanten und des Wildtyps von *Arabidopsis thaliana***

Für die Analysen wurden sechs Tage alte Keimlinge verwendet, die steril auf MS-Medium mit 0,5% Saccharose im Licht angezogen wurden. Die Daten sind dargestellt als normalisierte Expression bezogen auf die Menge an *UBQ5*-Transkript, die eins gesetzt wurde. Die einzelnen Werte die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Messungen.

Das Ausschalten eines oder zweier *UGD*-Gene führte zu deutlichen Veränderungen in der Expression der restlichen *UGD*-Gene. In den Mutanten  $\Delta UGD1$  Garlic und SALK,  $\Delta UGD2$  und  $\Delta UGD3$  ging neben der Expression des jeweils ausgeschalteten Gens auch die Expression der übrigen *UGD*-Gene gegenüber der Expression im Wildtyp um etwa 40-60% zurück. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt bei der Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ . Die normalisierte Expression von *UGD2* und *UGD3* lag hier nur noch bei etwa 20%

der Werte des Wildtyps. Ganz anders reagierte die Mutante  $\Delta UGD4$ . Das Ausschalten des *UGD4*-Gens bewirkte eine Steigerung der Expressionsrate von *UGD1* und *UGD3* um das Dreifache, von *UGD2* um das Doppelte gegenüber den Werten des Wildtyps.



## 4 DISKUSSION

Die Zellwand von *Arabidopsis thaliana* enthält große Menge an Hemicellulosen und Pektinen, deren Bestandteile sich hauptsächlich von UDP-Glucuronsäure ableiten lassen (Zabackis *et al.*, 1995). Die Bildung von UDP-Glucuronsäure wird in Pflanzen zum einen durch die UDP-Glucose Dehydrogenase (UGD) katalysiert. Diese wandelt UDP-Glucose in UDP-Glucuronsäure um. Zum anderen kann Glucuronsäure aber auch aus *myo*-Inosit durch die *myo*-Inosit Oxygenase (MIOX) gebildet werden (Kärkönen, 2005). Als Schaltstellen, an welchen der Kohlenstofffluss der pflanzlichen Zelle in Richtung Zellwandbiosynthese gesteuert werden kann, kommt beiden Enzymen eine besondere Bedeutung zu.

In dieser Arbeit wurde die Genfamilie der UDP-Glucose Dehydrogenasen aus *Arabidopsis thaliana* näher untersucht. Mit Hilfe der durch das *Arabidopsis* Genom-Projekt und die EST-Datenbanken zur Verfügung stehenden Daten konnten vier *UGD*-Gene und ein Pseudogen identifiziert werden (siehe Kapitel 3.1). Die Kürze des Pseudogens und dessen Homologie von nur 30% zu den anderen vier Isoformen ließen vermuten, dass es sich hier nicht um ein weiteres funktionstüchtiges *UGD*-Gen handelt, sondern es könnte im Laufe der Evolution eine unvollständige Genduplikation stattgefunden haben. So weist beispielsweise der Bereich zwischen At3g01010–At3g02020 auf Chromosom 3, in dem sich das Pseudogen befindet, eine Ähnlichkeit zu dem Bereich zwischen At5g15510–At5g14060 auf Chromosom 5 auf, in dem sich das *UGD3*-Gen antreffen läßt. Die vier *UGD*-Gene, vor allem aber die Aminosäuresequenzen der resultierenden Proteine, zeigen starke Homologien zu anderen bekannten pflanzlichen UDP-Glucose Dehydrogenasen. Dabei sind drei der vier *UGD*-Isoformen aus *Arabidopsis* sehr eng miteinander verwandt, während sich eine Isoform (*UGD1*) deutlich von den anderen unterscheidet (siehe Abb.3.1). Sowohl bei *UGD1* als auch bei den anderen drei Isoformen ließen sich Aminosäurereste nachweisen, die bei der *UGD* aus *Streptococcus pyogenes* (Campbell *et al.*, 2000) und der humanen *UGD* (Sommer *et al.*, 2004) sowohl für die Substratbindung als auch für die Katalyse und die Hexamerbildung essentiell zu sein scheinen (siehe Abb.3.2). Aufgrund der Unterschiede in der Aminosäuresequenz von *UGD1* zu den

anderen drei Isoformen lag die Vermutungen nahe, dass sich dies auch auf die biochemischen Eigenschaften des Enzyms auswirken könnte.

#### **4.1 ALLE VIER UGD-GENE IN ARABIDOPSIS THALIANA CODIEREN FÜR UDP-GLUCOSE DEHYDROGENASEN**

Allein durch Sequenzvergleiche und bioinformatische Analysen lassen sich keine zuverlässigen Aussagen über die tatsächliche Funktion und die biochemischen Eigenschaften von Enzymen treffen. Daher wurden in dieser Arbeit die vier UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* zur näheren Charakterisierung in *E. coli* heterolog exprimiert. In ausreichender Menge und in einer aktiven Form konnten dabei UGD2, 3 und 4 hergestellt werden (siehe Abb.3.4). UGD1 dagegen wurde zwar exprimiert, lag jedoch inaktiv vor (siehe Abb.3.5).

Die erfolgreiche heterologe Expression von UDP-Glucose Dehydrogenasen in *E. coli* wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (u.a. Hinterberg *et al.* (2002) für *Gm*-UGD1 aus *Glycine max*; Ge *et al.* (2004) für die UGD aus *Streptococcus pyogenes*; Sommer *et al.* (2004) für die humane UGD). Allerdings wiesen Ge *et al.* (2004) darauf hin, dass schon der Austausch einzelner Aminosäuren zu Problemen bei der heterologen Expression von UGD aus *Streptococcus pyogenes* in *E. coli* führen kann. Da sich UGD1, wie oben erwähnt, in der Aminosäuresequenz deutlich von den anderen drei Isoformen unterscheidet, wäre es denkbar, dass dieser Unterschied die Expression einer aktiven Form des Enzyms in *E. coli* verhindert hat. Generell ist die Expression eines eukaryontischen Gens in dem Prokaryonten *E. coli* schwierig und führt oft zu so genannten *inclusion bodies*, Ansammlungen aus fehlerhaft oder unvollständig gefalteten Fremdproteinen. Als Gründe dafür werden die Unterschiede im Proteinfaltungssystem zwischen Pro- und Eukaryonten diskutiert (Oka & Jigami, 2006). Auch in der Häufigkeit der verwendeten Codons unterscheiden sich Pro- und Eukaryonten deutlich voneinander (Novy *et al.*, 2001). So werden in *Arabidopsis thaliana* oft Arginin-reiche Codons wie AGA und AGG verwendet, die in *E. coli* eher selten vorkommen (Nakamura *et al.*, 2000). Dies könnte erklären, warum sich bestimmte pflanzliche Proteine nur schlecht in *E. coli* herstellen lassen. Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu umgehen, ist die heterologe

Expression der Proteine in *Saccharomyces cerevisia*. Tatsächlich gelang es Oka und Jigami (2006) UGD1 aus *Arabidopsis thaliana* erfolgreich in Hefe zu exprimieren und näher zu charakterisieren. Dabei konnte bestätigt werden, dass es sich bei UGD1 um eine UDP-Glucose Dehydrogenase handelt.

Analog dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit UGD2, 3 und 4 eindeutig als UDP-Glucose Dehydrogenasen identifiziert und näher charakterisiert. Die Aktivitätsnachweise erfolgten zunächst indirekt über Messung der NADH-Zunahme im Photometer. Anschließend zeigten HPLC-Analysen, dass es sich hier tatsächlich um den Umsatz von UDP-Glucose zu UDP-Glucuronäure handelt (Klinghammer & Tenhaken, 2007).

## **4.2 DIE VIER UGD-ISOFORMEN BESITZEN UNTERSCHIEDLICHE BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN UND WERDEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERT**

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten für UDP-Glucose und  $\text{NAD}^+$  in dieser Arbeit zeigte, dass sich die drei untersuchten Isoformen UGD2, 3 und 4 bezüglich ihrer Affinität zu dem Cofaktor  $\text{NAD}^+$  kaum unterschieden (siehe Abb.3.6). Für das Substrat UDP-Glucose wurden dagegen  $K_m$ -Werte zwischen  $123\mu\text{M}$  (UGD2) und  $335\mu\text{M}$  (UGD3) gemessen (siehe Abb.3.6).

Oka und Jigami (2006) fanden bei UGD1 einen wesentlich niedrigeren  $K_m$ -Wert für UDP-Glucose ( $15,3\mu\text{M}$ ), ein  $K_m$ -Wert für  $\text{NAD}^+$  wurde nicht bestimmt. Damit unterscheiden sich die vier UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* in ihren  $K_m$ -Werten für UDP-Glucose deutlich voneinander. Bisher liegt nur eine weitere Studie vor, in der die  $K_m$ -Werte verschiedener UGD-Isoformen einer Pflanze ermittelt wurden: Zwei UGD-Isoformen aus Mais wiesen ebenfalls große Unterschiede in ihrer Affinität zu UDP-Glucose auf. Die  $K_m$ -Werte lagen hier bei  $380$  bzw.  $950\mu\text{M}$  UDP-Glucose (Kärkönen *et al.*, 2005). Insgesamt variieren die  $K_m$ -Werte der bisher näher charakterisierten pflanzlichen UDP-Glucose Dehydrogenasen über einen großen Bereich. Im Vergleich zu den UGDs aus *Arabidopsis* und Mais haben z.B. *Gm*-UGD1 aus *Glycine max* mit einem  $K_m$ -Wert von  $22\mu\text{M}$  (Hinterberg *et al.*, 2002) und die UGD aus Zuckerrohr mit einem  $K_m$ -

Wert von  $19\mu\text{M}$  (Turner & Botha, 2002) eine wesentlich höhere Affinität zu UDP-Glucose.

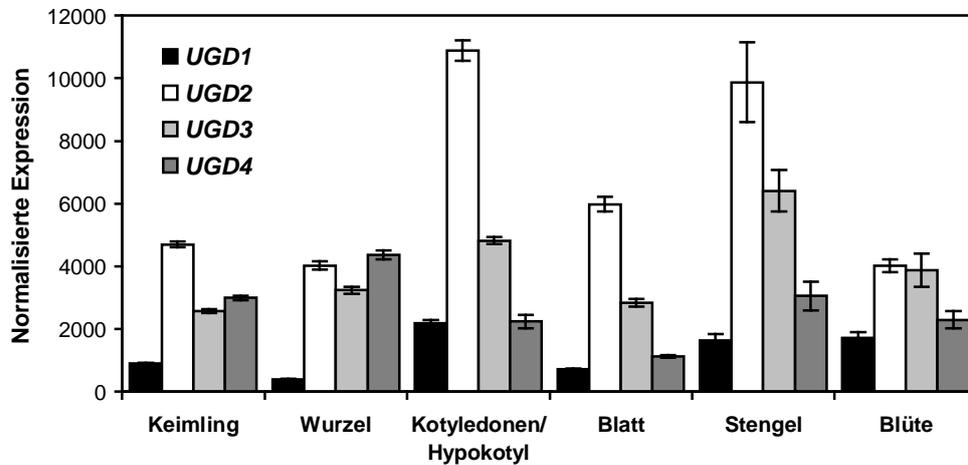
Zur weiteren Charakterisierung der Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit außerdem Hemmstoffversuche mit UDP-Xylose durchgeführt, die als unmittelbares Folgeprodukt der UDP-Glucuronsäure bei allen bisher untersuchten pflanzlichen UDP-Glucose Dehydrogenasen eine starke *feed back*-Hemmung bewirkte (Hinterberg *et al.*, 2002; Turner & Botha, 2002; Oka & Jigami, 2006). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen einer hohen Affinität zu UDP-Glucose und einer starken Hemmung durch UDP-Xylose. Die  $K_i$ -Werte für UGD2, 3 und 4 lagen zwischen  $83$  und  $124\mu\text{M}$  UDP-Xylose (siehe Abb.3.7), wobei UGD3 mit dem höchsten  $K_m$ -Wert für UDP-Glucose auch den höchsten  $K_i$ -Wert für UDP-Xylose aufwies, während umgekehrt UGD2 sowohl den niedrigsten  $K_m$ -Wert für UDP-Glucose als auch den niedrigsten  $K_i$ -Wert zeigte. In dieses Bild passen die Untersuchungen von Oka und Jigami (2006) zur Hemmstoffwirkung von UDP-Xylose auf UGD1, welche von allen UGD-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* die höchste Affinität zu UDP-Glucose besitzt (siehe oben). Entsprechend weist sie mit einem  $K_i$ -Wert von  $4,9\mu\text{M}$  auch die stärkste Hemmung durch UDP-Xylose auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wären strukturelle Modifikationen, z.B. der Substratbindetasche, die gleichzeitig sowohl für eine höhere Substrat- als auch für eine höhere Hemmstoffaffinität verantwortlich sein könnte.

In meiner Arbeit wurde außerdem untersucht, ob UGD2, 3 und 4 neben  $\text{NAD}^+$  und UDP-Glucose auch andere Substrate akzeptieren (siehe Tab.3.1). Es zeigte sich, dass alle drei Enzyme in geringem Maße auch  $\text{NADP}^+$  statt  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor verwenden können. Die Enzymaktivität verringert sich dadurch jedoch um etwa 80%. Die angebotenen, alternativen Zuckersubstrate dagegen konnten von keiner der drei untersuchten Isoformen umgesetzt werden. Eine Akzeptanz von  $\text{NADP}^+$  als Cofaktor konnte auch bei *Gm*-UGD1 aus *Glycine max* nachgewiesen werden, allerdings lag die Aktivität hier unter 1% der Ursprungsaktivität (Hinterberg *et al.*, 2002). Alle anderen näher charakterisierten, pflanzlichen UDP-Glucose Dehydrogenasen zeigten beim Ersetzen von  $\text{NAD}^+$  durch  $\text{NADP}^+$  keine Aktivität (Stewart & Copeland, 1998; Turner & Botha, 2002). Bei der Verwendung alternativer Zuckersubstrate konnten bei der UGD aus

Zuckerrohr (Turner & Botha, 2002) und bei einer UGD aus *Glycine max* (Stewart & Copeland, 1998) geringe Enzymaktivitäten (zwischen 0,5 und 8% der Ursprungsaktivität) festgestellt werden: Die UGD aus Zuckerrohr setzte neben CDP-Glucose auch TDP-Glucose um, die UGD aus *Glycine max* TDP-Glucose, UDP-Galactose und UDP-Mannose. Insgesamt sind jedoch die Aktivitäten bei Verwendung von Alternativsubstraten in allen bekannten Fällen so gering, dass davon auszugehen ist, dass eine physiologische Bedeutung nicht vorliegt.

Neben biochemischen Unterschieden konnten in dieser Arbeit auch Abweichungen in der Genexpression zwischen den vier *UGD*-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* festgestellt werden. Dabei wurden diese nicht nur in verschiedenen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Morphogenese exprimiert, sondern variierten auch in ihrer Expressionsstärke. Färbeversuche mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, die ein *UGD* Promotor::GUS-Konstrukt enthielten, zeigten, dass in nahezu jedem Gewebe GUS-Aktivität nachweisbar war (siehe Abb.3.8). Die GUS-Aktivitätsmuster in *UGD2*, *UGD3* und *UGD4* Promotor::GUS-Pflanzen waren sich dabei zwar ähnlich, unterschieden sich jedoch in einigen Details (siehe Abb.3.9). Dagegen zeigten *UGD1* Promotor::GUS-Pflanzen vor allem im Keimlingsstadium und in der Schotenentwicklung ein konträres GUS-Aktivitätsmuster. In Keimlingen wurde *UGD1* zunächst nur im Hypokotyl und in den Kotyledonen exprimiert, während die Expression der anderen drei Isoformen auf die Primärwurzel beschränkt blieb. Auch in den Schoten wurde *UGD1* entgegengesetzt zu den anderen Isoformen exprimiert. Neben *UGD4* war *UGD1* außerdem die einzige Isoform, die in den Stomata exprimiert wurde (siehe Abb.3.9). Damit scheint *UGD1* auch auf Expressionsebene eine Sonderstellung innerhalb der *UGD*-Isoformen in *Arabidopsis thaliana* innezuwohnen. Dieser Eindruck wird verstärkt, schaut man nicht nur die Expressionszeitpunkte und -orte, sondern auch die Expressionsstärke der vier *UGD*-Isoformen an. Mittels *real time*-PCR konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass in sechs Tage alten im Licht oder im Dunkel gewachsenen Keimlingen *UGD2* am stärksten exprimiert wird (siehe Abb.3.10). Die Expressionsstärke von *UGD1* und *UGD4* ist im Vergleich dazu sehr gering. Unterscheidet man in Hypokotyl/Kotyledonen und Wurzel, so wird die Dominanz der *UGD2*-Genexpression vor allem in den oberirdischen

Pflanzenteilen deutlich, während in der Wurzel die Expressionsstärke von *UGD2* und *UGD3* nahezu identisch ist (siehe Abb.3.10).



**Abbildung 4.1:**  
Normalisierte Expression von *UGD1*, *UGD2*, *UGD3* und *UGD4* in unterschiedlichen Geweben von *Arabidopsis thaliana*

Alle Daten entstammen der Microarray-Datenbank Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>). Die Werte unterhalb einer normalisierten Expression von 250 sind als Rauschen zu werten. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

Öffentlich zugängliche Daten verschiedener *Microarray*-Experimente (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) bestätigen die Ergebnisse der *real time*-PCR (Abb.4.1). Sie zeigen außerdem, dass *UGD2* auch im Blatt, im Stengel und in der Blüte die am stärksten exprimierte *UGD*-Isoform ist, während *UGD1* in diesen Gewebetypen nur schwach exprimiert wird. Die in den *Microarray*-Experimenten gemessene Genexpression von *UGD4* ist dagegen in allen Geweben etwas höher als die in der *real time*-PCR gefundene (siehe Abb.3.10). Über die Expressionsorte, -zeitpunkte und -stärken der Gene anderer pflanzlicher UDP-Glucose Dehydrogenasen liegen bisher nur wenige Daten vor. Insgesamt scheint auch deren Expression vor allem in jungem, im Wachstum begriffenem Gewebe vorzukommen (Karkönen, 2005), wie in den Internodien von Zuckerrohr (Turner & Botha, 2002), in sich entwickelndem Xylem und in jungen oder älteren Blättern von Pappel (Johansson *et al.*, 2002) oder in Blättern und Wurzeln von Mais (Karkönen *et al.*, 2005).

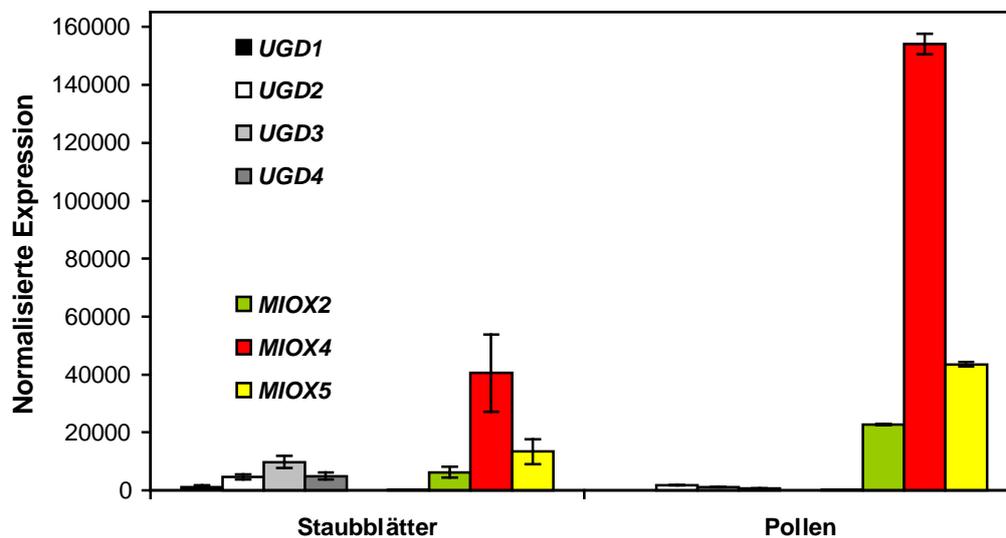
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die vier *UGD*-Gene in *Arabidopsis thaliana* sowohl in ihren Expressionsmustern als auch in ihrer

Expressionsstärke zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Dabei wird *UGD1* in wesentlich geringerem Maße exprimiert als die andere drei *UGD*-Isoformen und besitzt zum andere Expressionsorte und -zeitpunkte. Weiterhin lässt sich aufgrund der in dieser Arbeit gewonnene Daten schließen, dass sich die drei untersuchten *UGD*-Isoformen *UGD2*, 3 und 4 in ihren biochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Ein Vergleich mit *UGD1* auf biochemischer Ebene ist nur bedingt möglich, da *UGD1* im Rahmen dieser Arbeit nicht in einer aktiven Form exprimiert werden konnte. Es existieren jedoch durch die Daten aus der Arbeit von Oka & Jigami (2006) Evidenzen, dass auch hier Unterschiede zu den anderen drei Isoformen bestehen. Diese biochemischen Unterschiede und die differentielle Expression der entsprechenden Gene könnten eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellwandbiosynthese spielen. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um entsprechende Regulationsmechanismen aufzuklären.

#### **4.3 DIE EXPRESSION DER *UGD*- UND *MIOX*-GENE IM VERGLEICH**

Wie bereits erwähnt scheint zu jedem Zeitpunkt der Morphogenese in *Arabidopsis thaliana*, eine der vier *UGD*-Isoformen exprimiert zu werden. Überraschenderweise wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit bei der Samenentwicklung keine *UGD*-Expression gefunden. Es lag daher die Vermutung nahe, dass UDP-Glucuronsäure im Samen eventuell nicht über den *UGD*-, sondern über den *MIOX*-Weg gebildet wird (siehe Abb.1.3). Und tatsächlich zeigte ein Vergleich mit entsprechenden Expressionsdaten der vier *MIOX*-Gene aus *Arabidopsis thaliana*, dass sowohl *MIOX1* als auch *MIOX2* und 4 in den Samenanlagen und in jungen Samen exprimiert werden (Kanter *et al.*, 2005; Kanter, 2006). Durch die Kreuzung zweier *Arabidopsis*-Pflanzen mit unterschiedlichen Promotor::Reportergenkonstrukten (*MIOX2::GUSx* *UGD2::GFP*) konnte Kanter (2006) die Expressionsmuster von *UGD2* und *MIOX2* direkt vergleichen und fand neben dem Unterschied in der Expression bei der Samenentwicklung weitere Gegensätze; u.a. in der Primärwurzel, wo *MIOX2* in den Kortex- und Epidermiszellen exprimiert wird, während sich

*UGD2*-Expression vor allem in der Wurzelspitze und im Zentralzylinder finden lässt. Schaut man sich die Expression aller *MIOX*-Gene an, so zeigt sich, dass *MIOX4* und *5* ausschließlich in generativem Gewebe abgelesen werden, während *MIOX1*- und *MIOX2*-Expression in der gesamten Pflanze zu finden ist (Kanter *et al.*, 2005; Kanter, 2006). Allerdings scheint die Expressionsstärke der *MIOX*-Gene in den meisten Geweben wesentlich geringer zu sein, als die der *UGD*-Gene, wie ein Vergleich von öffentlichen zugänglichen Daten aus verschiedenen *Microarray*-Experimenten (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) zeigt (Daten nicht gezeigt). Einzig im Pollen und in den Staubblättern weisen die *MIOX*-Gene ein sehr hohes Expressionslevel auf (Abb.4.2).



**Abbildung 4.2:**  
**Normalisierte Expression von *UGD1*, *UGD2*, *UGD3*, *UGD4* und *MIOX1*, *MIOX2*, *MIOX4*, *MIOX5* in Staubblättern und Pollen von *Arabidopsis thaliana***  
 Alle Daten entstammen der Microarray-Datenbank Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>). Die Werte unterhalb einer normalisierten Expression von 250 sind als Rauschen zu werten. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

So ist beispielsweise die Expression von *MIOX4* in diesen Geweben etwa viermal bzw. sogar 85mal höher als die höchste Expression der *UGD*-Gene. In allen anderen Blütengeweben werden jedoch die *UGD*-Gene, vor allem *UGD2*, stärker als die *MIOX*-Gene exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Damit scheinen beide Stoffwechselwege zur UDP-Glucuronsäuresynthese eine Rolle in *Arabidopsis thaliana* zu spielen. Vermutlich existieren sie in

bestimmten Geweben parallel nebeneinander (beispielsweise in Blättern, Filamenten oder Kelchblättern), zu bestimmten Zeitpunkten der Morphogenese jedoch scheint jeweils nur einer der beiden Wege verwendet zu werden (beispielsweise bei der Samenentwicklung). In den generativen Geweben, besonders in Staubblättern und Pollen, scheint UDP-Glucuronsäure vor allem über den *myo*-Inosit Oxygenase-Weg synthetisiert zu werden. Untersuchungen an der UDP-Zucker Pyrophosphorylase (*AtUSP*) aus *Arabidopsis thaliana*, die im Rahmen des *myo*-Inosit Oxygenaseweges Glucuronsäure-1-P in UDP-Glucuronsäure umwandelt (siehe Abb.1.3), stützen diese Vermutung. Mutanten, bei denen durch eine T-DNA-Insertion das Gen *AtUSP* ausgeschaltet war, fehlte die innere Wand (Intine) der Pollen, was dazu führte, dass diese kollabierten und nicht lebensfähig waren (Schnurr *et al.*, 2006). *AtUSP* scheint also essentiell für die Entwicklung lebensfähiger Pollen zu sein, was wiederum auf die Wichtigkeit des MIOX-Weges im Pollen hinweist. In allen anderen Geweben erfolgt die Synthese wahrscheinlich hauptsächlich über UGD. Dies lässt sowohl das EST-Verhältnis zwischen *UGD* und *MIOX* (Kanter, 2006), als auch der Vergleich entsprechender *Microarray*-Daten aus verschiedenen Geweben vermuten (Abb.4.2). Für diese Annahme spricht ebenfalls die eingeschränkte Expression von *MIOX 4* und *5*, die sich fast ausschließlich auf die generativen Gewebe beschränkt. Abschließende Aussagen über zelluläre Regulationsmechanismen zwischen beiden Wegen können im Rahmen dieser Arbeit nicht gemacht werden. Hierzu müssten weitere Untersuchungen folgen. So könnte beispielsweise das Redoxpotential oder die Verfügbarkeit molekularen Sauerstoffs, der für den *myo*-Inosit Oxygenaseweg benötigt wird, eine Rolle spielen.

#### **4.4 DIE ARABIDOPSIS THALIANA UGD KNOCK OUT-MUTANTEN UNTERSCHIEDEN SICH IN IHREN PHÄNOTYPEN VOM WILDTYP**

Eine Möglichkeit die Funktion eines Enzyms näher zu charakterisieren, ist die Analyse von Pflanzen, in denen das entsprechende Gen durch eine T-DNA-Insertion funktionell ausgeschaltet ist. Durch das Auftreten von Veränderungen

im Phänotyp der Mutanten können Rückschlüsse gezogen werden, wann und wo das Enzym benötigt wird.

### **Herausforderungen bei der Herstellung von Doppelmutanten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Arabidopsis thaliana* Mutanten, bei denen jeweils ein *UGD*-Gen ausgeschaltet war, mit Hilfe verschiedener Methoden auf das Auftreten eines Phänotyps untersucht, der sich signifikant von dem des Wildtyps unterscheidet. Da Färbeversuche mit *UGD* Promotor::GUS-Pflanzen gezeigt hatten, dass in einem Gewebe oft zeitgleich mehrere *UGD*-Gene exprimiert werden (siehe Kapitel 3.3), wurde außerdem versucht, durch Kreuzungen Mehrfachmutanten zu generieren, in denen mindestens zwei *UGD*-Gene gleichzeitig ausgeschaltet sind. Durch die Verwendung von Mehrfachmutanten sollte eine Kompensation des ausgeschalteten Gens durch andere, noch intakte *UGD*-Gene ausgeschlossen werden, da es bei einer schwierig wäre einen gegenüber dem Wildtyp veränderten Phänotyp zu finden.

Eine Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ , bei der die Insertionen in beiden Genen homozygot vorlagen, ließ sich problemlos herstellen (siehe Kapitel 3.4). Schwierigkeiten verursachte dagegen das Generieren einer  $\Delta UGD2 \times \Delta UGD3$ -Doppelmutante, da keine Pflanzen gefunden werden konnten, die beide Insertionen homozygot enthielten (siehe Kapitel 3.4). Ein Grund könnte sein, dass das gleichzeitige Ausschalten von *UGD2* und *UGD3* für die Pflanze pathologische Auswirkungen hat. Schließlich sind *UGD2* und *3* die beiden *UGD*-Gene, die in *Arabidopsis thaliana* mit Abstand am stärksten exprimiert werden und in nahezu jedem Gewebe vertreten sind. *UGD1* und *4* dagegen werden auf einem geringeren Level zum Teil nur in bestimmten Geweben exprimiert. Weitere Doppel-, Dreifach- oder sogar eine Vierfachmutante konnten aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands von mehr als einem Jahr für Kreuzung und anschließendem *Screening* im Rahmen dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Für die Untersuchung der Phänotypen wurden daher die Einfachmutanten und die Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  verwendet (siehe Tab.3.2). Dabei wurden nur die Mutanten in den Versuchen eingesetzt, bei denen aufgrund der Expressionsanalysen durch GUS-Reporterpflanzen und *real time*-PCR ein veränderter Phänotyp zu erwarten war.

### **Veränderte Zellwandzusammensetzung bei den Mutanten $\Delta UGD2$ , $\Delta UGD3$ und $\Delta UGD1x \Delta UGD4$**

Die Zellwandzusammensetzung der Mutanten  $\Delta UGD2$ ,  $\Delta UGD3$  und  $\Delta UGD1x \Delta UGD4$  wurde zunächst durch MALDI-TOF Massenspektrometrie näher untersucht (siehe Kapitel 3.5). Diese bietet sich als schnelle und effiziente Analysemethode an, um pflanzliche Mutanten mit Veränderungen in der Xyloglucanstruktur zu identifizieren (Lerouxel *et al.*, 2002). Es konnten keine grundsätzlichen Unterschiede im Xyloglucanaufbau zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt werden, das heißt beim Wildtyp und bei den Mutanten ließen sich die gleichen Xyloglucanfragmente nachweisen (siehe Abb.3.12). Allerdings lagen diese Fragmente in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander vor (siehe Abb.3.13). Bei der Doppelmutante  $\Delta UGD1x \Delta UGD4$  waren die Abweichungen zum Wildtyp am deutlichsten ausgeprägt. Auch bei den darauf folgenden HPLC-Analysen, bei denen die Monozuckerzusammensetzung der neutralen Zucker aus Zellwänden bestimmt wurde, konnten Unterschiede zwischen der Doppelmutante und dem Wildtyp gefunden werden (siehe Abb.3.14).  $\Delta UGD2$ - und  $\Delta UGD3$ -Pflanzen zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Wildtyp.

Damit konnte hier erstmals bewiesen werden, dass das Ausschalten eines oder mehrerer *UGD*-Gene zu einer Veränderung in der Zellwandzusammensetzung führt. Allerdings sind die Unterschiede gegenüber dem Wildtyp bei den Einfachmutanten so gering, dass der Verlust nur eines *UGD*-Gens wahrscheinlich durch die anderen *UGD*-Gene kompensiert werden kann. Dies ist vor allem beim Ausschalten von *UGD2* oder *3* denkbar, da beide Gene meist parallel exprimiert werden und die eine Isoform die Funktion der jeweils anderen übernehmen könnte. Wenn jedoch mehrere *UGD*-Gene, hier *UGD1* und *UGD4*, ausgeschaltet sind, scheint eine vollständige Kompensation nicht mehr möglich zu sein und ein zum Wildtyp deutlich unterschiedlicher Phänotyp lässt sich finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden auch durch Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gestützt, bei denen jeweils ein *MIOX*-Gen ausgeschaltet war (Kanter, 2006). Dort ergab sich ein ähnlicher Sachverhalt: In den mittels GC-MS, MALDI-TOF MS und HPLC durchgeführten Analysen konnten keine

Unterschiede zwischen Wildtyp und *knock out*-Mutanten nachgewiesen werden. Auch hier kam es vermutlich zu einer Kompensation des jeweils ausgeschalteten *MIOX*-Gens durch die übrigen *MIOX*-Gene oder durch den alternativen UDP-Glucuronsäure-Syntheseweg mittels UGD.

### **Veränderte Funktion der Stomata durch das gleichzeitige Ausschalten von UGD1 und UGD4**

Untersuchungen an entsprechenden GUS-Reporterpflanzen hatten gezeigt, dass in den Schließzellen der Stomata von Kotyledonen und jungen Blättern *UGD1* und *UGD4* exprimiert werden, während eine Expression von *UGD2* und *3* und von *MIOX1*, *2*, *4* und *5* nicht nachgewiesen werden konnte (in dieser Arbeit und Kanter, 2006). Es wurde daher vermutet, dass sich das Ausschalten von *UGD1* und *4* auf Morphologie und Funktion der Stomata auswirken könnte. Für die einwandfreie Funktion der Stomata ist die Zellwand von großer Bedeutung. Sie ist innerhalb der Schließzellen unterschiedlich dick. Dies ermöglicht zusammen mit der besonderen radialen Anordnung der Cellulosemikrofibrillen bei Erhöhung des Turgordrucks im Zellinnern die charakteristische Öffnung durch Bildung des stomatären Spaltes (Taiz & Zeiger, 1998).

Die *knock out*-Mutanten  $\Delta UGD1$ ,  $\Delta UGD4$  und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  wiesen keine lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen im Aufbau und keine grundsätzliche Beeinträchtigungen in der Funktion der Stomata auf (siehe Abb.3.15). Bei genauerer Betrachtung des stomatären Spaltes zeigte sich jedoch, dass die durchschnittliche Stomataöffnung (gemessen als Verhältnis von Breite zu Länge) im Licht bei der Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  um 13% gegenüber dem Wildtyp vergrößert war (siehe Abb.3.16). Bei der Einzelmutante  $\Delta UGD1$  ließ sich kein Unterschied zum Wildtyp feststellen. Nach dem Nachweis durch MALDI-TOF MS und HPLC-Analysen, dass sich die Zellwandzusammensetzung der Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  von der des Wildtyps unterscheidet, konnte hier also ein Beweis erbracht werden, dass sich die unterschiedliche Zusammensetzung auch physiologisch auf die Stomatafunktion auswirkt. Die Veränderungen scheinen allerdings nicht groß genug zu sein, um die Funktion der Stomata grundsätzlich zu stören. Was genau zu den Unterschieden zwischen

Doppelmutante und Wildtyp führt, lässt sich anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht abschließend klären. Weitere Untersuchungen, beispielsweise elektronenmikroskopische Aufnahmen, um die Zellwanddicke und deren Verteilung zwischen Doppelmutante und Wildtyp vergleichen zu können, wären notwendig.

### **Beim Ausschalten eines oder mehrerer UGD-Gene verändert sich die Expression der übrigen UGD-Gene in Keimlingen**

Sowohl die Ergebnisse der Zellwandanalysen als auch die Untersuchung der Stomata ließen vermuten, dass es bei den Einfachmutanten ganz oder teilweise zu einer Kompensation des ausgeschalteten *UGD*-Gens durch die übrigen *UGD*-Gene kommt. Mittels *real time*-PCR wurde versucht, diese Kompensation nachzuweisen. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Expressionsmuster der noch intakten *UGD*-Gene in den Mutanten deutlich von denen im Wildtyp unterscheiden (siehe Abb.3.17). Überraschenderweise wurde aber keine höhere Expression einer oder mehrerer *UGD*-Isoformen gefunden, sondern in allen Pflanzen war die Expression der übrigen, unversehrten *UGD*-Gene vermindert. Ausnahme bildete die  $\Delta UGD4$ -Mutante. Hier wurden die drei anderen *UGD*-Gene deutlich stärker als im Wildtyp exprimiert.

Damit konnte zwar gezeigt werden, dass sich das Ausschalten eines oder mehrerer *UGD*-Gene auf die Expression der übrigen *UGD*-Gene auswirkt. Allerdings konnte außer bei  $\Delta UGD4$  keine direkte Kompensation durch Hochregulierung der Expression der anderen Isoform-Gene nachgewiesen werden. Vielmehr werfen die Ergebnisse neue Fragen zur Genregulation und zum komplexen Zusammenspiel der vier *UGD*-Isoformen auf. Auch für die *MIOX*-Gene in *Arabidopsis thaliana* konnte in den meisten untersuchten Geweben eine veränderte Genexpression der übrigen Isoform-Gene nach Ausschalten eines *MIOX*-Gens gefunden werden, allerdings kam es auch dort sowohl zur Hoch- als auch zur Runterregulierung bestimmter *MIOX*-Gene (Kanter, 2006). Sowohl in meiner Arbeit als auch in der Arbeit von Kanter (2006) wurden aber jeweils nur die *UGD*- oder die *MIOX*-Gene untersucht. Denkbar wäre jedoch auch, dass die Mutanten den Wegfall eines *UGD*- bzw. *MIOX*-Gens durch das teilweise Umschalten auf den jeweils anderen UDP-Glucuronsäure-Syntheseweg

kompensieren. Um das näher zu erforschen, müssten die *real time* PCR-Analysen nochmals wiederholt und neben der Expression der *UGD*-Gene auch gleichzeitig die der *MIOX*-Gene untersucht werden. Denn die Ergebnisse der *real time*-PCR-Analysen aus meiner Arbeit und aus der von Kanter (2006) deuten ein komplexes Zusammenspiel zwischen den Expressionen der jeweiligen Isoformen einerseits und zwischen beiden UDP-Glucuronsäure-Synthesewegen andererseits an. Eine Kompensation durch einfaches Hochregulieren einer oder mehrere anderer Isoformen konnte jedenfalls für die *UGD*-Gene nur bei *UGD4* nachgewiesen werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellwand von *Arabidopsis thaliana* enthält große Menge an Hemicellulosen und Pektinen, deren Bestandteile sich hauptsächlich von UDP-Glucuronsäure ableiten. Die Bildung von UDP-Glucuronsäure wird in Pflanzen überwiegend durch die UDP-Glucose Dehydrogenase (UGD) katalysiert, die UDP-Glucose unter der Bildung von NADH in UDP-Glucuronsäure umwandelt.

*Arabidopsis thaliana* besitzt vier *UGD*-Gene und ein Pseudogen, welche starke Homologien zu Genen anderer bekannter pflanzlicher UDP-Glucose Dehydrogenasen zeigen. Mit Hilfe von Promotor::GUS-Reportergenpflanzen und *real time*-PCR-Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die vier *UGD*-Gene nicht nur in verschiedenen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Morphogenese exprimiert werden, sondern auch in unterschiedlicher Stärke. Dabei scheint jedoch zu jedem Zeitpunkt der Morphogenese, bis auf die Samenentwicklung, eine der vier *UGD*-Isoformen in *Arabidopsis thaliana* exprimiert zu werden.

Eine biochemische Charakterisierung der verschiedenen Isoformen zeigte einen sehr ähnlichen  $K_m$ -Wert von ca. 43  $\mu\text{M}$  für  $\text{NAD}^+$ , während sich die  $K_m$ -Werte für UDP-Glucose deutlich voneinander unterschieden (123 - 335 $\mu\text{M}$ ). Alle Isoformen unterlagen einer *feedback*-Hemmung durch UDP-Xylose. Dabei war eine starke Hemmung durch UDP-Xylose korreliert mit einer hohen Affinität zu UDP-Glucose. Neben  $\text{NAD}^+$  konnten alle untersuchten Isoformen in geringem Maße auch  $\text{NADP}^+$  als Cofaktor verwenden. Allerdings verringerte sich die Enzymaktivität dadurch um etwa 80%. Alternative Zuckersubstrate konnten dagegen nicht umgesetzt werden. Die biochemischen Unterschiede zwischen den *UGD*-Isoformen und die differentielle Expression ihrer entsprechenden Gene könnten eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellwandbiosynthese spielen. Denn die irreversible Oxidation von UDP-Glucose zu UDP-Glucuronsäure durch *UGD* fungiert als eine der Schaltstellen, an welcher der Kohlenstofffluss der pflanzlichen Zelle in Richtung Zellwandbiosynthese gesteuert werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen von Einfach-oder Doppel-*knock out*-Mutanten, bei denen durch eine T-DNA-Insertion ein oder zwei

*UGD*-Gene ausgeschaltet waren, zeigte dementsprechend auch eine veränderte Zellwandzusammensetzung bei den Mutanten  $\Delta UGD2$ ,  $\Delta UGD3$  und  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  und eine veränderte Funktion der Stomata bei  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ . Insgesamt waren die Phänotypänderungen gegenüber dem Wildtyp bei der Doppelmutante  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  wesentlich ausgeprägter als bei den Einfachmutanten, was daran liegen könnte, dass der Ausfall eines *UGD*-Gens durch ein anderes kompensiert wird. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der *real time*-PCR-Analyse, in der die Expression von *UGD1*, *2*, *3* und *4* in sechs Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der *knock out*-Mutanten untersucht wurde. Dort konnte nachgewiesen werden, dass sich das Ausschalten eines oder mehrerer *UGD*-Gene auf die Expression der übrigen *UGD*-Gene auswirkt.

## 6 SUMMARY

The cell wall of *Arabidopsis thaliana* contains a large amount of hemicelluloses and pectins, which are basically composed of nucleotid-sugars synthesized via the common precursor UDP-glucuronic acid. In plants, UDP-glucuronic acid is predominantly synthesised via UDP-glucose dehydrogenase (UGD), which catalyses the oxidation of UDP-glucose to UDP-glucuronic acid by the formation of two NADH molecules. Furthermore, UGD acts as a key enzyme to channel carbohydrates into the pool of UDP-sugars used for cell wall biosynthesis.

In *Arabidopsis thaliana*, four genes and one pseudogene coding for UGD were identified that show strong homologues to other plant UDP-glucose dehydrogenases. In my present thesis I demonstrated by the use of promoter::GUS reporter gene plants and *real time* PCR, that all four *UGD* genes were expressed tissue-specific. Moreover, during plant development all *UGD* genes were highly variable in their expression levels. Furthermore, every stage of morphogenesis is correlated with the expression of at least one *UGD* gene.

The biochemical characterization of the different isoforms revealed similar  $K_m$ -values (approximately 43 $\mu$ M) for the cofactor NAD<sup>+</sup> but  $K_m$ -values across a broad range (123 - 335 $\mu$ M) for the substrate UDP-glucose. All isoforms were feedback inhibited by UDP-xylose. This inhibition was strongly correlated with the affinity for UDP-glucose that was accepted as substrate only. NADP<sup>+</sup> could be replaced by NAD<sup>+</sup> but decreased the enzyme activity about 80%. All the biochemical differences between the four UGD isoforms in *Arabidopsis* and their differential gene expression described in my thesis might play a crucial role in the regulation of cell wall biosynthesis.

Single or double knock out mutants, in which one or two *UGD* genes were discarded by T-DNA insertion, showed a modified cell wall composition (mutants:  $\Delta UGD2$ ,  $\Delta UGD3$  and  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ ) and a modified stomata function ( $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$ ). Phenotypic changes between wild type and mutants were considerably increased for the double mutant  $\Delta UGD1 \times \Delta UGD4$  compared to the single mutants. This effect might be explained by a compensation of the knock out gene via the remaining *UGD* isoforms and is supported by real time

## 98 SUMMARY

PCR analysis which showed that the knock out of one or two *UGD* genes also affected the expression levels of the remaining ones.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Arrecubieta C., Lopez R., Garcia E. (1994)**

Molecular characterization of cap3A, a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 3: sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *Journal of Bacteriology*, 176: 6375-6383

**Bindschedler L., Wheatley E, Gay E., Cole J., Cottage A., Bolwell G. (2005)**

Characterisation and expression of the pathway from UDP-glucose to UDP-xylose in differentiating tobacco tissue. *Plant Molecular Biology*, 57 (2): 285-301

**Brady J.D., Sadler I.H., Fry S.C. (1996)**

Diisodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *Biochemical Journal*, 315: 323–327

**Campbell R.E., Sala R.F., van de Rijn I., Tanner M.E. (1997)**

Properties and kinetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from group A streptococci. Irreversible inhibition by UDP-chloroacetol. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 3416-3422

**Campbell R.E. & Tanner M.E. (1999)**

UDP-Glucose analogues as inhibitors and mechanistic probes of UDP-glucose Dehydrogenase. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 9487-9492

**Campbell R.E., Mosimann S.C., van De Rijn I., Tanner M.E., Strynadka N.C. (2000)**

The first structure of UDP-glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry*, 39(23):7012-23

**Carpita N.C. & Gibaut D.M. (1993)**

Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth.

*Plant Journal*, 3: 1-30

**Cavalier D.M., Lerouxel O., Neumetzler L., Kazuchika Y., Reinecke A., Freshour G., Zabortina O.A., Hahn M.G., Burgert I., Pauly M., Raikhel N.V., Keegstra K. (2008)**

Disrupting two *Arabidopsis thaliana* Xylosyltransferase genes results in plants deficient in Xyloglucan, a major primary cell wall component. *The Plant Cell*, 20: 1519-1537

**Chomczynski P. (1993)**

A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15: 532-537

**Cosgrove D.J. (1997)**

Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13: 171-201

**Cosgrove D.J. (2001)**

Wall Structure and Wall Loosening. A Look Backwards and Forwards. *Plant Physiology*, 125: 131-134

**Deblarker R., Bytebier B., Greve H.D., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. (1985)**

Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, 13: 4777-4788

**Dische Z. & Borenfreund E. (1951)**

A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *Journal of Biological Chemistry*, 192(2):583-7

**Dutton G.J. (1980)**

Glucuronidation of drugs and other compounds. *CRC Press, Boca Raton, FL*

**Freshour G., Bonin C.P, Reiter W.D., Albersheim P., Darvill A.D., Michael G. Hahn (2003)**

Distribution of Fucose-Containing Xyloglucans in Cell Walls of the *mur1* Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131: 1602-1612

**Fry S.C. (1986)**

Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37: 165–186

**Fry S.C. (1988)**

The growing plant cell wall: Chemical and metabolic analysis. *Wiley, New York*

**Fry S.C. (1989a)**

Cellulases, hemicellulases and auxin-stimulated growth: A possible relationship. *Physiologia Plantarum*, 75: 532-536

**Fry S.C. (1989b)**

The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*, 40: 1–11

**Fry S.C., York W.S., Albersheim P., Darvill A., Hayashi T., Joseleau J.-P., Kato Y., Lorences E.P., Machlachlan G.A., McNeil M., Mort A.J., Reid G.J.S., Seitz H.U., Selvendran R.R., Voragen A.G.J., White A.R. (1993)**

An unambiguous nomenclature for xyloglucan- derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum*, 89:1-3

**Ge X., Campbell R.E., van de Rijn I., Tanner M.E. (1998)**

Covalent Adduct Formation with a Mutated Enzyme: Evidence for a Thioester Intermediate in the Reaction Catalyzed by UDP-Glucose Dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 6613-6614

**Ge X., Penney L.C.; van De Rijn I.; Tanner M.E. (2004)**

Active site residues and mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *FEBS Journal*, 271 (1): 14-22

**Goloubinoff P., Gatenby A.A., Lorimer G.H. (1989)**

GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*, 337: 44-47

**Ha M.-A., Apperley D.C., Jarvis M.C. (1997)**

Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiology*, 115: 593-598

**Huson D.H., Richter D., Rausch C., DeZulian T., Franz M., Rupp R. (2007)**

Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*, 8: 460

**Hayashi T. (1989)**

Xyloglucans in the Primary Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 139-168

**Heldt, H.W. (1999)**

Pflanzenbiochemie. *Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 2. Auflage*

**Hempel J., Perozich J., Romovacek H., Hinich A., Kuo I., Feingold D. (1994)**

UDP-glucose dehydrogenase from bovine liver: Primary structure and relationship to other dehydrogenases. *Protein Science*, 3 (7): 1074-1080

**Hinterberg B., Klos C., Tenhaken R. (2002)**

Functional characterization of recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 1011-1017

**Jefferson R.A. (1987)**

Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5: 387-405

**Johansson H., Sterky F., Amini B., Lundeberg J., Kleczkowski L.A. (2002)**

Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding poplar UDP-glucose Dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1576: 53-58

**Kanter U., Usadel B., Guerineau F., Li Y., Pauly M., Tenhaken R. (2005)**

The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. *Planta*, 221: 243-254

**Kanter U. (2006)**

Molekulare Regulation der UDP-Zucker-Biosynthese: Untersuchungen anhand der *myo*-Inositoxygenase. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main*

**Karsai A., Müller S., Platz S., Hauser M.T. (2002)**

Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 2(4): 790-2, 794-796

**Kärkönen A. (2005)**

Biosynthesis of UDP-GlcA: Via UDPGDH or the *myo*-inositol oxidation pathway? *Plant Biosystems*, 139 (1): 46-49

**Kärkönen A., Murigneux A., Martinant J.-P., Tatout C., Dudley B.J., Fry S.C. (2005)**

UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis. *Biochemical Journal*, 391: 409-415

**Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D., Albersheim P. (1973)**

The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cell based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, 51: 188-196

**Kim J.B. & Carpita N.C. (1992)**

Changes in esterification of the uronic acids groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology*, 98: 646-653

**Kimura S., Laosinchai W., Itoh T., Cui X., Linder C.R., Brown Jr. R.M. (1999)**

Immunogold Labeling of Rosette Terminal Cellulose-Synthesizing Complexes in the Vascular Plant *Vigna angularis*. *Plant Cell*, 11: 2075-2086

**Klein M., Geisler M., Suh S.J., Kolukisaoglu H.Ü., Azevedo L., Plaza S., Curtis M.D., Richter A., Weder B., Schulz B., Martinoia E. (2004)**

Disruption of *AtMRP4*, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC-transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *The Plant Journal*, 39: 219-236

**Klinghammer M. & Tenhaken R. (2007)**

Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in *Arabidopsis*, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 58 (13): 3609-3621

**Lerouxel O., Choo T.S., Séveno M., Usadel B., Faye L., Lerouge P., Pauly M. (2002)**

Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. *Plant Physiology*, 130: 1754-1763

**McCann M.C., Shi J., Roberts K., Carpita N.C. (1994)**

Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant Journal*, 5: 773

**McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. (1984)**

Structure and function of the Primary-cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 625 – 663

**Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. (2000)**

Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nuclei. Acids Research*, 28(1): 292

**Novy R., Drott D., Yaeger K., Mierendorf R. (2001)**

Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *In Novations* 12:1-3

**Oka T. & Jigami Y. (2006)**

Reconstruction of *de novo* pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal*, 273 (12): 2645 – 2657

**Orellana A. (2005)**

Biosynthesis of non-cellulosic polysaccharides in the Golgi apparatus. Topological consideration (Review). *Plant Biosystems*, 139: 42-45

**Pauly M., Albersheim P., Darvill A., York W.S. (1999)**

Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20 (6): 629 – 639

**Pauly M., Qin Q., Greene H., Albersheim P., Darvill A., York W.S. (2001)**

Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation.. *Planta*, 212(5-6): 842-850

**Reiter W.-D. & Vanzin G.F. (2001)**

Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Molecular Biology*, 47 (1-2): 95-113

**Richmond T.A. & Somerville C.R. (2001)**

Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Molecular Biology*, 47 (1-2): 131-143

**Ridley W.P., Houchins J.P., Kirkwood S. (1975)**

Mechanism of action of uridine diphosphoglucose dehydrogenase. Evidence for a second reversible dehydrogenation step involving an essential thiol group. *Biological Chemistry*, 250: 8761-8767

**Rodén L. (1980)**

In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. *Lennarz W.J. (ed.), Plenum Publishing Co, New York, NY: 267-371*

**Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)**

Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press NY, Second edition*

**Schnurr J.A., Storey K.K., Jung H.-J.G., Somers D.A., Gronwald J.W. (2006)**

UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Planta*, 224: 520-532

**Seifert G.J. (2004)**

Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3):277-284

**Seitz B., Klos C., Wurm M., Tenhaken R. (2000)**

Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *Plant Journal*, 21: 537-546

**Showalter A.M. (1993)**

Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5: 9–23

**Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H. (2004)**

Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306 (5705): 2206 – 2211

**Sommer B.J., Barycki J.J., Simpson M.A. (2004)**

Characterization of human UDP-glucose dehydrogenase: CYS-276 is required for the second of two successive oxidations. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (22): 23590-23596

**Stewart D.C. & Copeland L. (1999)**

Kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from soybean nodules. *Plant science*, 147 (2), 119-125

**Strominger J.L., Kalckar H.M., Axelrod J., Maxwell E.S. (1954)**

Enzymatic oxidation of Uridine diphosphate glucose to Uridine diphosphate glucuronic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 76: 6411-6412

**Taiz L. & Zeiger E. (1998)**

Plant Physiology. *Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA, 2<sup>nd</sup> edition*

**Talbott L.D. & Ray P.M. (1992)**

Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides: implications for models of primary wall structure. *Plant Physiology*, 98: 357-368

**Tenhaken R. & Thulke O. (1996)**

Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-Glucose Dehydrogenase. *Plant Physiology*, 112: 1127-1134

**Turner W. & Botha F.C. (2002)**

Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 407 (2): 209-216

**Wallace G. & Fry S.C. (1994)**

Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151: 229–268

**Weigel D. & Glazebrook J. (2002)**

*Arabidopsis*: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA

**Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox J.P (2001)**

Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47 (1-2): 9-27

**Zablackis E., Huang J., Müller B., Darvill A.C., Albersheim P. (1995)**

Characterization of Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 107: 1129-1138

## 8 CURRICULUM VITAE

Michaela Katharina Karla Klinghammer

geboren am 6. Mai 1976 in Frankfurt am Main

verheiratet, eine Tochter

### Schulische Ausbildung

1995           Abitur am Heinrich von Gagern-Gymnasium Frankfurt/Main  
Prüfungsfächer: Mathematik, Kunst, Geschichte und Biologie

### Studium

1996           Magisterstudium der Philosophie, Psychologie und Neueren  
Geschichte an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main

1996 – 2002   Diplomstudium der Biologie an der J.W. Goethe-Universität  
Frankfurt/Main mit den Schwerpunktfächern: Pflanzen-  
physiologie, spezielle Botanik und Mikrobiologie  
Abschluss: Diplom

09/2002       Diplomarbeit am Botanischen Institut der J.W. Goethe-Universität  
Frankfurt/Main in der Abteilung Biosynthese in Pflanzen und  
Mikroorganismen unter der Leitung von Prof. Dr. Gerhard  
Sandmann mit dem Thema: „Expression und biochemische  
Charakterisierung der bifunktionalen Lycopinzyklase aus Pilzen“

### Promotion

Seit 01/2003   Promotionsstudium an der J.W. Goethe-Universität  
Frankfurt/Main am Institut für Molekulare Biowissenschaften in  
der Abteilung Pflanzliche Molekularbiologie und Genomforschung  
unter der Leitung von Prof. Dr. Raimund Tenhaken mit dem  
Thema: „Die Rolle der vier UDP-Glucose Dehydrogenasen in  
*Arabidopsis thaliana* für die Synthese von Zellwandzuckern“

## 9 DANKSAGUNG

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Raimund Tenhaken bedanken, der mir nicht nur die Möglichkeit gab, in seiner Gruppe zu arbeiten und dadurch diese Arbeit anzufertigen, sondern der mir trotz ungewöhnlicher Umstände immer mit Rat und Tat zur Seite stand und niemals die Geduld verlor.

Für die gute kooperative und fachliche Zusammenarbeit danke ich den folgenden Arbeitsgruppen der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main: Der Arbeitsgruppe „Molekulare Entwicklungsbiologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Osiewacz, der Arbeitsgruppe „Physiologie und Genetik von niederen Eukaryonten“ unter der Leitung von Prof. Dr. Boles, der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Karas vom Institut der Pharmazeutischen Chemie, sowie der ehemaligen Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ von Prof. Dr. Nover und JProf. Dr. Pascal von Koskull-Döring.

Ich danke allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen, vor allem Ulrike Kanter, für die enge und gute Zusammenarbeit, außerdem Daniela Braun, Jürgen Grief, Julian, Sieglinde Kost, Thomas Körner, Andrea Österreicher, Patrick Walker, Tom Veith und Ariane Zutz.

Meiner Familie und Schwiegerfamilie, vor allem Bernd, Marie, Peter und Fips, danke ich für die nicht enden wollende Unterstützung und Liebe. Ihr seid die Besten!!!!!! Für die Kinderbetreuung während des Schreibens bedanke ich mich bei der Kinderkrippe „Mäuschen“ in Aschaffenburg und dem Opa aus Wiesbaden. Und zu guter Letzt danke ich noch Arndt Küper und Bettina Klinger für die Motivation auf der letzten Durststrecke.

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „**Die Rolle der vier UDP-Glucose Dehydrogenasen in Arabidopsis thaliana bei der Synthese von Zellwandzuckern**“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Aschaffenburg, den