



**Funktion des Lipidtransferproteins 2 (LTP2) und dessen Rolle bei der Bildung  
von durch *Agrobacterium tumefaciens* induzierten Wurzelhalsgallen an  
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Stefanie Saupe**

aus Jena

Würzburg 2014

Eingereicht am: .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: .....

Gutachter : Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Markus Riederer

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
Danksagung.....	X
Zusammenfassung.....	XII
Summary .....	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	1
1.2. Entwicklung von Wurzelhalsgallentumoren an <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	2
1.3. Lipidartige pflanzliche Grenzflächen .....	2
1.3.1. Das Suberin .....	3
1.3.2. Die Cuticula.....	4
1.3.3. Die Sphingolipide.....	7
1.3.4. Transportwege von Lipiden.....	9
1.4. Lipidtransferproteine (LTPs).....	11
1.4.1. Struktur und Bindepartner pflanzlicher LTPs.....	12
1.4.2. Prozesse an denen pflanzliche LTPs beteiligt sind.....	13
1.5. Ziel der Arbeit .....	14
2. Materialien und Methoden.....	15
2.1. Kultivierung und Arbeiten mit Pflanzen .....	15
2.1.1. Erdkulturen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
2.1.2. Selektion transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
2.1.3. Sterile Wurzelkulturen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
2.1.4. <i>Arabidopsis</i> Linien und Genotypen.....	16
2.1.5. Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> über „ <i>Floral Dipping</i> “ .....	17
2.1.6. Tumorinduktion und Präparation an <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
2.1.7. Erdkulturen von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	17

2.1.8.	Suspensionskulturen von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	18
2.1.9.	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> Suspensionskulturen.....	18
2.1.10.	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> und Plasmolyse.....	19
2.1.11.	Protoplastierung von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	19
2.2.	Kultivierung und Arbeiten mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	20
2.2.1.	Wachstumsbedingung.....	20
2.2.2.	Selektions- und Wachstumsmedien.....	20
2.2.3.	Transformation mittels Elektroporation .....	21
2.3.	Kultivierung und Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.3.1.	Wachstumsbedingungen.....	22
2.3.2.	Selektions- und Wachstumsmedien.....	22
2.3.3.	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.4.	Antibiotika.....	26
2.5.	Arbeiten mit DNA .....	26
2.5.1.	Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
2.5.2.	Plasmidextraktion aus <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.5.3.	Restriktionsenzym-Analysen.....	27
2.5.4.	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	27
2.5.5.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	29
2.5.6.	Aufreinigung von DNA .....	30
2.5.7.	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	30
2.5.8.	Sequenzierungen von DNA .....	30
2.5.9.	Identifizierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien mittels PCR .....	30
2.6.	Arbeiten mit RNA .....	31
2.6.1.	Isolierung von PolyA-mRNA.....	31
2.6.2.	Reverse Transkription .....	32
2.6.3.	Die quantitative Echtzeit-PCR.....	32
2.7.	Klonierungsstrategien.....	34
2.7.1.	Die USER-Klonierung.....	34

2.7.2.	Klonierung über Restriktionsschnittstellen .....	36
2.8.	Arbeiten mit Proteinen .....	37
2.8.1.	Proteinexpression in <i>E. coli</i> Stamm GenX .....	37
2.8.2.	Proteinextraktion und Aufreinigung aus <i>E. coli</i> Stamm GenX .....	38
2.8.3.	Proteinextraktion aus <i>Nicotiana benthamina</i> BY-2 Zellkulturen .....	39
2.8.4.	Tris-Tricin SDS-PAGE nach Schägger .....	39
2.8.5.	Coomassie-Färbung .....	40
2.8.6.	Western Blot-Analysen .....	41
2.8.7.	Protein-Lipid-Overlay Assay (PLO) .....	41
2.9.	Lokalisationsmethoden .....	42
2.9.1.	GUS-Färbung .....	42
2.9.2.	Einbetten von Pflanzenmaterial in Methacrylat (HEMA; 2-Hydroxy- Methacrylat) .....	43
2.9.3.	Safraninfärbung .....	44
2.9.4.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	44
2.10.	Charakterisierung von Blattoberflächen .....	45
2.10.1.	Kontaktwinkelmessungen und Chlorophyll Leaching Assay .....	45
2.11.	Arbeiten mit Lipiden .....	46
2.11.1.	Lipidanalysen mittels UPLC-MS .....	46
2.11.2.	Wachsanalysen mittels GC-MS .....	48
2.11.3.	Suberinanalysen mittels GC-MS .....	49
2.12.	Biotische und abiotische Stressexperimente .....	50
2.12.1.	Agrobakterienapplikation .....	50
2.12.2.	Phytohormon-Behandlung .....	50
2.13.	Sequenzanalysen .....	51
2.14.	Statistische Auswertung .....	51
3.	Ergebnisse .....	52
3.1.	Sequenzanalysen von LTP2 .....	52
3.1.1.	Position von <i>LTP1</i> und <i>LTP2</i> auf dem 2. Chromosom .....	53
3.1.2.	Aminosäurevergleich von LTP2 mit anderen LTPs aus Arabidopsis .....	53

3.2.	Gewebsspezifische Expression.....	56
3.2.1.	<i>LTP2</i> -Promotoraktivität in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	56
3.2.2.	Quantitative Bestimmung von <i>LTP2</i> -Transkripten im Vergleich zu <i>LTP1</i> .....	59
3.3.	Regulation der <i>LTP2</i> -Gen-Expression.....	60
3.3.1.	Einfluss von Agrobakterien .....	60
3.3.2.	Phytohormonbehandlung.....	62
3.4.	Die <i>LTP2</i> -T-DNA-Insertionsmutante ( <i>ltp2KO</i> ) .....	64
3.4.1.	Tumorbildung an <i>ltp2KO</i> -Pflanzen .....	65
3.5.	Subzelluläre Lokalisation von <i>LTP2</i> im Vergleich zu <i>LTP1</i> .....	67
3.6.	Ungerichtete Lipid-Analyse von <i>ltp2KO</i> : Veränderungen des Ceramid- Musters.....	71
3.7.	Suberinanalysen im Tumorgewebe .....	74
3.8.	Ektopische Expression von <i>LTP2</i> in der Epidermis: CER5 <sub>prom</sub> :: <i>LTP2</i> .....	78
3.9.	Das <i>LTP2</i> -Protein.....	90
3.9.1.	Expression von <i>LTP2</i> in <i>E. coli</i> und <i>BY-2</i> -Zellkulturen.....	90
3.9.2.	<i>LTP2</i> -Binde-Assays .....	92
4.	Diskussion.....	95
4.1.	Die Expression von <i>LTP2</i> im Tumor ist essentiell für dessen Wachstum.....	95
4.2.	Funktion von <i>LTP2</i> .....	96
4.2.1.	Das in der Plasmamembran lokalisierte <i>LTP2</i> -Protein transferiert langkettige Aliphaten .	97
4.2.2.	<i>LTP2</i> ist an Prozessen beteiligt, die aliphatische Lipide zur Versiegelung der Zellwand benötigen .....	102
4.3.	Resümee: <i>LTP2</i> ist ein Transferprotein von unverzweigten, langkettigen Aliphaten, welche zur Zellwandversiegelung benötigt werden .....	106
5.	Ausblick .....	109
6.	Literaturverzeichnis .....	111
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	121
8.	Anhang.....	126
8.1.	Sequenzen und Vektoren.....	126
8.1.1.	DNA-Sequenzen.....	126

8.1.2.	Aminosäuresequenzen von LTP2-Verwandten in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	131
8.2.	PCR-Primer .....	133
8.2.1.	Echtzeit-PCR-Primer .....	133
8.2.2.	Allgemeine Klonierungsprimer .....	134
8.2.3.	Spezielle Klonierungsprimer .....	135
8.2.4.	Sequenzierungsprimer .....	136
8.2.5.	Genotypisierungsprimer .....	137
8.3.	Vektoren .....	138
8.4.	Ceramide .....	146
9.	Publikationen und Präsentationen.....	147
9.1.	Publikationen:.....	147
9.2.	Präsentationen: .....	147
10.	Lebenslauf .....	148
11.	Eidesstattliche Erklärung .....	151

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> 28 Tage alter Tumor an <i>Arabidopsis thaliana</i> induziert durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	2
<b>Abbildung 2</b> Schematischer Querschnitt durch eine epidermale Zellschicht mit Cuticula..	5
<b>Abbildung 3</b> Bestandteile von cuticulären Wachsen in <i>Arabidopsis</i> Blüten und Blättern..	6
<b>Abbildung 4</b> Ceramid-Biosynthese im Endoplasmatischen Retikulum.....	8
<b>Abbildung 5</b> Transportwege von Suberin- und Cutin-Monomeren.....	10
<b>Abbildung 6</b> Position der T-DNA-Insertion und der Primer auf der gDNA, sowie T-DNA.....	31
<b>Abbildung 7</b> SDS-Gel-Aufbau.....	40
<b>Abbildung 8</b> Verhältnisse der <i>LTP</i> -Gen-Expressionslevel im <i>Arabidopsis thaliana</i> Spross zu 35 Tage alten durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> induzierten Tumoren.....	52
<b>Abbildung 9</b> Struktur von <i>LTP1</i> und <i>LTP2</i> auf dem zweiten Chromosom von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
<b>Abbildung 10</b> Verwandtschaften der LTPs von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
<b>Abbildung 11</b> Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>LTP1</i> , <i>LTP2</i> , <i>LTP3</i> und <i>LTP4</i> .....	55
<b>Abbildung 12</b> GUS-Aktivität in Keimlingen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	56
<b>Abbildung 13</b> GUS-Aktivität in transgenen <i>Arabidopsis</i> Gewebe und Gewebsschnitten mit <i>LTP2<sub>Prom</sub>::GUS</i> -Konstrukt: Teil I .....	57
<b>Abbildung 14</b> GUS-Aktivität von <i>LTP2<sub>Prom</sub>::GUS</i> in transgenen <i>Arabidopsis</i> Geweben und Gewebsschnitten: Teil II .....	58
<b>Abbildung 15</b> Transkriptanzahl von <i>LTP1</i> und <i>LTP2</i> in den verschiedenen Organen und dem 21 Tage alten durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> induzierten Tumor an <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	60
<b>Abbildung 16</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> Wurzelkultur drei Stunden nach der Applikation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	61
<b>Abbildung 17</b> <i>LTP2</i> -Transkriptanzahl in unbehandelten und mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> behandelten <i>Arabidopsis thaliana</i> Wurzelkulturen.....	62
<b>Abbildung 18</b> Antwort der <i>LTP2</i> -Expression auf Phytohormonapplikation. ....	63
<b>Abbildung 19</b> Analysen der T-DNA-Insertions-Linie.....	64



<b>Abbildung 20</b> Effekte des <i>LTP2</i> -Verlusts auf das Wurzelhalsgallenwachstum an <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	65
<b>Abbildung 21</b> Transkript-Anzahl von <i>LTP</i> -Genen in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> induzierten Tumoren an <i>Arabidopsis thaliana</i> oder <i>ltp2KO</i> .....	66
<b>Abbildung 22</b> Subzelluläre Lokalisation von <i>LTP1:mCherry</i> , <i>LTP2:mCherry</i> und <i>SLAH3:mVenus</i> in <i>N. benthamiana</i> Epidermiszellen .....	68
<b>Abbildung 23</b> Transiente Expression von <i>LTP1:mCherry</i> , <i>LTP2:mCherry</i> und <i>SLAH3:Venus</i> in <i>N. benthamiana</i> Protoplasten .....	69
<b>Abbildung 24</b> Plasmolyse nach transienter Expression von <i>LTP1:mCherry</i> , <i>LTP2:mCherry</i> und <i>SLAH3:mVenus</i> in <i>N. benthamiana</i> Blättern .....	70
<b>Abbildung 25</b> Ceramid Zusammensetzung in zwölf Wochen alten <i>Arabidopsis thaliana</i> Rosettenblättern von <i>ltp2KO</i> und dem Wildtyp.....	72
<b>Abbildung 26</b> Ceramid Zusammensetzung in zwölf Wochen alten <i>Arabidopsis thaliana</i> Rosettenblättern von <i>ltp2KO</i> und dem Wildtyp.....	73
<b>Abbildung 27</b> Suberinanalyse von 21 Tage alten Tumoren an Wildtyp, sowie transgenen <i>ltp2KO Arabidopsis thaliana</i> mit dem onkogenen Agrobakterien Stamm C58 .....	75
<b>Abbildung 28</b> Aromatische und Phenolische Komponenten des Suberins von 21 Tage alten Tumoren an <i>Arabidopsis thaliana</i> und der Mutante <i>ltp2KO</i> , induziert über <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	76
<b>Abbildung 29</b> Suberinanalyse von 21 Tage alten Tumoren an <i>Arabidopsis thaliana</i> und transgenen <i>ltp2KO</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	77
<b>Abbildung 30</b> Effekte der ektopischen Expression von <i>LTP2</i> in epidermalen Zellen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	79
<b>Abbildung 31</b> Oberflächeneigenschaften von $CER5_{Prom}::LTP2$ .....	80
<b>Abbildung 32</b> Anzahl der Stomata in acht Wochen alten Rosettenblättern von <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp und transgenen $CER5_{Prom}::LTP2$ .....	81
<b>Abbildung 33</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Arabidopsis thaliana</i> $CER5_{Prom}::LTP2$ , sowie dem Wildtyp .....	82
<b>Abbildung 34</b> Zusammensetzung cuticulärer Wachse von zwölf Wochen alten <i>Arabidopsis thaliana</i> Rosettenblättern von Wildtyp und transgenen $CER5_{Prom}::LTP2$ : Übersicht .....	84
<b>Abbildung 35</b> Zusammensetzung der cuticulären Wachse von zwölf Wochen alten <i>Arabidopsis thaliana</i> Rosettenblättern, sowie den transgenen $CER5_{Prom}::LTP2$ : Aldehyde, Alkane und Fettsäuren .....	87

<b>Abbildung 36</b> Zusammensetzung der cuticulären Wachse von zwölf Wochen alten <i>Arabidopsis thaliana</i> Rosettenblättern, sowie den transgenen CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2-Linien: Alkohole, Ester und Aromaten/Phenole.....	89
<b>Abbildung 37</b> Analyse des LTP2:6xHis/V5-Fusionsproteins aus <i>E. coli</i> .....	91
<b>Abbildung 38</b> Western Blot-Analyse mit anti-His-Antikörper von Gesamtproteinextrakt.....	91
<b>Abbildung 39</b> Protein-Lipid Overlay Assay von LTP2:6xHis/V5: Teil I.....	93
<b>Abbildung 40</b> Protein-Lipid Overlay Assay von LTP2:6xHis/V5: Teil II. ....	94
<b>Abbildung 41</b> Modell für die Beladung von LTP2 und dem Transport von langkettigen, unverzweigten Aliphaten durch die Zellwand .....	107

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Verwendete transgene Arabidopsis Pflanzenlinien .....	16
<b>Tabelle 2</b> Verwendete Agrobakterienstämme .....	20
<b>Tabelle 3</b> Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	23
<b>Tabelle 4</b> Verwendete rekombinante <i>Escherichia coli</i> .....	25
<b>Tabelle 5</b> Liste der verwendeten Antibiotika .....	26
<b>Tabelle 6</b> Standard PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase (20 µl) .....	28
<b>Tabelle 7</b> Standard PCR-Programm der Taq-Polymerase.....	28
<b>Tabelle 8</b> Standard PCR-Ansatz der Phu Cx-Polymerase (20 µl).....	28
<b>Tabelle 9</b> Standard PCR-Programm der Phu Cx -Polymerase .....	29
<b>Tabelle 10</b> Standard Reaktionsansatz der reversen Transkription (20 µl) .....	32
<b>Tabelle 11</b> Standard Reaktionsansatz der quantitativen Echtzeit-PCR (20 µl).....	33
<b>Tabelle 12</b> Standard PCR-Programm der quantitativen Echtzeit-PCR .....	33
<b>Tabelle 13</b> Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der LTPs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
<b>Tabelle 14</b> Anzahl an Trichom-Verzweigungspunkten auf <i>Arabidopsis thaliana</i> Blattoberflächen von transgenen CER5 <sub>promi</sub> ::LTP2, sowie dem Wildtyp (WS-2) .....	83

# Danksagung

Ich danke:

Dr. Rosalia Deeken für die Betreuung meiner Promotion. Insbesondere für die vielen spannenden Diskussionen, für die Möglichkeit zu experimentieren und meine Ideen umzusetzen, für alle Anregungen und auch kritischen Hinterfragungen meiner Thesen.

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Institut durchführen zu können, sowie die Anregungen zur Bearbeitung und Weiterentwicklung des Themas.

Prof. Dr. Markus Riederer für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Prof. Dr. Thomas Müller für die anregenden Gespräche und Ideen, sowie die dreidimensionalen Protein-Modelle von LTP2.

Prof. Dr. Martin Müller für die Möglichkeit die Sphingolipid-Analytik in seinem Labor durchzuführen. Insbesondere Dr. Agnes Fekte und Maria Lesch für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei den Sphingolipid-Analysen.

Dr. Jana Leide und Dr. Michael Riedel für die sehr gute Zusammenarbeit und die Durchführung der Tumor-Suberin und cuticulären Wachs-Analysen, welche sehr zum Erfolg des Projektes beigetragen haben.

Prof. Dr. Lois Banta, Prof. Dr. Daniel Lynch, dem Graduiertenkolleg 1342 und der Graduate School of Life Sciences, Würzburg für die Ermöglichung des Forschungs-Aufenthaltes am Williams College in den USA.

Dem Gärtner-, dem Werkstatt-Team sowie den TAs, insbesondere Julia Schwarz für die Hilfestellungen und Unterstützung während der Arbeit.

Dr. Jörn Klinkenberg für die Bereitstellung von Konstrukten und transgenen Pflanzenlinien.

Sandra, Christina und Melanie für die Korrektur dieser Arbeit.

Dem Graduiertenkolleg für die finanzielle Unterstützung.

Meiner Familie und meinen Lieben, die mir in all der Zeit als Fels in der Brandung tiefe Unterstützung geboten haben.

Für all jene, die mit kindlicher Neugier die Welt betrachten.

Für all jene, die trotz großer, wirrer Datenberge nicht verzagen.

Für all jene die mit großen Kinderaugen voller Leidenschaft die letzten Geheimnisse dieser Welt  
entschlüsseln.

Für all jene, die wie ich, nach einem Erfolg im Labor Freudentänze vollführen.

**Und ganz besonders aus tiefsten Herzen für meine Familie.**

## Zusammenfassung

In Tumoren an *Arabidopsis thaliana*, induziert über *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58), ist von den 49 bekannten Lipidtransferproteinen (LTPs) nur die Expression von *LTP2* stark erhöht (Deeken et al., 2006). Mutanten ohne *LTP2*-Transkripte (*ltp2KO*) entwickeln deutlich kleinere Tumore als der Wildtyp. Durch die permanenten Zellstreckungs- und Dehnungsprozesse besitzen Tumore keine intakte Epidermis (Efetova et al., 2007). Dies wiederum führt zum Verlust einer vollständigen Cuticula-Schicht, welche von der Epidermis produziert wird und dieser als Barriere zur Umwelt aufgelagert ist. Um den transpirationsbedingten Wasserverlust zu minimieren, werden in Tumoren langkettige Aliphaten in die äußeren Zellschichten eingelagert (Efetova et al., 2006). Ein ähnliches Szenario findet um Verwundungsareale statt (Kolattukudy et al., 2001). Die Gen-Expression von *LTP2* wird nicht durch tumorinduzierende Agrobakterien ausgelöst. Faktoren wie Verwundung, sowie die Applikation des Trockenstress-Phytohormons Abscisinsäure (ABA) begünstigen die *LTP2*-Gen-Expression positiv. Außerdem ist der *LTP2*-Promotor in Gewebe aktiv, in welchem sekundäre Zellwandmodifikationen auftreten, sowie insbesondere in Abscissionsschichten von welkenden Organen. Ungerichtete Lipidanalysen der *ltp2KO*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zeigten nur signifikante Veränderungen in der Menge definierter Sphingolipide – obwohl bislang eine Beteiligung von *LTP2* am Transfer von Phospholipiden postuliert wurde. Allerdings kann das *LTP2*-Protein, wie Protein-Lipid-Overlay-Analysen demonstrierten, weder komplexen Sphingolipide noch Sphingobasen binden. Neben Sphingobasen sind auch langkettige Fettsäuren Bestandteile von Sphingolipiden und diese sind wiederum Bindepartner von *LTP2*. Um eine eventuelle Beteiligung von *LTP2* an der Bildung von Suberin von Tumoren zu zeigen, wurde dieses analysiert. Die GC-MS-Analysen des Tumor-Suberins haben jedoch veranschaulicht, dass durch das Fehlen von *LTP2*-Transkripten das Lipidmuster nicht beeinträchtigt wird. Eine Überexpression von *LTP2* im gesamten Kormophyten war trotz drei unabhängiger experimenteller Ansätze nicht möglich. Daher wurde das Protein ektopisch in epidermalen Zellen exprimiert ( $CER5_{Prom}::LTP2$ ). Die Transgenen  $CER5_{Prom}::LTP2$  wiesen einige morphologische Besonderheiten auf, wie verminderte Oberflächenhydrophobizität, aberrante Blüten- und Blattmorphologien etc., die typisch für Wachsmutanten sind. GC-MS-Analysen der cuticulären Wachse dieser transgenen Pflanzen zeigten, einen erhöhten Gehalt an  $C_{24}$ - und  $C_{26}$ -Fettsäuren, wohingegen die korrespondierenden Aliphaten wie Aldehyde und Alkane dezimiert waren. Unterstützend zeigten Lokalisationsanalysen, dass das *LTP2*-Protein an/in der Plasmamembran assoziiert ist.

Somit kann die These aufgestellt werden, dass LTP2 langkettigen, unverzweigten Aliphaten (Fettsäuren) an der Grenzfläche Plasmamembran/Zellwand transferiert, die zur Versiegelung und Festigung von Zellwänden benötigt werden.

## Summary

Out of 49 known lipid transfer protein (LTP) only the expression of *LTP2* is highly increased in tumors induced on *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58; Deeken et al., 2006). Mutants with no *LTP2* transcripts (*ltp2KO*) develop significantly smaller tumors than the wild-type. Due to the permanent cell stretch and elongation processes tumors do not possess an intact epidermal layer (Efetova et al., 2007). This leads to the loss of a complete cuticle layer, which is produced by the epidermis and builds up a barrier to the environment. To minimize the transpirational water loss, long-chain aliphatic compounds are incorporated into the outer cell layers of tumors (Deeken et al., 2006). The gene expression of *LTP2* is not triggered by tumor-inducing agrobacteria. Instead, factors such as wounding and the application of the phytohormone abscisic acid (ABA) induce the *LTP2* gene expression. In addition, the *LTP2* promoter is highly active in tissue, in which secondary cell wall modifications occur, and in the abscission zone of wilting organs. Untargeted lipid analyzes of *ltp2KO* mutant in comparison to the wild type showed significant changes in the amount of defined sphingolipids only - although the involvement of LTP2 has been postulated for the transfer of phospholipids. However, the LTP2 protein, as protein-lipid overlay analysis demonstrated, binds neither complex sphingolipids nor sphingobases. Instead LCFAs, which are part of sphingolipids are binding partners of LTP2.

In order to show a possible involvement of LTP2 in the formation of tumor-suberin GC-MS analyzes were performed. These demonstrated that the composition of the lipid-pool is not altered in *ltp2KO* plants. Overexpression of LTP2 was not possible in spite of three independent experimental approaches. The protein was instead expressed ectopically in epidermal cells (*CER5<sub>Prom</sub>::LTP2*). The transgenes *CER5<sub>Prom</sub>::LTP2* showed some morphological abnormalities, such as reduced surface hydrophobicity, aberrant flowers and leaf morphologies, which are typical for wax mutants. GC-MS analyzes of the cuticular wax of those transgenic lines revealed an increased amount of C<sub>24</sub>- and C<sub>26</sub>- fatty acids. Furthermore LTP2 was localized at the plasma membrane.

Thus, this thesis proposes a role of LTP2 in the transfer of long chain, unbranched aliphatics (fatty acids), which are needed to seal up and strengthen cell walls at the interface plasma membrane and cell wall.

# 1. Einleitung

## 1.1. *Arabidopsis thaliana*

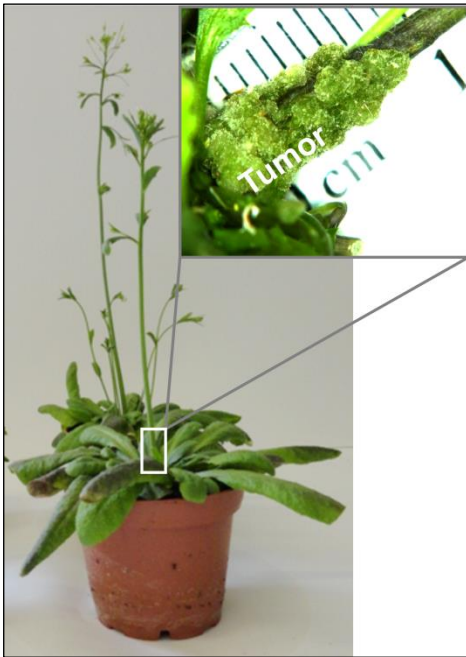
Die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) gehört zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) und letztendlich zur Gattung der Schaumkressen (*Arabidopsis*). Der Name Kreuzblütengewächse ergibt sich aus der zwittrigen, radiär-symmetrischen Blüte aus vier Sepalen, sowie vier Petalen, die kreuzweise angeordnet sind (Schmeil & Fitschen, 2006). *Arabidopsis* zeichnet sich durch ein kleines Genom von 125 Megabasen aus, welches auf fünf Chromosomen verteilt ist, und im Jahr 2000 komplett sequenziert wurde (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Der kurze Lebenszyklus von circa sechs Wochen von der Keimung bis zur Samenernte, die leichte Kultivierbarkeit und Manipulierbarkeit, die enorme Samenproduktion, sowie die inzwischen große Anzahl an Mutanten machen *Arabidopsis* zum optimalen Modellorganismus.

Als sessile Organismen sind Pflanzen diversen biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Im Zuge der Evolution haben sich vielfältige strukturelle Anpassungen an die natürlichen Belastungen der Umwelt ergeben. Hervorzuheben sind die morphologischen Besonderheiten von pflanzlichen Grenzschichten. Die Epidermis, als äußerste Zellschicht, bildet das primäre Abschlussgewebe von Sprossachse und Blättern. Innerhalb der Epidermis befinden sich Zellen, die spezialisierte haarähnliche Strukturen bilden und als Trichome bezeichnet werden (Schmeil & Fitschen, 2006). Zusätzlich ist der Epidermis mit ihren Trichomen eine Wachsschicht, die sogenannte Cuticula, aufgelagert (Kolattukudy, 1996).

Trichome in Kombination mit der Cuticula bieten Schutz gegen Herbivore, Mikroorganismen, UV-Licht, transpirationsbedingtem Wasserverlust und Kälte (Uphof, 1962; Johnson, 1975; Kolattukudy, 1996).



## 1.2. Entwicklung von Wurzelhalsgallentumoren an *Arabidopsis thaliana*



**Abbildung 1** 28 Tage alter Tumor an *Arabidopsis thaliana* induziert von *Agrobacterium tumefaciens*

Bruchstellen der Cuticula bieten optimale Eintrittspforten für Pathogene. Wurzelhalsgallen entwickeln sich nach einer Infektion mit dem ubiquitär im Boden vorkommenden gramnegativen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* am Wurzelhals von verwundeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Aerts et al., 1979). Während der Infektion wird ein Teil des Tumor-induzierenden Plasmids (= Ti-Plasmid), die sogenannte T-DNA (= Transfer-DNA) von den Agrobakterien in das Wirtsgenom integriert. Die Expression der auf der T-DNA kodierenden Gene induziert Zellteilung, sowie Zellstreckung und damit die Bildung von Wurzelhalsgallen (Klee et al., 1984; Lichtenstein et al.,

1984). Phloem- und Xylemstränge verbinden den Tumor mit der Wirtspflanze, um dessen Versorgung mit Wasser und Nährstoffen zu gewährleisten (Aloni et al., 1995;

Ullrich & Aloni, 2000). Wurzelhalsgallen differenzieren keine intakte Epidermis und damit auch keine Cuticula. Zum Schutz vor einer Pathogeninvasion und transpirationsbedingtem Wasserverlust sind die Zellwände der äußersten Zellschichten des Tumors suberinisiert (Aloni et al., 1995; Efetova et al., 2007). Das pflanzliche Hormon Abscisinsäure (engl.: „*abscisic acid*“; ABA) unterstützt die Suberinisierung (Efetova et al., 2007).

## 1.3. Lipidartige pflanzliche Grenzflächen

Das Biopolymer Cutin schützt die oberirdischen Pflanzenorgane, wohingegen Suberin als Barriere-Bildner in Zellwänden definierter Zelltypen der Wurzel, des Tumors und verwundeter Areale dient (Kolattukudy, 1996; Beisson et al., 2012; Efetova et al., 2007). Sphingolipide sind Bestandteile pflanzlicher Membranen, welche den intrazellulären Raum von der Umgebung abtrennen (Markham et al., 2011). Gemeinsame molekulare Bausteine von Suberin, Cutin und Sphingolipiden sind Fettsäuren mit einer Länge von 20-30 Kohlenstoffatomen, die sogenannten VLCFAs (engl.: „*very long chain fatty acids*“).

### 1.3.1. Das Suberin

Das apoplastisch lokalisierte, hydrophobe Biopolymer Suberin verhindert unkontrollierten Wasserverlust sowie Ionenbewegungen und bietet gleichzeitig Schutz vor dem Eindringen von pathogenen Mikroorganismen (Ranathunge et al., 2011). Die wohl bekannteste Erscheinungsform von Suberin ist das Periderm der Korkeiche (*Quercus suber*), welches mehr als 50% w/v Suberin im Trockengewicht beinhaltet (Graça & Santos, 2007). Außerdem wird Suberin in der Hypodermis und Endodermis von primären Wurzeln eingelagert (Beisson et al., 2012). In letzterem fungiert die Suberin-Einlagerung zur Abtrennung der Stele vom Cortex (Peterson, 2003). Zudem können Suberin-Ablagerungen in der Abscissionsschicht von Blüten sowie in Samenschalen beobachtet werden (Franke et al., 2009; Espelie et al., 1980; Molina et al., 2008). Diverse Umweltstimuli, wie etwa Salzstress oder Sauerstoffdefizit, und auch Verwundungen können eine lokale Suberinisierung auslösen (Kolattukudy, 2001; Krishnamurthy et al., 2009; Kotula et al., 2009).

Auf subzellulärer Ebene kann in Abhängigkeit von der Entwicklungssituation Suberin in drei Formen auftreten: (i) Als Casparischer Streifen wird Suberin zusammen mit Lignin in das Netzwerk der primären Zellwand eingelagert. Der Casparische Streifen ist in den transversalen und radialen Zellwänden der Exo- und Endodermis lokalisiert. (ii) Treten sekundäre Zellwandmodifikationen auf, ist Suberin in Lagen auf der inneren Oberfläche der Zellwand, direkt außerhalb der Plasmamembran in Form von sogenannten Suberin-Lamellen aufgelagert. (iii) Schließlich kann Suberin in die inter-mikrofibrillären Kanäle der Rhizodermis als sogenanntes diffuses Suberin eingelagert werden. Dieses wird auch als inkrustiertes Suberin bezeichnet (Peterson, 2003; Steudle & Peterson, 1998; Peterson & Cholewa, 1998; Ranathunge et al., 2011).

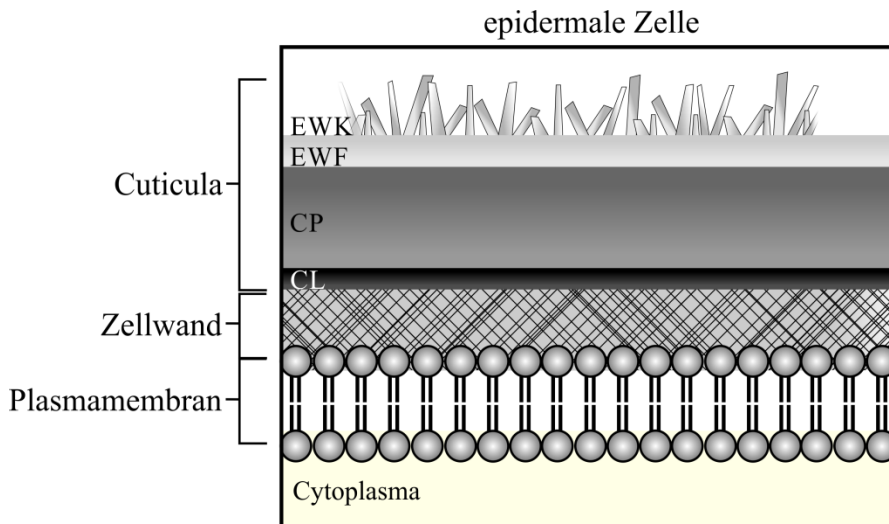
Generell wird die Struktur von Suberin als Glycerol-basierendes Polyester mit verzweigten Polyaromaten und eingelagerten Wachsen beschrieben (Bernards, 2002; Graça & Santos, 2007). Grundsätzlich lassen sich eine polyaromatische und eine polyaliphatische Domäne unterscheiden. Langkettige  $\omega$ -Hydroxy-Carbonsäuren ( $\omega$ -OHCS),  $\alpha$ ,  $\omega$ -Dicarbonsäuren ( $\alpha$ ,  $\omega$ -DCSs) sowie zu einem geringeren Anteil primäre Fettsäuren und Alkohole sind neben Glycerol die charakteristischen aliphatischen Monomere (Kolattukudy, 2001; Schreiber et al., 1999). Bei den meisten Pflanzen, mit Ausnahme von *Arabidopsis*, dominieren langkettige  $\alpha$ ,  $\omega$ -Dicarbonsäuren und gelten daher als typische Suberin-Markerverbindungen (Franke et al., 2005; Bonaventure et al., 2004). Das Suberin von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln ist insbesondere durch einfach ungesättigte  $\omega$ -Hydroxy-Carbonsäuren und  $\alpha$ ,  $\omega$ -Dicarbonsäuren charakterisiert (Franke et al., 2005). Die Kettenlängen der aliphatischen Suberinverbindungen rangieren von 16

bis 32 Kohlenstoffatomen. C<sub>18</sub>-Monomere sind, im Gegensatz zu C<sub>16</sub> und  $\geq$  C<sub>20</sub> Monomeren, meist ungesättigt oder besitzen in der Kettenmitte Oxygenierungen (Kolattukudy et al., 1975; Holloway et al., 1983). Die polyaromatische Domäne ist ein Polymer aus hauptsächlich Hydroxyzimtsäure und Ferularsäure. Ferularsäure verknüpft über die OH-Gruppen des Glycerols die aromatische mit der aliphatischen Domäne (Santos & Graça, 2006).

### 1.3.2. Die Cuticula

Neben dem Suberin sind langkettige Aliphaten Bestandteile einer extrazellulären Wachsschicht, der Cuticula. Die Cuticula ist eine 0,1-10 µm dicke, hydrophobe Schicht, die von den epidermalen Zellen synthetisiert wird und die an der Luft gelegenen Organe vaskulärer Pflanzen gegen die Umwelt abgrenzt. Sie setzt sich aus zwei lipophilen Komponenten zusammen. Dazu gehört Cutin, das ein Polymer aus überwiegend aliphatischen Fettsäuren bildet. Hauptmonomere des Cutins sind C<sub>16</sub>- sowie C<sub>18</sub>-Fettsäuren. Diese besitzen häufig ω-Hydroxylierungen. Des Weiteren treten innerhalb der Ketten Hydroxyl-, Keto- oder Epoxygruppen auf. Weniger häufige Komponenten des Cutins sind Phenole, wie z.B. p-Coumarylsäure (Fang et al., 2001) oder Glycerol (Graça et al., 2002). Während die primären Hydroxylgruppen des Cutins meist verestert sind, können die mittleren und sekundären Hydroxylgruppen auch frei vorliegen (Agullo et al., 1984). Durch die kovalenten Verknüpfungen der Monomere entsteht ein Netzwerk, das strukturell das Rückgrat der Cuticula bildet.

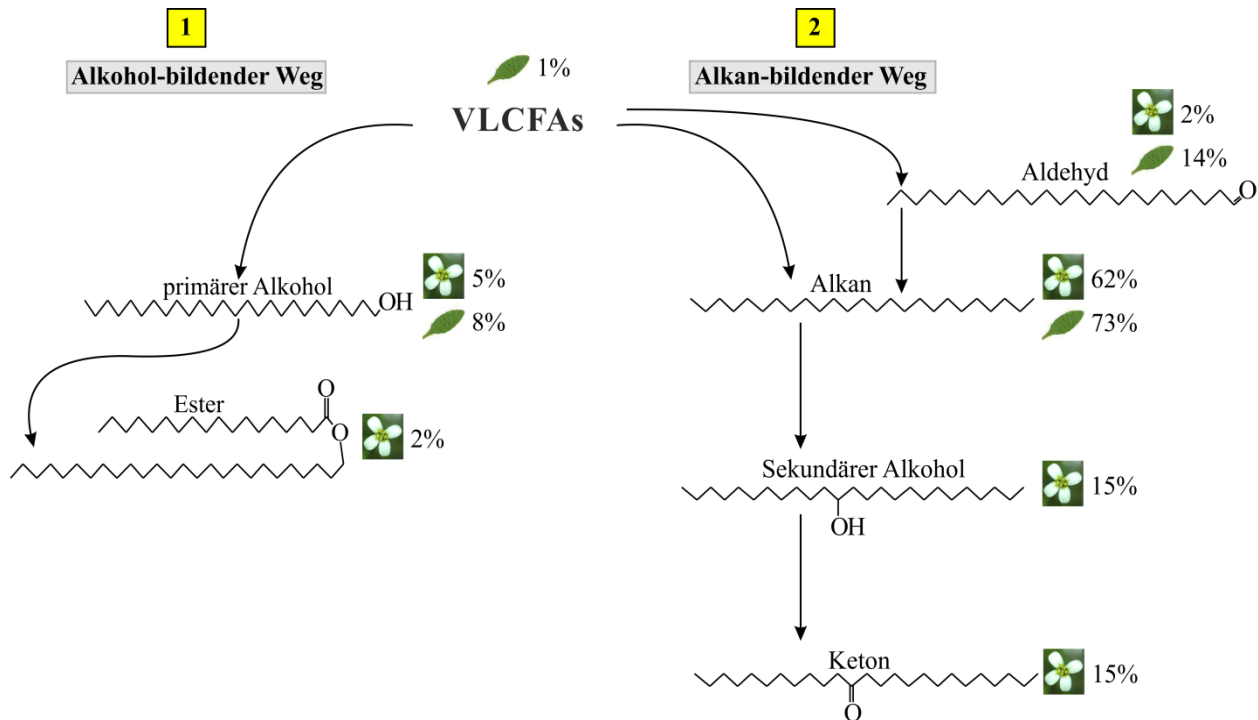
Die zweite lipophile Komponente der Cuticula stellt die Gruppe der cuticulären Wachse dar, welche insgesamt 20-60% der cuticulären Masse ausmachen (Heredia, 2003). Diese sind entweder in die Cutin-Matrix als sogenannte intracuticuläre Wachse eingelagert oder der Cuticula-Oberfläche als epicuticuläre Wachse auflagert (Jetter & Schäffer, 2001). Die Ultrastruktur der Cuticula besteht aus verschiedenen Schichten (**Abbildung 2**). Die Cutin-Matrix mit den intracuticulären Wachsen bildet die sogenannte „*cuticle proper*“ (CP). Die CP ist mit der Zellwand über die „*cuticular layer*“ (CL) verknüpft, welche aus Cutin, Wachs und Polysacchariden besteht. Die äußerste Schicht der Cuticula unterteilt sich in den epicuticulären Wachsfilm (EWF) und die epicuticulären Wachskristalle (EWK; Jeffree, 1996).



**Abbildung 2** Schematischer Querschnitt durch eine epidermale Zellschicht mit Cuticula. CL: cuticular layer (deutsch: Cuticulaschicht); CP: cuticle proper (deutsch: Cuticulahaut); EWF: epicuticulärer Wachsfilm; EWK: epicuticuläre Wachskristalle. Verändert nach Bernard & Joubès, 2013.

Die cuticulären Wachse enthalten unverzweigte  $C_{20}$ - bis  $C_{60}$ -Aliphaten (Jetter et al., 2006). Die dominierende Stoffklasse der Wachse in *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern bilden mit einem prozentualen Anteil von über 70% die Alkane. Das  $C_{31}$ -Alkan ist vor dem  $C_{29}$ - und  $C_{32}$ -Alkan prozentual das am häufigsten vorkommende Alkan. Die zweithäufigste Stoffklasse sind die Aldehyde mit 14%, gefolgt von den primären Alkoholen mit 8% und den Ketonen mit 4%. Fettsäuren sind mit 1% am geringsten vertreten (**Abbildung 3**). In Blüten von *Arabidopsis thaliana* sind zusätzlich die Stoffklassen der Ester, sekundären Alkohole und Ketone vorhanden. Die Wachsbeladung (engl.: *wax load*) von *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern ist mit 70-100  $\mu\text{g}/\text{dm}^2$  im Vergleich zu Schoten, Stängeln und Blüten mit über 1000  $\mu\text{g}/\text{dm}^2$  relativ gering (Bernard & Joubès, 2013; Kim et al., 2012).

Die einzelnen Wachsmomere werden in zwei Stoffwechselwegen gebildet. Durch den Acyl-Reduktions-Weg, auch als Alkohol-bildender Reaktionsweg bezeichnet, entstehen primäre Alkohole und Wachs-Ester mit gerader Kohlenstoffanzahl (**Abbildung 3** 1; Li et al., 2008; Rowland et al., 2006). Der zweite Weg wird als Decarbonylierungs-Weg bzw. als Alkan-bildender Weg bezeichnet (**Abbildung 3** 2). Er führt zur Entstehung von Aldehyden, Alkanen, sekundären Alkoholen und Ketonen (Samuels et al., 2008).



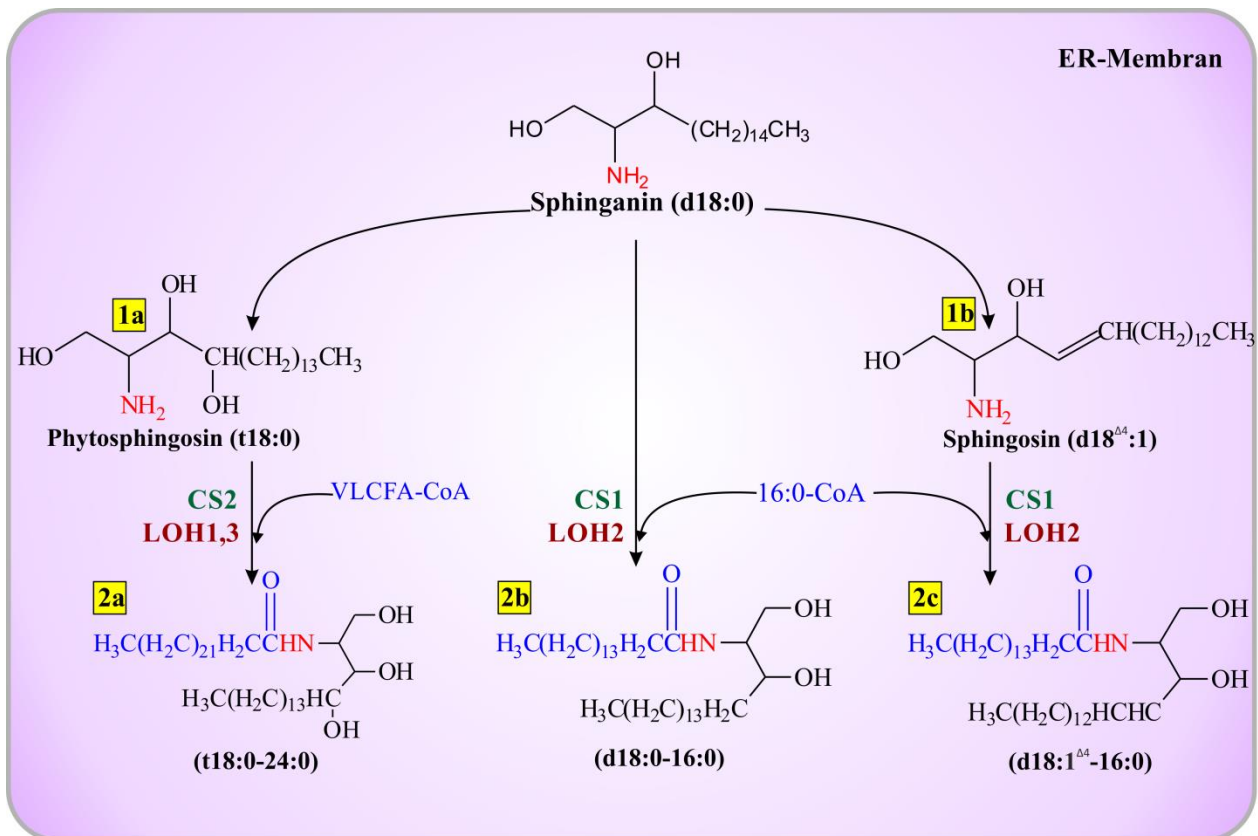
**Abbildung 3** Bestandteile von cuticulären Wachsen in *Arabidopsis thaliana* Blüten und Blättern. (1) Der Alkohol-bildende Weg führt zu den primären Alkoholen und Estern. (2) Auf dem Alkan-bildenden Weg entstehen Alkane, Aldehyde, sekundäre Alkohole und Ester. VLCFAs (engl.: „very long chain fatty acids“). Verändert nach Samuels et al., 2008.

Im Zuge des Studiums der Wachsbiosynthese wurden Mutanten von *Arabidopsis thaliana* identifiziert, deren Stängel und/oder Schoten glatte, glänzende Oberflächen besaßen (Koorneef et al., 1989). In Analogie zu den Weizen-Wachsmutanten wurden diese als Eceriferum-Mutanten (CER; lat.: „*eceriferum*“: ohne Wachs) bezeichnet. Insgesamt konnten 21 Gene isoliert werden, die eine Funktion bei der Biosynthese und dem Export von Wachsmonomeren ausüben. So wird z.B. CER5 (ABCG12; At1g51500), ein ABC-Transporter, exklusiv in epidermalen Zellen exprimiert. Es wird postuliert, dass CER5 langkettige aliphatische Wachsvorläufer über die Plasmamembran zur Zellwand transportiert (Koorneef et al., 1989; Pighin et al., 2004).

### 1.3.3. Die Sphingolipide

Neben den cuticulären Wachsen und Suberin sind langkettige Fettsäuren auch Komponenten von Sphingolipiden. Sphingolipide bilden als Bestandteile von Membranen Grenzflächen zwischen Zellen. VLCFA-beinhaltende Sphingolipide determinieren spezielle Endomembran-Kompartimente, die sogenannten Mikrodomänen, und ermöglichen die polare Lokalisation von Proteinen in der Plasmamembran (Markham et al., 2011). Die Anwesenheit von VLCFAs in Shingolipiden steigert zudem die Hydrophobizität der Membran und fördert den Übergang von der fluiden in die Gel-Phase, welche eine Voraussetzung für die Bildung von Mikrodomänen ist (Markham et al., 2011).

Sphingolipide umfassen die Klasse der Ceramide (Cer), Hydroxyceramide (HyCer), Glycosylceramide (GlcCer) und Glycosyl-Inositol-Phospho-Ceramide (GIPCs; Markham et al., 2006). Ceramide sind das Produkt der Acetylierung von VLCFAs mit langkettigen Sphingobasen (Sperling & Heinz, 2003; Dunn et al., 2004). Der erste Schritt, die Synthese der langkettigen Sphingobasen (engl.: „*long chain base*“; LCB) findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Der Grundbaustein Sphinganin (d18:0; Dihydrosphingosin) kann zu Phytosphingosin (t18:0; 4-Hydroxysphinganin) hydroxyliert oder zu Sphingosin (d18:1<sup>Δ4</sup>; 4-Spingenin) desaturiert werden (**Abbildung 4** 1a+b; Lynch, 2000; Lynch & Dunn, 2004; Sperling et al., 2004; Markham, 2013). Auch an der Fettsäurekette treten oft Modifikationen, wie  $\Delta 9$ -Desaturierungen oder 2-Hydroxylierungen auf (Imai et al., 2000; Alderson et al., 2005). In höheren Pflanzen besitzen mehr als 90% der komplexen Sphingolipide, wie GlcCer und GIPCs 2-Hydroxylierungen in der Fettsäurekette (Pata et al., 2010). Der zweite Schritt der Biosynthese von Ceramiden ist die Kombination der 4-Hydroxy LCBs mit VLCFAs zu langkettigen Ceramiden (**Abbildung 4** 2a). Diese werden hauptsächlich für die Biosynthese von GIPCs verwendet. Nicht-4-Hydroxy LCBs hingegen werden mit Palmitinsäure zu kurzkettigen Ceramiden kombiniert, die zur Produktion von Glycosylceramiden (GlcCer) verwendet werden (**Abbildung 4** 2b-c).



**Abbildung 4** Ceramid-Biosynthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER). (1a) Hydroxylierung von Sphinganine zu Phytosphingosin. (1b) Desaturierung von Sphinganine zu Sphingosin. (1a-2a) Ceramid: Addukt aus VLCFA-CoA und Phytosphingosin. (2b) Ceramid: Addukt aus Sphinganine und Palmitoyl-CoA. (1b-2c) Ceramid: Addukt aus Sphingosin und Palmitoyl-CoA. CS: Ceramid-Synthase, VLCFAs (engl.: „*very long chain fatty acids*“). Verändert nach Markham et al., 2013.

Die Synthese von komplexeren Ceramiden, wie GlcCers und GIPCs, erfolgt in der pflanzlichen Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten. Im ER werden Ceramide zu GlcCer glykosyliert, wohingegen im Golgi-Apparat eine Phosphatidyl-Inositol-Kopfgruppe auf das Ceramid-Grundgerüst unter Entstehung der GIPCs übertragen wird (Markham, 2013).

Innerhalb der Plasmamembran ist es zudem möglich, dass die freien Ceramide in der Zellwand über Ceramidasen zu Fettsäuren und LCBs hydrolysiert werden (Markham, 2013).

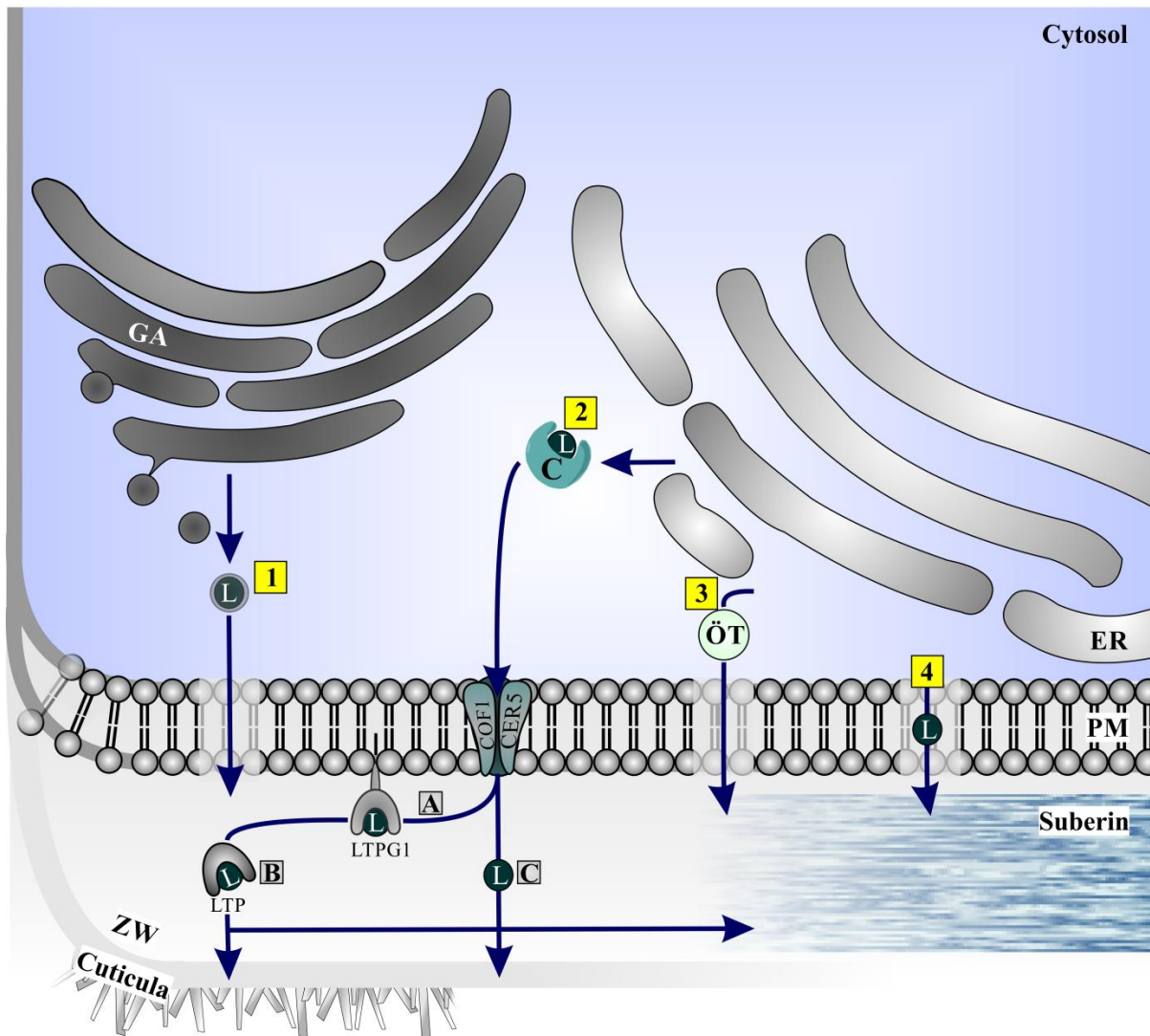
### 1.3.4. Transportwege von Lipiden

Wie und wohin die langkettigen Aliphaten nach der Degradierung der Ceramide von der Plasmamembran abtransportiert werden ist bisher unbekannt. Jedoch wurde für den Transport von komplexen Sphingolipiden aus dem Endoplasmatischen Retikulum sowie aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran eine Beteiligung von ACD11 (At2g34690; engl.: „*accelerated cell death 11*“) postuliert. ACD11 ist strukturell dem Glyco-Lipidtransferprotein (GLTP) aus Säugern, welches GlcCer zur Plasmamembran transportiert, ähnlich (Sasaki, 1985; Malinina et al., 2004). Aber *in vitro* Analysen haben gezeigt, dass ACD11 nur Sphingosin (d18:1<sup>A4</sup>) jedoch nicht Ceramide zwischen Membranen transportieren kann (Brodersen et al., 2002).

Auch der intra- und extrazelluläre Transport von aliphatischen Cutin- sowie Suberin-Monomeren ist bisher eine wissenschaftliche Grauzone. Vom Ort der Synthese, dem ER, müssen die hydrophoben Aliphaten zur Plasmamembran durch die hydrophile Umgebung des Cytoplasmas transportiert werden. Aktuell stehen vier verschiedene Möglichkeiten zur Diskussion. So könnten die Lipide in Vesikeln des sekretorischen Weges, die sich vom Golgi-Apparat oder vom ER abschnüren zur Plasmamembran transportiert werden (**Abbildung 5 1**). Lösliche, cytosolische Carrier-Proteine wie Acyl-CoA-bindende Proteine, Fettsäure-bindenden Proteine oder Lipidtransferproteine (LTPs) vermitteln möglicherweise den Transport der Monomere vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran (**Abbildung 5 2**). Diskutiert wird zudem der Transport vom ER zur Plasmamembran über Lipidtröpfchen, den sogenannten Oleosomen (**Abbildung 5 3**). Als letzte Möglichkeit wird der Austausch von Lipiden über physikalische Kontaktstellen zwischen ER und Plasmamembran vermutet (**Abbildung 5 4**; Bernard & Joubès, 2013). Dafür müssten jedoch die Enzyme der Biosynthesemaschinerie an speziellen Positionen im ER lokalisiert sein. Solch eine polare Lokalisation konnte bisher jedoch nicht bestätigt werden (Carrasco et al., 2011).

In einem nächsten Schritt müssen die Lipide die Plasmamembran passieren. Dieser Transport erfolgt aktiv durch die Mitglieder der ABC-Transporter-Familie (engl.: „*ATP-binding cassette*“). Der erste Transporter der ABC-Familie, für den eine Beteiligung am Export von aliphatischen cuticulären Wachsmomeren gezeigt werden konnte, ist CER5 (ABCG12; At1g51500; Pighin et al., 2004).





**Abbildung 5** Transportwege von Suberin- und Cutinmonomeren (grüner Kreis). Transport vom ER zur Zellwand (1-4). (1) Sekretorischer Weg über Golgi-Vesikel; (2) Transport mittels cytosolischer Protein-Carrier; (3) Transport über Öltröpfchen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER); (4) Transport über Kontaktstellen zwischen ER und Plasmamembran. Export von Wachsmonomeren über die Plasmamembran z.B. mittels ABC-Transporter (CER5 & COF1-Heterodimer). Putative Transportwege innerhalb des Apoplasten (A-C). (A) Transport über LTPG1; (B) Transport über lösliche LTPs; (C) freie Diffusion durch die Zellwand. C: Carrier; ER: Endoplasmatisches Retikulum; GA: Golgi Apparat; L: Lipid-Monomer; LTP: Lipidtransferprotein LTPG1: Lipidtransferprotein mit Membran-Anker; ÖT: Öltröpfchen; PM: Plasmamembran; ZW: Zellwand. Verändert nach Barnard & Joubès, 2013.

Es wird vermutet, dass CER5 gemeinsam mit COF1 (ABCG11, WBC11; At1g17840) Heterodimere bildet, die den Export von Wachsmonomeren über die Plasmamembran ermöglichen (**Abbildung 5**; Rashotte et al., 2004; Bird et al., 2007; Samuels et al., 2008). Ob eine ähnliche Exportmaschinerie für Suberin-Monomere existiert, wurde bisher noch nicht geklärt. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Lipidtransferprotein LTPG1 (At1g27950) das C<sub>29</sub>-Alkan zur Pflanzenoberfläche transportiert. LTPG1 besitzt neben einem N-terminalen Exportsignal noch eine C-terminale Domäne, die als Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) fungiert.

Mittels dieses GPI-Ankers ist das LTP an der extrazellulären Seite der Plasmamembran an sogenannten Membranmikrodomänen lokalisiert. Durch physikalische Interaktionen könnte LTPG1 von den ABC-Transportern mit dem C<sub>29</sub>-Alkan beladen werden, um das Lipid zur Pflanzenoberfläche zu transportieren (**Abbildung 5 A**; DeBono et al., 2009; Lee et al., 2009).

Der letzte Schritt im Transportweg ist die Durchquerung des engen, chemisch und physikalisch stabilen Pektin-Netzwerkes der Zellwand. Da dieses Netzwerk die Diffusion von lipophilen Material behindert, wird hier ein gerichteter Transport vermutet (**Abbildung 5 C**). Innerhalb der Zellwand sollen freie, ungebundene LTPs die Lipide z.B. von LTPG1 übernehmen und zum wachsenden Netzwerk der Cuticula bzw. des Suberins transportieren (**Abbildung 5 B**; DeBono et al., 2009). Ob das Lipidtransferprotein LTP2 am Transfer von Lipiden durch die Zellwand beteiligt sein könnte, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

#### **1.4. Lipidtransferproteine (LTPs)**

Die Evolution von Cutin und Suberin während des Landgangs der Pflanzen wurde begleitet von dem Auftauchen der Lipidtransferproteine (engl.: „*lipid transfer protein*“; LTP; Edstam et al., 2011).

Ursprünglich wurde angenommen, dass LTPs als Bestandteile des intrazellulären Transportsystems lipophile Phospholipide durch das hydrophile Cytoplasma zu Chloroplasten oder Mitochondrien transportieren können. Mit der Entdeckung der N-terminalen Exportsequenz des sogenannten LTP Pro-Proteins wurde dieser Gedanke verworfen (Sterk et al., 1991; Bernhard et al., 1991). Lokalisationsstudien zeigen eine apoplastische Lokalisation der LTPs in der Nähe der Zellwand (Thoma et al., 1994; Segura et al., 1993; Pyee & Kolattukudy, 1995).

### 1.4.1. Struktur und Bindepartner pflanzlicher LTPs

LTPs treten ubiquitär in allen Gefäßpflanzen auf. Nahezu 4% aller löslichen Proteine in Mais sind Lipidtransferproteine (Wirtz, 1991; Kader, 1996). Auf Basis der Datenbank, Swiss-Prot Pfam Motifs PF0234, konnten bisher 49 verschiedene Lipidtransferproteine in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, welche sich in neun Untergruppen aufteilen (Arondel et al., 2000; Beisson, 2003; Boutrot et al., 2008). Dabei sind 18 von 49 LTPs in sieben tandemartigen direkten Wiederholungen auf den fünf Chromosomen von *Arabidopsis* angeordnet (Boutrot et al., 2008). Weitere 31 LTPs besitzen einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) und werden als LTPGs bezeichnet (Boutrot et al., 2008).

Über Röntgenstrahlen konnte die Struktur von *Zea mays* LTP-Proteinkristallen analysiert werden (Dong et al., 1995, Han et al., 2001). Hinzu wurden mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie einige weitere dreidimensionale Strukturen pflanzlicher LTPs aufgelöst. Dazu gehört z.B. das LTP2 von *Oryza sativa* (Reis; Samuel et al., 2002). Die Primärstruktur der LTP-Proteine weist acht konservierte Cysteine auf, die vier Disulfidbrücken ausbilden können (Samuel et al., 2002). Die Sekundärstruktur besteht aus vier  $\alpha$ -Helices, wohingegen das Carboxy-terminalen Ende keine definierte Struktur besitzt (Samuel et al., 2002). Durch die große Anzahl an negativ geladenen Aminosäureresten kommt ein sehr hoher isoelektrischer Punkt (pI) zustande. Die Tertiärstruktur zeichnet sich durch einen flexiblen, hydrophoben Tunnel aus, welcher die gesamte Achse des Proteins durchspannt und folglich über zwei Eingänge verfügt. Dies hat eine verminderte Spezifität für den Bindepartner zu Folge (Samuel et al., 2002).

Um die Lipid-Bindepartner von pflanzlichen LTPs zu identifizieren, wurden Bindestudien durchgeführt. Analysen an Proteinkristall-Lipid-Komplexen des *Zea mays* LTPs zeigten, dass Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>) ebenso wie Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) in den hydrophoben Tunnel passen (Dong et al., 1995; Han et al., 2001). Die Bindeaffinität wird jedoch durch die Anzahl mehrerer Doppelbindungen, sowie durch Hydroxyl-Reste reduziert (Zachowski, 1998). Die Kristallstruktur des nsLTP1 aus Weizen zeichnete sich durch die Bindung von zwei Lyso-Myristoyl-Phosphatidylcholin-Molekülen aus (LMPC; Charvolin et al., 1999). Hingegen konnte für das *Nt*LTP1 aus Tabak die Bindung von nur einem Lyso-Myristoyl-Phosphatidylcholin-Molekül ermittelt werden. Zudem bindet das *Nt*LTP1 auch cis-ungesättigte Fettsäuren sowie Jasmonsäure mit größerer Affinität als lineare gesättigte Fettsäuren (Da Silva et al., 2005; Buhot et al., 2004).

### 1.4.2. Prozesse an denen pflanzliche LTPs beteiligt sind

In Arabidopsis wurden bisher zwei LTPs, DIR1 (At5g48485, engl.: „*defective in induced resistance*“) und AZI1 (At4g12470, engl.: „*azelaic acid induced 1*“), mit Signalwirkung entdeckt. Für DIR1 wird eine Beteiligung am Langstreckentransport von Signalmolekülen diskutiert (Maldonado et al., 2002; Jung et al., 2009) und für AZI1 die Involvierung an Salicylsäure-vermittelten Abwehrreaktionen. Andere LTPs besitzen eine antibakterielle sowie fungizide Wirkung. Das LTP von *Phaseolus mungo* Samen (Mungbohne) inhibiert z.B. die Ausbreitung von pilzlichen und bakteriellen Pathogenen (Wang et al., 2004). Die Überexpression von LTP2 in Weizen führt zu einer verminderten Resistenz gegenüber *Pseudomonas* (Molina & Garcia-Olmedo, 1997). Andere LTPs wiederum sind stabile Allergene und werden in hohen Konzentrationen in Fruchtschalen gefunden, wie z.B. Pru p 3 aus Pfirsich (Sanchez-Monge et al., 1999). Auch eine Rolle von LTPs als Schwermetall-Fänger ist in der Literatur dokumentiert (Gorjanović et al., 2004).

Von Nieuwland und seinen Mitarbeitern wurde die Hypothese aufgestellt, dass *NtLTP* zum Verlust der Membranintegrität führt, indem es mit dem Cellulose/Xyloglucan Netzwerk der Zellwand interagiert. Der resultierende Komplex mit geladener Oberfläche könnte dann die umgebenden Wasserstoffbrücken zwischen der Cellulose und der Hemicellulose spalten (Nieuwland et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das LTP-ähnliche Protein SCA (engl.: „*stigma/style cystein-rich adhesin*“) aus *Lilium longiflorum* (Oster-Lilie) wichtig für die Pollenschlauch-Adhäsion ist (Park et al., 2000; Zhao et al., 2003; Chae et al., 2009). Ein zu SCA homologes Protein in Arabidopsis ist LTP5 (At3g51600). Eine Beteiligung von LTPs an der Assemblierung der Cuticula wurde bereits 1996 von Kader postuliert (Kader, 1996). Gezeigt wurde dies später bei der Arabidopsis Doppelmutante *ltpg1/ltpg2*. Diese weist insgesamt eine reduzierte Wachsbeladung und speziell eine Reduktion des C<sub>29</sub>-Alkans in der Cuticula von Spross und Schoten auf. Dies wird als Hinweis dafür gewertet, dass beide LTPGs an der Akkumulation und somit dem Export von aliphatischen Wachsvorläufern beteiligt sind (Lee et al., 2009; Kim et al., 2012).

## 1.5. Ziel der Arbeit

Von den 49 bekannten Lipidtransferproteinen ist in durch *Agrobacterium tumefaciens* induzierten Tumoren an *Arabidopsis thaliana* ausschließlich das Lipidtransferprotein 2 (LTP2; At2g3840) stark induziert. In der vorliegenden Arbeit sollen insbesondere die Funktion von LTP2, sowie dessen Bedeutung bei der Bildung von Tumoren aufgeklärt werden.

Mit Hilfe der GUS-Färbung gilt es die Expression von *LTP2* im gesamten Kormophyten zu ermitteln. Eine weitere Aufgabe ist die subzelluläre Lokalisation des Fluoreszenz-markierten Proteins. Wird die postulierte apoplastische Lokalisation bestätigt, könnte dies ein Indiz dafür sein, dass das Protein Lipide innerhalb des Apoplasten transferiert.

Zur Charakterisierung der Eigenschaften des Lipidtransferproteins *in planta* sollen transgene Pflanzenlinien zu generiert werden, welche *LTP2* ektopisch in den Epidermiszellen exprimieren. Eine Expression von *LTP2* in epidermalen Blattzellen könnte das Lipid-Profil der Cuticula beeinflussen. Da die Cuticula ein einfach zu isolierendes Lipid-Biopolymer ist, können die resultierenden transgenen Pflanzen bezüglich der Oberflächeneigenschaften der oberirdischen Organe und der cuticulären Wachszusammensetzung untersucht werden.

Um zu entschlüsseln, ob LTP2 einen Effekt auf das Lipidmuster der Pflanze besitzt, sind Mutanten ohne *LTP2*-Gen-Expression zu analysieren. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der ungerichteten Lipidanalyse, denn diese ermöglicht das Erkennen von Unterschieden im Gesamtlipidmuster von Wildtyp Pflanzen und Mutanten.

Zur funktionellen Charakterisierung von LTP2 sollen Bedingungen untersucht werden, unter denen *LTP2* stark exprimiert wird. Hierzu muss die Auswirkung tumortypischer biotischer und abiotischer Stressstimuli, wie Agrobakterien, ABA und Verwundung auf die *LTP2*-Gen-Expression analysiert werden. Des Weiteren sollen Tumore an Mutanten bezüglich ihrer Morphologie und der Suberin-Zusammensetzung im Vergleich zum Suberin von Wildtyp-Tumoren analysiert werden.

Abschließend sind die Bindeeigenschaften von LTP2 zu untersuchen. Im Fokus steht die heterologe Expression in bakteriellen *E.coli* Zellen, sowie in pflanzlichen *BY-2* Zellkulturen. Mit Hilfe eines Lipid-Protein-Overlay-Assays soll dann gezeigt werden, welche Lipide LTP2 *in vitro* binden kann. Zusammenfassend trägt diese Studie zum Verständnis dazu bei, welche Rolle LTP2 bei der Modifikation pflanzlicher Zellwände als Antwort auf diverse Stimuli einnimmt.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Kultivierung und Arbeiten mit Pflanzen

#### 2.1.1. Erdkulturen von *Arabidopsis thaliana*

Samen von *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Wassilewskija (WS-2) und Columbia (Col-0), sowie diverser Mutanten-Linien (**Tabelle 1**) wurden auf Einheitserde (Glasmann, Standard Pikier-Erde) kultiviert. Eine Synchronisation der Keimung erfolgte durch viertägige Kälteapplikation (4°C). Drei Wochen nach der Keimung, dies entsprach dem Erscheinen der ersten Sekundärblätter, wurden die Pflanzen pikiert. Die weitere Anzucht erfolgte ausschließlich im Percival (Percival Scientific, AR-60L S; [www.percival-scientific.com](http://www.percival-scientific.com)) unter Kurztagbedingungen bei einer Lichtmenge von 100-120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (TL70, Philips, Eindhoven, Niederlande und Osram 25 W, Osram, München, Deutschland). Die Lichtphase umfasste acht Stunden bei 22°C, die Dunkelphase 16 Stunden bei 16°C. Die relative Luftfeuchte betrug jeweils 50-60%. Sämtliche Samen wurden im getrockneten Zustand bei 4°C gelagert.

#### 2.1.2. Selektion transgener *Arabidopsis thaliana*

Stratifizierte Samen (4°C, vier Tage) transgener Pflanzen wurden auf Bewässerungsfilz (Meyer) ausgesät. Dafür wurden je drei Lagen Filz mit Nährmedium ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1,5 mM;  $\text{KNO}_3$ , 1,25 mM;  $\text{MgSO}_4$ , 0,75 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM;  $\text{Na}_2\text{OSi}$ , 100  $\mu\text{M}$ ; Fe-EDTA, 72  $\mu\text{M}$ ; KCL, 50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4$ , 2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$  2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$ , 1,5  $\mu\text{M}$ ;  $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0,075  $\mu\text{M}$ ; in deionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$ ), und 100  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin zur Selektion getränkt. Alle zwei Tage erfolgte eine Bewässerung. Wöchentlich wurde Nährmedium appliziert und alle zwei Wochen Antibiotikum dem Nährmedium zugemischt. Die überlebenden Pflanzen wurden vorsichtig mit einer Pinzette vom Filz befreit und in Töpfe mit Einheitserde überführt (Glasmann Standard Pikier-Erde). Die weitere Anzucht ist unter **2.1.1.** beschrieben.

### 2.1.3. Sterile Wurzelkulturen von *Arabidopsis thaliana*

Für die Herstellung steriler Wurzelkulturen wurden *Arabidopsis thaliana* Samen oberflächensterilisiert. Dafür wurden die Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und mit 700 µl absolutem Ethanol für 20 Minuten durchmischt. Nach der Abnahme des Überstandes wurden die Samen in 5% (v/v) Natriumhypochlorid-Lösung mit 0,2% (v/v) Triton X-100 für zehn Minuten inkubiert (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Anschließend wurde die Sterilisations-Lösung abgenommen und die Samen fünf bis sechsmal mit sterilisiertem, destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden 10-20 Samen in einen Erlenmeyerkolben transferiert, der 150 ml steriles MS-Medium mit Gamborgs B5 Vitaminen (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und 1% (w/v) Saccharose enthielt. Die Anzucht erfolgte unter sanfter Rotation mit 50 rpm (GFL 3017, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland) für drei Wochen bei Raumtemperatur.

### 2.1.4. Arabidopsis Linien und Genotypen

Samen der *LTP2*-T-DNA-Insertionsmutante der Arabidopsis T-DNA Insertions-Kollektion des Nottingham Arabidopsis Stock Center (GK-639E08; NASC Stock Nummer: N736747) wurden PCR-basierend genotypisiert. Dieser Arbeitsschritt ist in Punkt 2.5.9. nachzulesen.

**Tabelle 1** Verwendete transgene Arabidopsis Pflanzenlinien

Arabidopsis Mutante	Genlocus	Ökotyp	Referenz
<i>ltp2KO</i> *	At2g38530	Col-0	Gabi-Kat, University Bielefeld, Deutschland (GK-639E08; NASC Stock Nummer: N736747; 2.5.9.).
<b>LTP2<sub>Prom</sub>::GUS</b>	At2g38530	WS-2	Siehe Diplomarbeit: Stefanie Saupe. Generiert mittels des Vektors pmdc164-LTP2 <sub>Prom</sub> :GUS (2.9.1.; Anhang Tabelle 7, Anhang Abbildung 4).
<b>CER5<sub>Prom</sub>::LTP2</b>	At2g38530	WS-2	In dieser Arbeit mittels des binären Vektors pCambia3300-CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2 generiert (2.7.2.2.; Anhang Tabelle 4, Anhang Tabelle 7, Anhang Abbildung 3).

\* bewiesen mittels qRT-PCR

### **2.1.5. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* über „Floral Dipping“**

Zur Generierung stabiler *Arabidopsis thaliana* Mutanten-Linien wurde leicht verändert die von Clough & Bent (1998) beschriebene „Floral Dipping“ Methode angewendet. Zur Erhöhung der Anzahl der Blüten wurden die ersten Infloreszenzen abgeschnitten, um die schnelle Entwicklung von sekundären Infloreszenzen zu induzieren. Einen Tag vor der Transformation wurden die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen stark gewässert und somit in hoher Luftfeuchte kultiviert. Am Folgetag wurden die Übernachtskulturen (2.2.1.; 2.2.2.) von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58 bzw. GV3101) mit dem entsprechenden binären Plasmid bei 2.500 rcf für 15 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in AB-Medium (2.2.2.) resuspendiert, mit Acetosyringon (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zu einer Endkonzentration von 150 µM versetzt und für zwei Stunden in Dunkelheit bei 28°C regeneriert. Nach der Zugabe von 0,03% (v/v) Silwet-L77 (OSi Specialties inc., Danbury, USA) wurde die Bakteriensuspension vorsichtig über die Blüten pipettiert. Die mit Agrobakterien behandelten Pflanzen wurden über Nacht weiterhin bei hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert, um das Austrocknen der Agrobakterien zu verhindern. Anschließend wurden die Pflanzen im Percival (Percival Scientific, AR-60L S) bis zur Samenernte kultiviert. Die Samen der selektionierten transformierten Pflanzen der T<sub>1</sub>-Generation wurden gesondert geerntet und auf Erde oder Filz (2.1.1.; 2.1.2) ausgesät. Alle Pflanzenlinien wurden für die Experimente ausschließlich in der homozygoten T<sub>3</sub>-Generation verwendet.

### **2.1.6. Tumorinduktion und Präparation an *Arabidopsis thaliana***

Die Tumorentwicklung an *Arabidopsis thaliana* Infloreszenzen wurde induziert durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*, Stamm C58 (Tabelle 2) mit den jeweils entsprechenden Plasmiden. Die Agrobakterien wurden über Nacht in KB-Medium (2.2.1.; 2.2.2.) kultiviert bis die Suspension eine OD<sub>600</sub> von eins erreicht hatte. Danach wurden die Bakterien, wie unter 2.2.2. beschrieben, vom KB-Medium in AB-Medium überführt und für zwei Stunden regeneriert. Mit einer Spritze wurde dann die Suspension oberhalb der Rosettenblätter in die Infloreszenz-Achse injiziert. Insgesamt wurde viermal übereinander über eine Distanz von 1 cm, und weitere viermal in die um 90° gedrehte Infloreszenz-Achse eingestochen. Das Tumorgewebe wurde von der Infloreszenzachse mittels eines Skalpell 28 Tage nach der Infektion abgetrennt, bei -80°C aufbewahrt und für weitere Experimente verwendet.

### **2.1.7. Erdkulturen von *Nicotiana benthamiana***

Die von K. Oparka (Scottish Crop Research Institute, Dundee, England) zur Verfügung gestellten *Nicotiana benthamiana* Samen wurden auf Einheitserde Type T (Gebr. Hagera GmbH, Sinntal-



Jossa, Deutschland) angezogen. Ihre Kultivierung erfolgte im Gewächshaus bei einem Tag-Nacht Rhythmus von 16 Stunden (bei 24°C) und acht Stunden (bei 24°C) und einer Lichtintensität von 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **2.1.8. Suspensionskulturen von *Nicotiana benthamiana***

Die *BY-2* (engl.: „*Bright Yellow-2*“) Suspensionskulturen des Julius-von-Sachs-Institutes für Biowissenschaften, Botanik I wurden bei Dunkelheit, 120 rpm und einer Temperatur von 25°C (INFORS AG, CH-4103; Bottmingen, Schweiz) kultiviert. Wöchentlich wurden 5 ml Suspensionskultur in 45 ml autoklaviertes Wachstumsmedium nach Nagata, 1992 (1 x MS+MES (Duchefa #M0254M); Saccharose, 3% (w/v); myo-Inositol, 0,1 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g/l; Thiamin, 0,1 g/l; 2,4D, 0,2 mg/l; pH=5,6 mit KOH) überführt.

### **2.1.9. Transformation von *Nicotiana benthamiana* Suspensionskulturen**

*Nicotiana benthamiana* *BY-2* Suspensionskulturen des Julius-von-Sachs-Institutes für Biowissenschaften, Botanik I wurden nach der „Oberflächenkultur-Tropfmethode“ (Rahmat, 2002) wie folgt transformiert. Flüssige Übernachtskulturen von *Agrobacterium tumefaciens*, Stamm GV3101 und einem entsprechenden binären Vektor (2.2.1.; 2.2.2.; **Anhang Abbildung 2**) wurden in KB-Medium bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4-0,6 kultiviert (2.2.1.) und anschließend wie in 2.1.5. beschrieben in AB-Medium mit Acetosyringon überführt. Die *BY-2* Suspensionskultur wurde unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von Pasteur-Pipetten auf 6-Well-Platten in jeweils 5 ml Aliquote aufgeteilt und mit 20-30  $\mu\text{l}$  Agrobakteriensuspension versetzt. Zwei Tage wurde die Co-Kultur bei 21°C in Dunkelheit inkubiert unter leichtem Schwenken bei 50 rpm kultiviert. Danach wurde 1 ml der Kultur in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 49 ml Wachstumsmedium (2.1.8.) und 200 mg/l Timentin zum Abtöten der Agrobakterien überimpft. Nach weiteren zehn Tagen in Dunkelheit bei 21°C und 50 rpm wurden 5 ml der transformierten *BY-2* Kultur in 45 ml Wachstumsmedium (2.1.8.) mit halber Antibiotikakonzentration (Kanamycin, 25  $\mu\text{g/ml}$ ; steril filtriert; Endkonzentration: 50  $\mu\text{g/ml}$ ) suspendiert. Erneute zehn Tage später wurden 5 ml der transformierten *BY-2* Zellkultur in 45 ml Wachstumsmedium mit vollständiger Antibiotikamenge (Kanamycin, 25  $\mu\text{g/ml}$ ; steril filtriert; Endkonzentration: 100  $\mu\text{g/ml}$ ) überführt. Die erfolgreiche Transformation wurde mittels PCR überprüft (2.5.4., **Anhang Tabelle 5**). Einmal pro Woche wurden jeweils 5 ml Suspensionskultur in 45 ml neues Medium überführt.

### 2.1.10. Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* und Plasmolyse

Für die transiente Gen Expression in *Nicotiana benthamiana* Blättern wurde die „*Agrobacterium-Infiltrations-Methode*“ nach Romeis et al. (2001) durchgeführt. Verwendung fanden der *Agrobacterium*-Stamm GV3101, der das binäre 19K Plasmid besitzt, welches das posttranskriptionelle „*Gen-silencing*“ (Liu et al., 2002) unterdrückt sowie die jeweiligen GV3101 Stämme mit den entsprechenden binären Plasmiden (**Anhang Abbildung 7**, **Anhang Abbildung 8**). Alle Stämme wurden in 30 ml einer Übernachtskultur in KB-Medium (2.2.1.; 2.2.2.) bis zu einer OD<sub>600</sub> von eins angezogen und bei 2.500 rcf für zehn Minuten zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden dann in 5 ml Agromix-Puffer resuspendiert (MES, 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; Acetosyringon, 150 µM; in deionisiertem Wasser; pH=5,8) und zwei Stunden in Dunkelheit bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden die verschiedenen GV3101-Stämme mit dem GV3101 19K Stamm im Verhältnis 1:3 gemischt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde dann mit einer Spritze ohne Nadel in die abaxiale Seite von 3-4 Wochen alten, gut gewässerten Tabakblättern infiltriert. Das Pflanzenmaterial wurde drei Tage nach der Infektion für fluoreszenzmikroskopische Analysen verwendet (2.9.2.). Zur Plasmolyse wurde den Pflanzenschnitten 1 M KNO<sub>3</sub> zugefügt. Nach zehnminütiger Inkubation erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Detektion.

### 2.1.11. Protoplastierung von *Nicotiana benthamiana*

Die Protoplastierung von Mesophyllzellen aus *Nicotiana benthamiana* Blättern wurde nach der Transformation (2.1.10.) nach Sheen (2002), durchgeführt. Dafür wurden mehrere Blätter vier Tage nach der transienten Transformation (2.1.10.) aufeinander gelegt und mit einem Skalpell in 0,5-1 mm dünne Streifen geschnitten. Die Blattfragmente wurden dann sofort in eine Petrischale mit Enzymlösung (MES, 20 mM; Mannitol, 0,4 M; KCl, 2 M; Cellulase, 1% (w/v); Macerozym R10, 0,4% (w/v) in H<sub>2</sub>O gelöst und 10 min bei 55°C inkubiert; Zugabe von CaCl<sub>2</sub> 10 mM und BSA, 0,1% (w/v) bei Raumtemperatur; Osmolarität mit Mannitol auf 560 mOs) transferiert. Die Petrischale wurde mit Alufolie ummantelt und für zehn Minuten unter Vakuum im Exsikkator inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz drei Stunden bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Danach wurde die Protoplastenlösung mittels Nylongaze mit einer Maschenweite von 35 µm filtriert und in W5-Lösung (Mannitol, 0,4 M; MgCl<sub>2</sub>, 15 mM; MES, 4 mM; pH= 5,7; Osmolarität mit Mannitol auf 560 mOs) aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei 100 rcf (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden die Protoplasten in 2 ml W5 Lösung resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend der fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen (2.9.2.).

## 2.2. Kultivierung und Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*

### 2.2.1. Wachstumsbedingung

Die verschiedenen *Agrobacterium tumefaciens* Stämme (**Tabelle 2**) wurden als Stocks in 50% (v/v) Glycerin-haltiges KB-Medium (**2.2.2.**) bei -80°C gelagert. Zur Kultivierung wurde eine kleine Menge des Stocks mittels einer Impföse auf **King's Broth-Agar-Platten** (KB; **2.2.2.**), die das entsprechende Antibiotikum beinhalteten, ausgestrichen (**Tabelle 2, Tabelle 5**). Die weitere Kultivierung erfolgte dann bei 28°C für 48 Stunden. Einzelne Kolonien wurden anschließend in KB-Flüssigmedium transferiert und über Nacht in Dunkelheit mit 220 rpm und einer Temperatur von 28°C im Bakterien-Schüttler inkubiert (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA). Bis zu vier Wochen wurden die Agar-Platten mit den Bakterienstämmen bei 4°C gelagert. Zum Erhalt der Vitalität mussten sie dann auf neue Platten umgesetzt werden.

### 2.2.2 Selektions- und Wachstumsmedien

Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Stämme (**Tabelle 2**) wurden sowohl in **King's Broth Flüssigmedium** (KB-Medium; Protease Pepton, 2% (w/v); Glycerin, 1% (v/v); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,86 mM) als auch auf KB-Agarplatten kultiviert (King et al., 1954). Um ein Ausfallen des Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu verhindern, durften erst nach dem Autoklavieren 5 ml einer 1 M Lösung dem Medium hinzugefügt werden. Des Weiteren wurden nach dem Abkühlen der autoklavierten Medien auf unter 60°C die entsprechenden Antibiotika (**Tabelle 5**) zugefügt. Für die Transformation von Arabidopsis Blüten („*Floral Dipping*“, **2.1.5.**), der Infiltration von Tabak-Blättern (**2.1.10.**) sowie der Tumorinduktion an Arabidopsis Infloreszenzen (**2.1.6.**) wurde zudem das AB-Minimalmedium (AB; engl.: „*autoinducer bioassay medium*“) verwendet. Die Bestandteile der 20 x AB-Salz-Lösung (NH<sub>4</sub>Cl, 20 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,6 g/l; KCl, 3 g/l; CaCl<sub>2</sub>, 0,2 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 mg/l) und der Phosphat-Lösung (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g/l) wurden in deionisiertem Wasser gelöst und bei einer Temperatur von 120°C für 30 Minuten autoklaviert. Im Anschluss wurden 50 ml der 20 x AB-Salz-Lösung, 2,4 ml der Phosphat-Lösung und 10 ml einer steril filtrierten 20%igen (w/v) Glucose-Lösung zu 937,6 ml AB-Puffer (AB-Salz-Lösung, 50 ml/l; MES, 3 g/l; pH=5,5 mit KOH) zugefügt. Zuletzt wurden 100 µl steril filtriertes Thiamin (10% (w/v)) hinzu pipettiert. Um die Virulenz der Bakterien zu induzieren erfolgte für die Transformation von Arabidopsis Blüten („*Floral Dipping*“, **2.1.5.**) außerdem die Zugabe von 150 µM Acetosyringon.

**Tabelle 2** Verwendete Agrobakterienstämme

<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm	Antibiotika	Virulenz	Zusatzplasmid	Referenz
<b>C58</b>	-	onkogen	-	Hamilton & Fall, 1971; Max Planck Institute für Pflanzenzucht, Köln, Deutschland
<b>GV3101</b>	Rifampicin (10 µg/ml) Gentamycin (25 µg/ml)	nicht onkogen. Derivat von C58	pMP90	Koncz & Schell, 1986
<b>GV3101 19K</b>	Rifampicin (10 µg/ml) Gentamycin (25 µg/ml) Kanamycin (100 µg/ml)	nicht onkogen. Derivat von GV3101	19K (Helferplasmid reprimiert post- transkriptionelles „gene- silencing“)	Liu et al., 2002
<b>C58 pJZ383</b>	Spectinomycin (100 µg/ml)	onkogen Derivat von C58	pJZ383 (P <sub>tac</sub> ::gfpmut3) GFP-Fusion zur Lokalisation	Cormack et al., 1996

### 2.2.3. Transformation mittels Elektroporation

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden 0,5 ml einer Übernachtskultur (2.2.1.; 2.2.2.) der Stämme GV3101 bzw. C58 (Tabelle 2) bei 2.000 rcf eine Minute lang zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend viermal in deionisiertem Wasser gewaschen und danach in 50 µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Eine gekühlte 2 mm Elektroporator-Küvette wurde mit der Bakteriensuspension und 100-200 ng des entsprechenden Plasmides gefüllt. Die in den Elektroporator (Elektroporator 2510, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingesetzte Küvette wurde bei einer Kapazität von 25 µF, einem elektrischen Widerstand von 400 Ω und einer Spannung von 2500 V für einen Zeitraum von 5 bis 6 ms ausgesetzt. Sofort nach der Elektroporation wurde die Bakterienlösung in 400 µl KB-Medium (2.2.2.) resuspendiert und für circa eine Stunde bei Dunkelheit einer Temperatur von 28°C und 220 rpm inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf KB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotika ausplattiert (Tabelle 2, Tabelle 5).

## 2.3. Kultivierung und Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 2.3.1. Wachstumsbedingungen

Die verschiedenen *Escherichia coli* Stämme (**Tabelle 3**) wurden als Stocks in 30% (v/v) Glycerin-haltigem LB-Medium (**2.3.4.**) bei -80°C gelagert. Zur Kultivierung wurde ein Teil des Glycerin-Stocks mittels einer Impföse auf LB-Agar-Platten (LB; **Lysogeny Broth**), welche das entsprechende Antibiotikum beinhalteten, ausgestrichen (**Tabelle 4, Tabelle 5**). Auf den Agar-Platten konnten die Stämme bei 4°C gelagert werden. Zum Erhalt der Vitalität wurden die Stämme alle vier Wochen umgesetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte dann bei 37°C und 220 rpm über Nacht in einem Schüttler (G25, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA). Dafür wurde eine Pipettenspitze Kultur in 200 ml Wachstumsmedium angesetzt.

### 2.3.2. Selektions- und Wachstumsmedien

Für die Anzucht aller verwendeten *Escherichia coli* Stämme wurde LB-Medium (**Lysogeny Broth**) verwendet. Dafür wurden 2% (w/v) Glucose, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt und 171 mM NaCl in deionisiertem Wasser gelöst und das Medium anschließend für 30 Minuten bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar (Agar-Agar, Kobe I; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Die entsprechenden Antibiotika wurden entsprechend **Tabelle 5** nach dem Abkühlen dem Medium bei ca. 50°C zugegeben. Zur Bakterientransformation wurde zusätzlich autoklaviertes SOC-Medium (**Super Optimal Broth**) benötigt (Hanahan, 1983). Dieses setzte sich aus den Komponenten: Trypton, 2% (w/v); Hefeextrakt, 0,5%; NaCl, 8,6 mM; MgSO<sub>4</sub>, 20 mM) und 2% (w/v) Glucose zusammen.

**Tabelle 3** Verwendete *Escherichia coli* Stämme

<i>E. coli</i> Stamm	Antibiotika	Genotyp	Zusatzplasmid	Referenz
<b>MRF'</b>	-	$\Delta(mcrA)183;\Delta(mcrCB-hsdSMRmrr);173\ endA1$ <i>supE44 thi-1</i>  <i>recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F';proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)]	-	Bullock et al., 1987
<b>GenX</b>	-	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB- <i>gal dcm</i> (DE3)† Derivat von  BL 21 (DE3)  Proteinexpression: signifikant erhöhte Proteinmengen	-	Genlantis (www.genlantis.com)

### 2.3.3 Transformation von *Escherichia coli*

#### 2.3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* wurden 0,5 ml einer Übernachtskultur (2.3.1.; 2.3.2.) in 100 ml SOB-Medium (2.3.2) suspendiert und bei 37°C und 220 rpm im Schüttler (G25, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Dann wurde die Bakteriensuspension in zwei 50 ml Röhrchen überführt und für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 2.500 rcf und einer Temperatur von 4°C wurde das Bakterienpellet für 15 Minuten in 10 ml sterilem, gekühltem TFB1-Puffer (K-Acetat, 30 mM; RbCl, 100 mM; CaCl<sub>2</sub>, 10 mM; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 50 mM; 12% (v/v) Glycerin; in deionisiertem Wasser; pH=5,8 mit CH<sub>3</sub>COOH) re-suspendiert. Die Lösung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut für zehn Minuten bei 2500 rcf und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in sterilem, vorgekühltem TFB2-Puffer (Na-MOPS, 10 mM; RbCl, 10 mM; CaCl<sub>2</sub>, 75 mM; 12% (v/v) Glycerin; in deionisiertem Wasser; pH=6,8 mit NaOH) aufgenommen. Die nun kompetenten Bakterien wurden in 50 µl Aliquoten sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.3.3.2 Transformation mittels Hitze-Schock

Zur Transformation von kompetenten *Escherichia coli* (2.3.3.1.) wurde die Hitze-Schock-Methode angewandt. Dafür wurden zu eisgekühlten *Escherichia coli* 100-200 ng der entsprechenden Plasmide pipettiert. Nach einer 30-minütigen Lagerung auf Eis wurden die Bakterien in einem Wasserbad bei 42°C für 45 Sekunden inkubiert. Direkt nach der Hitze-Schock-Applikation wurden die Bakterien für zwei Minuten auf Eis gelagert und anschließend in 500 µl SOC-Medium (2.3.2.) für eine Stunde bei 37°C und 220 rpm im Bakterien-Schüttler (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten ausplattiert und über-Nacht bei 37°C vermehrt. Alle in dieser Arbeit transformierten *E. coli* sind in **Tabelle 4** gelistet.

**Tabelle 4** Verwendete rekombinante *Escherichia coli*

Konstrukt	Antibiotika	Referenz	Verwendung
MRF'+ pCambia3300- CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2	Kanamycin	pCambia 3300 (Cambia, Brisbane, Australia) <b>(Anhang Abbildung 3)</b>	Erzeugung transgener Pflanzen durch Agrobakterium GV3101
MRF'+ pCambia3300- 35S <sub>Prom</sub> ::LTP1:mCherry	Kanamycin	pCambia 3300 (Cambia, Brisbane, Australia) <b>(Anhang Abbildung 7)</b>	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> durch Agrobakterium GV3101
MRF'+ pCambia3300- 35S <sub>Prom</sub> ::LTP2:mCherry	Kanamycin	pCambia 3300 (Cambia, Brisbane, Australia) <b>(Anhang Abbildung 8)</b>	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> durch Agrobakterium GV3101
MRF'+ pCambia3300 mCherry - 35S <sub>Prom</sub> ::SLAH3:mVenus	Kanamycin	Dietmar Geiger  Julius-von-Sachs- Institut Botanik I	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> durch Agrobakterium GV3101
MRF'+ pSATUBQ10 mCherry – UBQ10 <sub>Prom</sub> ::LTP1:mCherry	Ampicillin	pSATUBQ10 mCherry (Laboratory of Plant Physiology and Biophysics, Glasgow, Grefen et al., 2010) <b>(Anhang Abbildung 5)</b>	Fusion von <i>LTP1</i> mit einem rotfluoreszierenden Reporter gen (mCherry)
MRF'+ pSATUBQ10 mCherry - UBQ10 <sub>Prom</sub> ::LTP2:mCherry	Ampicillin	pSATUBQ10 mCherry (Laboratory of Plant Physiology and Biophysics, Glasgow, Grefen et al., 2010) <b>(Anhang Abbildung 6)</b>	Fusion von <i>LTP2</i> mit einem rotfluoreszierenden Reporter gen (mCherry)
GenX/MRF'+ pET-28b T7 <sub>Prom</sub> ::LTP2:6xHIS/V5	Kanamycin	pET-28b (Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland) <b>(Anhang Abbildung 1)</b>	Zur heterologen Expression des LTP2:6xHis/V5-Fusionsproteins in GenX



## 2.4. Antibiotika

**Tabelle 5** Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotika	Stocklösung	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>	Pflanze
<b>Kanamycin</b>	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
<b>Gentamicin</b>	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	25 µg/ml	-	-
<b>Rifampicin</b>	10 mg/ml in DMSO	10 µg/ml	-	-
<b>Hygromycin</b>	40 mg/ml in H <sub>2</sub> O	-	-	-
<b>Ampicillin</b>	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml

## 2.5. Arbeiten mit DNA

### 2.5.1. Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus *Arabidopsis thaliana*

Die Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus pflanzlichem Gewebe wurde wie folgt durchgeführt. Zuerst wurde das pflanzliche Material in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in diesem Zustand in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit zwei 5 mm Eisenkugeln in einer Schwingmühle (MM100, Retsch, Haan, Deutschland) zweimal für 45 Sekunden bei 30 Hz pulverisiert. 100-150 mg des Pflanzenpulvers wurden anschließend mit gDNA-Extraktionspuffer (Tris-HCl (pH=7,5), 200 mM; NaCl, 250 mM; EDTA, 25 mM; SDS, 0,5% (w/v)) versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Suspension für zehn Minuten bei 14.000 rpm (MiniSpin® Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführte Überstand wurde mit Isopropanol versetzt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei Raumtemperatur für zehn Minuten wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweifach in 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.5.2. Plasmidextraktion aus *Escherichia coli*

Die Plasmid-Extraktion aus *Escherichia coli* erfolgte über eine alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Es wurden 3 ml einer Übernachtskultur (2.3.1. & 2.3.2.) für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Bis auf 50 µl, worin das Pellet zu resuspendieren war, wurde der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden dann bei Raumtemperatur in 300 µl TENS-Puffer (SDS, 10% (w/v); NaOH, 0,1 M; RNase, 200 µg/ml; in TE aus Tris-HCl mit Tris, 10 mM, pH=7,5) lysiert und anschließend mit 150 µl 3 M NaCOOH<sub>3</sub> neutralisiert. Chromosomale DNA und Proteine wurden bei einer zehnmütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm präzipitiert. Der in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführte Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt und erneut für zehn Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Präzipitat zweimal in 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet. In 50 µl deionisiertem Wasser wurde das Plasmid resuspendiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.3. Restriktionsenzym-Analysen

Für Klonierungsprozesse (2.7.) und zur Bestätigung der erfolgreichen Insertionen in Vektoren wurden in der vorliegenden Arbeit Restriktionsenzyme verwendet. Generell wurde circa 1 µg DNA mit der entsprechenden Endonuklease und dem jeweiligen Puffersystem eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz und das Protokoll wurden nach Angaben des Herstellers zusammengestellt und durchgeführt (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Eine Auftrennung der verdauten DNA erfolgte anschließend im Agarose-Gel (2.5.5.).

### 2.5.4. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels der PCR können gezielt bestimmte DNA-Abschnitte mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen vervielfältigt werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Zur Durchmusterung diverser Pflanzenlinien (**Tabelle 1**) wurde die Taq-Polymerase (Biotherm, Genecraft, Köln, Deutschland) von *Thermus aquaticus* verwendet, für USER-Klonierungen (2.7.1.) hingegen musste die rekombinante Phusion Cx Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Finnzymes, Oy, Finnland) verwendet werden. Die Phusion Cx Polymerase besitzt neben der Funktion des „proof-readings“ (Fehler bei der DNA-Amplifikation werden von der Polymerase erkannt und korrigiert) auch die Fähigkeit dUTPs in den Basenstrang einzubauen. Sämtliche PCR-Reaktionen der vorliegenden Arbeit wurden im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die jeweiligen Reaktionsansätze für beide Polymerasen, sowie die PCR-Programme sind den **Tabellen 6-9** zu entnehmen.

**Tabelle 6** Standard PCR-Ansatz mit **Taq-Polymerase** (20 µl)

<b>1 µl</b>	DNA-Template (10-100 ng)
<b>2 µl</b>	10 x Taq-Puffer (Biotherm)
<b>0,8 µl</b>	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
<b>0,4 µl</b>	dNTPs (10 mM)
<b>0,2 µl</b>	Taq-Polymerase
<b>1 µl</b>	Primer sense (10 µM)
<b>1 µl</b>	Primer antisense (10 µM)
<b>13,6 µl</b>	HPLC H <sub>2</sub> O

**Tabelle 7** Standard PCR-Programm der **Taq-Polymerase**

<b>1 Zyklus</b>	<b>30-35 Zyklen</b>			<b>1 Zyklus</b>
<i>Denaturierung</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Primerannaeling</i>	<i>Elongation</i>	<i>Finale Elongation</i>
95°C	95°C	45-65°C	72°C	72°C
5 min	30 s	30 s	1000 Bp/ 60 s	5 min

**Tabelle 8** Standard PCR-Ansatz der **Phu Cx-Polymerase** (20 µl)

<b>1 µl</b>	DNA-Template (10-100 ng)
<b>4 µl</b>	5 x Phu Cx-Puffer (Finnzymes)
<b>0,4 µl</b>	dNTPs (10 mM)
<b>0,2 µl</b>	Taq-Polymerase
<b>1 µl</b>	Primer sense (10 µM)
<b>1 µl</b>	Primer antisense (10 µM)
<b>12,4 µl</b>	HPLC H <sub>2</sub> O

**Tabelle 9** Standard PCR-Programm der **Phu Cx -Polymerase**

<b>1 Zyklus</b>	<b>30-35 Zyklen</b>			<b>1 Zyklus</b>
<i>Denaturierung</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Primerannaeling</i>	<i>Elongation</i>	<i>Finale Elongation</i>
98°C	98°C	45-65°C	72°C	72°C
30 s	10 s	10 s	1000 Bp/ 15 s	5 min

Um Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jeder PCR-Reaktion eine Negativkontrolle mitgeführt (H<sub>2</sub>O anstelle von DNA im Reaktionsansatz). Nach der PCR wurden die Amplifikate gelelektrophoretisch analysiert (2.5.5.) und anschließend bei -20°C gelagert.

### 2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld. Sämtliche DNA-Proben wurden in 5 x DNA-Probenpuffer aufgenommen (Bromphenolblau, 0,25% (w/v); Xylencyanol, 0,05% (w/v); EDTA, 0,1 M; Glycerin 50% (w/v) in deionisiertem Wasser) und im elektrischen Feld bei 80-100 V separiert. Als Elektrolyse-Puffer wurde TAE verwendet (Tris, 40 mM; NaCOOH<sub>3</sub>, 20 mM; EDTA, 1 mM; pH=7,8). Entsprechend der Größe der DNA-Fragmente wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen eingesetzt. Fragmente, die kürzer als 500 Bp waren, wurden in einem 3%, und solche, die länger als 500 Bp waren, in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt (1% bzw. 3% (w/v) Agarose in TAE). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde den Gelen zusätzlich der DNA-Farbstoff GelGreen™ (Biotium, <http://www.biotium.com>) mit einer Endkonzentration von 0,05 ‰ (v/v) zugefügt. Die Detektion der DNA-Banden wurde schließlich durch Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 260-360 nm mittels des Image Masters (VDS, Pharmacia, Uppsala, Schweden) ermöglicht. Als Größenstandard wurde Lambda *Pst*I Marker verwendet (Gibco/ Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die elektrophoretisch auftrennte DNA wurde entsprechend 2.5.6. aufgereinigt.

### 2.5.6. Aufreinigung von DNA

Mittels der Agarose Gel-Elektrophorese (2.5.6.) aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Eine direkte Aufreinigung des PCR-Ansatzes erfolgte mit dem *MinElute PCR Purification Kit* (Quiagen) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde jeweils in 20 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.5.7. Konzentrationsbestimmung von DNA

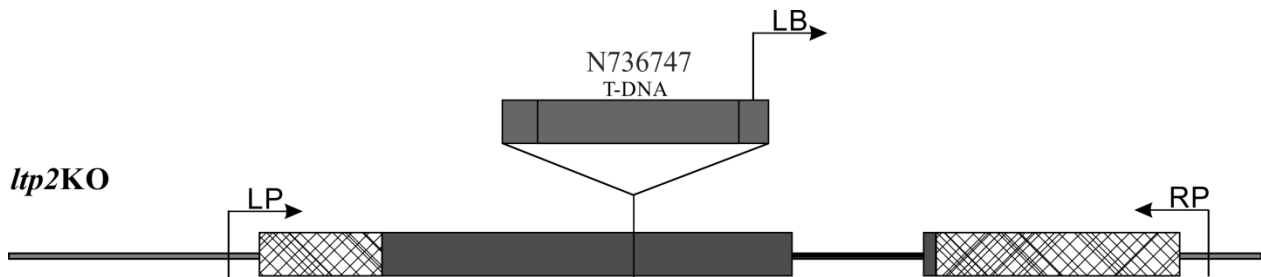
Die Konzentration von DNA wurde mittels eines Nanodrop-Photometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorption von Nukleinbasen) und 280 nm (Absorption von aromatischen Aminosäuren) ermittelt.

### 2.5.8. Sequenzierungen von DNA

Sämtliche Amplifikate und Vektoren wurden vor der weiteren Verwendung sequenziert. Die Sequenzierungen wurden nach der von Sanger beschriebenen „*Didesoxymethode*“, auch Kettenabbruch-Synthese genannt, durchgeführt (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977). Alle Sequenzierungen erfolgten beim Unternehmen GATC (GATC Biotech AG; Konstanz, Deutschland). Die ermittelten DNA-Sequenzen wurden dann mit Hilfe des Programms Vector NTI (InfoMax, Inc) und dem Blast-Programm (NCBI Blast 2.2.8.; Karlin & Altschul, 1990/1993; Altschul et al., 1997) auf ihre Richtigkeit überprüft.

### 2.5.9. Identifizierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien mittels PCR

Um die Funktion von *LTP2 in planta* zu entschlüsseln, wurden *LTP2*-T-DNA-Insertionsmutanten vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (GK-639E08; NASC Stock-Nummer: N736747; **Abbildung 6**) verwendet. Die gelieferten Samen konnten sowohl homozygot, als auch heterozygot für die T-DNA-Insertion sein, weswegen der Genotyp der Pflanzen mittels PCR und Verwendung spezifischer Primerkombinationen überprüft wurde. Die aus Blattmaterial isolierte gDNA (2.5.1.) wurde dazu jeweils mittels zweier PCR-Ansätze untersucht (2.5.4.). Das erste Primerpaar amplifizierte einen Bereich, der typisch für das Wildtyp Allel ist, wohingegen das zweite Primerpaar den Bereich zwischen dem Randbereich der T-DNA-Insertion (engl.: „*left border*“; LB) und einem zuvor verwendeten Gen-spezifischen Primer amplifizierte (**Abbildung 6; Anhang Tabelle 6**).



**Abbildung 6** Position der T-DNA-Insertion und der jeweiligen Primer in der gDNA, sowie T-DNA. LP: „left genomic“ Primer; RP: „right genomic“ Primer; LB: „left border“ Primer der T-DNA.

## 2.6. Arbeiten mit RNA

### 2.6.1 Isolierung von PolyA-mRNA

Poly(A)-mRNA wurde mittels Dynabeads Oligo-(dT)<sub>25</sub> isoliert (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Hierfür wurden 50-100 mg von in flüssigem Stickstoff gefrorenen Pflanzenmaterial zweimal für 30 Sekunden bei 25 Hz mit zwei 5 mm Eisenkugeln in der Schwingmühle (MM2000, Retsch, Haan, Deutschland) pulverisiert. Nach der Zugabe von 500 ml Lysis-Binding-Puffer (LiCl, 500 mM; EDTA, 10 mM; LiDS, 1% (v/v); DTT, 5 mM, in 10 mM Tris-HCl mit dem pH=5,7) und anschließendem gründlichen Durchmischen folgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten mit 20 µl Dynabeads bei Raumtemperatur im Überkopfrötierer (RM-Multi1; PRS-4/12; Starlab) inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße in einem Magnetständer positioniert, um die Dynabeads mit der anhaftenden Poly(A)-mRNA an der Wand des Reaktionsgefäßes zu fixieren und so den DNA- und Protein-haltigen Überstand entfernen zu können. Durch zweimalige Resuspension jeweils in Puffer A (LiCl, 150 mM; EDTA, 1 mM; LiDS, 0,1% (v/v); in 10 mM Tris-HCl; pH=5,7) und Puffer B (LiCl, 150 mM; EDTA, 1 mM; in 10 mM Tris-HCl; pH=5,7) wurden die Dynabeads gewaschen. Nach dem letzten Waschriff wurden die Dynabeads in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und zum Lösen der RNA von den Dynabeads für zwei Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads erneut in 2 x Binding-Puffer (LiCl, 1 mM; EDTA, 2 mM; in 20 mM Tris-HCl; pH= 5,7) suspendiert und für 15 Minuten kopfüber rotieren lassen. Danach wurde wieder zweifach in Puffer B gewaschen. Schließlich wurde die RNA von den magnetischen Dynabeads mit 16 µl RNase freiem Wasser bei 65°C für zwei Minuten gelöst und der Überstand abgenommen. Die erhaltene mRNA wurde sofort für die reverse Transkription (2.6.2.) verwendet.

### 2.6.2. Reverse Transkription

Unter Verwendung einer RNA-abhängigen Polymerase kann RNA in cDNA (engl.: „*complementary DNA*“) umgeschrieben werden. Als Enzym für die cDNA-Synthese wurde MMLV-RT (**M**oloney **M**urine **L**eukaemia **V**irus **R**everse **T**ranscriptase, Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde sofort nach der Poly(A)-mRNA-Extraktion (6.2.1.), wie in **Tabelle 10** beschrieben, auf Eis zusammen pipettiert und in einem Landgraf-Thermocycler für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tabelle 10** Standard Reaktionsansatz der **reversen Transkription** (20 µl)

<b>16 µl</b>	Poly(A)-mRNA
<b>0,8 µl</b>	Oligo dT Primer (0,5 µg/µl, Invitrogen)
<b>4 µl</b>	5 x M-MLV-RT Reaktionspuffer (Promega)
<b>0,5 µl</b>	RNase Inhibitor (Promega)
<b>0,5 µl</b>	M-MLV-RT (Promega)
<b>1 µl</b>	dNTPs (10 µM)

### 2.6.3. Die quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von cDNA (2.6.2.). Mit Hilfe dieser Technik kann die Transkriptanzahl beliebiger Gene ermittelt werden. Grundlage ist die Verwendung eines Nukleinsäure-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR-Green), der mit der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA interkaliert und dessen Signalstärke direkt proportional zur Menge des PCR-Produktes ansteigt. Die Grundfluoreszenz des Farbstoffs selbst ist sehr gering, sodass er bei einer Anregung von 497 nm bis zu 1000-fach verstärkt bei 520 nm emittieren kann. Für jedes Experiment wurde stets eine Wasserkontrolle ohne DNA mitgeführt, um zu gewährleisten, dass die PCR-Komponenten nicht kontaminiert waren. Da die cDNA-Menge der einzelnen Probe sehr schwanken kann, wurde in jeder Probe zusätzlich eine Referenz-cDNA als interner Standard quantifiziert. Voraussetzung für den internen Standard ist, dass die korrespondierende mRNA ubiquitär in der Pflanze vorkommt und konstitutiv transkribiert wird. Als interner Standard wurde Aktin 2 und Aktin 8 (ACT2/8; At3g18780/At1g49240) verwendet. Zur Erstellung der Eichgerade wurde ein externer Standard herangezogen. Als Externer Standard fungierte eine 1:10 Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration (10; 1; 0,1; 0,01 fg/µl) des PCR-Produktes der cDNA, deren Molekülanzahl quantifiziert werden sollte. Der Schwellenwertzyklus, der Zyklus also bei dem die Amplifikation exponentiell ansteigt, betrug

optimaler Weise für bei einer Konzentration von 10 fg/μl 18 oder 19. Die Spezifität des PCR-Produktes wurde zusätzlich über Schmelzpunktanalyse und Auftrennung im Agarose-Gel (2.5.5.) überprüft. Alle für die Echtzeit-PCR verwendeten cDNAs wurden 1:20 mit tRNA-Wasser (Sigma Aldrich, St. Louis, USA; TypXI; 10 μg/μl) verdünnt, um eine Anlagerung von cDNA-Fragmenten an die Wand des Reaktionsgefäßes zu vermindern.

Die 20 μl Ansätze, sowie die Bedingungen der Echtzeit-PCR sind den **Tabellen 11-12** zu entnehmen. Die Messungen wurden im Realplex Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

**Tabelle 11** Standard Reaktionsansatz der **quantitativen Echtzeit-PCR** (20 μl)

<b>2 μl</b>	cDNA-Template (1:20 in tRNA H <sub>2</sub> O)
<b>8 μl</b>	Primermix 6 ( 6 μl sense; 6 μl antisense Primer (je 50 μM) in 388 μl deionisiertem H <sub>2</sub> O ) (Primer: <b>Anhang Tabelle 2</b> )
<b>10 μl</b>	ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN Capillary Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

**Tabelle 12** Standard PCR-Programm der **quantitativen Echtzeit-PCR**

<b>1 Zyklus</b>	<b>40 Zyklen</b>				<b>1 Zyklus</b>
<i>Denaturierung</i>	<i>Denaturierung</i>	<i>Primerannaeling</i>	<i>Elongation</i>	<i>Fluoreszenzdetektion</i>	<i>Schmelzkurve</i>
95°C	95°C	45-65°C  Primer-abhängig  (Primer: <b>Anhang Tabelle 2</b> )	72°C	79°C	60-95°C  Schritte von 0,3°C
10 min	15 s	20 s	20 s	5 s	5 s

Die Realplex-Software ermittelte die Menge der cDNA in Bezug auf die Werte der Eichgerade des jeweiligen externen Standards. Um die verschiedenen cDNA-Proben zu normalisieren, wurde die Anzahl der Transkripte des Gens von Interesse in Bezug zum internen Standard, ACT2/8, gesetzt. Nach Szyroki et al., (2001) wurden 10.000 Transkripte ACT2/8 als Bezugspunkt festgelegt. Unter der Annahme, dass 1 fg DNA bei einer Fragmentlänge von 1.000 Bp 910 Moleküle enthalten, haben 435 Bp des ACT2/8-Fragment ein Gewicht von 4,778 fg. Daraus lässt sich dann mit der unten aufgeführten Formel die Transkriptanzahl bezogen auf 10.000 ACT2/8 Transkripte eines beliebigen Gens ermitteln.



$$y = \left( \frac{\text{Messwert (ACT2/8)}}{4,778 \text{ fg}} \right) * 10000$$

Konkret ergibt sich für die relative Anzahl der Transkripte eines Gens von Interesse (x) folgende Rechnung:

$$\text{Anzahl Moleküle (x)} = \left( \frac{\left( \frac{\text{Messwert(x)} * 435 \text{ Bp}}{4,778 \text{ fg} * \text{Länge (x)}} * 10000 \right)}{y} \right) * 10000$$

## 2.7. Klonierungsstrategien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Klonierungsstrategien verwendet. Diverse PCR-Amplifikate wurden in die jeweiligen Eintritts-Vektoren bzw. die binären Pflanzenvektoren über Restriktionsschnittstellen und T4-Ligase (2.7.1.4.) oder aber über das *uracil excision-based cloning* (USER-Klonierung, Nour-Eldin et al., 2006) inseriert.

### 2.7.1. Die USER-Klonierung

Alle USER-Klonierungen der vorliegenden Arbeit wurden nach Nour-Eldin et al., (2006) durchgeführt. Grundlage dieser Klonierungstechnik ist ein in den Klonierungsprimer integriertes Uracil-Nukleotid. Sense Primer besaßen typischerweise 5'-GGCTTAAU-3'-Überhänge und antisense Primer 5'-GGTTTAAU-3'-Überhänge.

Als binäre Vektoren wurden pCambia2300 und pCambia3300 (Cambia, Brisbane, Australien) verwendet. Beide Vektoren besitzen die für die USER-Klonierung notwendige sogenannte USER-Kassette (5'-GCTGAGGGAAAGTCTAGAGGATCCTCT AGATGTCTCCTCAGC-3') *stromaufwärts* des 35S-Promotors. Ein weiterer verwendeter Vektor war pCambia3300 mit USER-Kassette allerdings ohne eigenen Promotor. Zur Generierung eines LTP1- und LTP2-Fluorophor-Fusionsproduktes wurde der modifizierte pSAT-Vektor (Tzfira et al., 2005) mit *UBQ10*-Promotor, USER-Kassette und *mCherry*-CDS (engl.: „*coding sequence*“; CDS) verwendet (2.7.1.3.).

Die Vektoren mit USER-Kassette wurden durch den Verdau mit *PacI* und Nt.BbvCk linearisiert (New England Biolabs, Ipswich, USA). Durch das Enzym Nt.BbvCk wurde nur einer der beiden DNA-Stränge in der Erkennungssequenz geschnitten, daraus resultiert ein acht Basen langer 3'-Überhang. Im Detail wurden die Plasmide über Nacht bei 37°C mit *PacI* entsprechend der Angaben des Herstellers verdaut. Am Folgetag wurden zusätzlich 20 Einheiten *PacI* und

Nt.BbvCk hinzugefügt, und für zwei Stunden erneut bei 37°C inkubiert. Die linearisierten Vektoren wurden entsprechend 2.5.6. aufgereinigt.

Zur Ligation der PCR-Fragmente mit den jeweiligen linearisierten USER-Vektoren wurde die sogenannte USER-Reaktion durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die linearisierten Vektoren mit den PCR-Fragmenten, welche die entsprechenden USER-Überhänge besaßen, in einem Verhältnis von 10:1 (w/v) vermischt und bei 37°C für 20 Minuten mit einer Einheit USER-Enzymmix inkubiert. Danach erfolgte eine 20-minütige Lagerung bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 2 µl vom Reaktionsansatz in den *Escherichia coli*-Stamm MRF<sup>+</sup> transformiert (2.3.3.2.), extrahiert (2.5.2.), einem Restriktionsverdau unterworfen (2.5.3.) und schließlich sequenziert (2.5.8.).

#### 2.7.1.1. Generierung von CER5<sub>Prom</sub>::LTP2

Die cDNA von *LTP2* (7.1.1.) wurde mittels einer überlappenden PCR mit einer 2618 Bp langen Region *stromaufwärts* vom Translationsstart des *CER5*-Gens (ABCG12; At1g51500) fusioniert (8.1.1.). Diese Region wurde bereits von Pighin et al. (2004) als putativer *CER5*-Promotor definiert. Dafür wurde zuerst der *CER5*-Promotor aus der genomischen DNA (gDNA) von *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern mittels PCR amplifiziert. Der antisense Primer umfasste dabei das 3'-Ende der *CER5*-Promotorregion und den Transkriptionsstart von *LTP2*. Die für *LTP2* kodierende Sequenz (engl.: „*coding sequence*“; CDS) wurde mittels PCR-Amplifikation aus Tumor-cDNA gewonnen. Hierbei umfasste der sense-Primer das 3'-Ende des *CER5*-Promotors und das 5'-Ende der *LTP2*-CDS. Für alle PCR-Reaktionen wurde die Phusion Cx-Polymerase mit dem Phusion-Cx Standardbedingungen verwendet (2.5.4.). Die Primersequenzen, sowie die jeweiligen Annealing-Temperaturen sind im **Anhang Tabelle 4** zu finden. Das CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Fragment mit den entsprechenden USER-Überhängen wurde mit dem linearisierten binären Vektor pCambia2300, dem der 35S-Promotor fehlte, ligiert (USER-Reaktion, 2.7.2.; **Anhang Abbildung 3**). Nach der Überprüfung des Konstruktes durch Sequenzierung und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 wurden *Arabidopsis thaliana* (WS-2) mittels der *Floral-Dipping*-Technik transformiert (2.5.8.; **Anhang Tabelle 5, 2.2.3., 2.1.5.**). Die Samen wurden dann auf Erde ausgesät und mit Glufosinat (Basta; Bayer, Leverkusen, Deutschland) durch besprühen selektioniert (2.1.1.). Die dabei überlebenden Pflanzen stellten die Muttergeneration aller drei verwendeten Linien dar. Für die Analysen wurde die über PCR genotypisierte homozygote T<sub>3</sub>-Generation verwendet (2.5.4.; **Anhang Tabelle 7**).

### 2.7.1.2. Generierung des 35S<sub>Prom</sub>::LTP2/LTP1:mCherry Konstruktes

Für die subzelluläre Lokalisation wurden die CDS von *LTP1* sowie *LTP2* an ihrem C-terminalen Ende mit dem Reporterprotein mCherry, einem rot fluoreszierenden Fluorophor, fusioniert und anschließend in den binären Vektor pCambia3300 *stromabwärts* vom 35S-Promotor transformiert. Zuerst wurden dafür die cDNA von *LTP1* und *LTP2* (7.1.1.) unter Verwendung der Phusion-Cx Polymerase bei Standardbedingungen mit USER-Primern amplifiziert (2.5.4.; **Anhang Tabelle 3**). Die PCR-Fragmente wurden dann mittels USER-Klonierung in den linearisierten Vektor pSATUBQ10 mCherry (Laboratory of Plant Physiology and Biophysics, Glasgow, UK; Grefen et al., 2010) inseriert (2.7.1.; **Anhang Abbildung 5**, **Anhang Abbildung 6**). Nach der Transformation der chemisch-kompetenten *E. coli*, Stamm MRF<sup>+</sup>(2.3.3.2.) und der Extraktion der Plasmide (2.5.2.) folgte ein Verdau mit Restriktionsenzymen, um die Richtigkeit der Insertion zu überprüfen (2.5.3.). Dem schloss sich die Sequenzierung an (2.5.8.; **Anhang Tabelle 5**). Mittels PCR wurden die kodierenden Sequenzen der LTP1:mCherry und LTP2:mCherry Fusionsproteine unter Verwendung der Phusion-Cx Polymerase unter Standardbedingungen mit USER-Primern amplifiziert (2.5.4.; **Anhang Tabelle 3**) und mittels USER-Reaktion in den Vektor pCambia3300 integriert (2.7.1.; **Anhang Abbildung 7**, **Anhang Abbildung 8**). Die extrahierten Plasmide wurden schließlich sequenziert (2.5.8.; **Anhang Tabelle 5**) und in *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformiert (2.2.3.). Zusätzlich wurde als Marker für eine Plasmamembranlokalisation SLAH3:mVenus (SLAC1 homologue 3; At5g24030) in pCambia3300 verwendet. Das Konstrukt wurde von Prof. Dr. D. Geiger (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik I, Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die transformierten Agrobakterien wurden in der Folge für die transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* verwendet (2.1.10.).

### 2.7.2. Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Zur Expression von LTP2 in *E. coli* wurde das Fragment von LTP2:V5 aus pCambia2300-35S<sub>Prom</sub>::LTP2:V5 ohne LTP2-Signalpeptid in den Expressionsvektor pET-28b (Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland) transferiert. Hierfür wurde in einem ersten Schritt das *LTP2* cDNA-Fragment mit der V5-Epitopsequenz aber ohne putatives Exportsignal, d.h. ohne den 75 Bp langen Abschnitt am 5'-Ende der *LTP2*-cDNA, vom Vektor pCambia2300-35S<sub>Prom</sub>::LTP2:V5 (Dr. J. Klinkenberg; Julius-von-Sachs-Institut, Botanik I, Universität Würzburg, Deutschland) amplifiziert (8.1.1.).

Für diese Amplifikation wurde die Biotherm Taq Polymerase mit dem Standardreaktionsansatz unter Standardbedingungen verwendet (2.5.4.). Mit Hilfe der verwendeten Primer wurden zwei

Restriktionsschnittstellen, *NcoI* an dem 5'- und *SalI* am 3'-Ende, in das LTP2:V5 PCR-Produkt eingeführt (**Anhang Tabelle 3**). Sowohl der Vektor (pET-28b) als auch das PCR-Fragment wurden mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *NcoI* linearisiert bzw. verdaut (**2.5.3.**). Durch diesen Schritt entstanden sowohl am Vektor als auch an dem PCR-Fragment überstehende einsträngige Enden (klebende Enden; engl.: „sticky ends“). Die T4-Ligase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aus der Bakteriophage T4 katalysiert die Knüpfung einer Esterbindung zwischen 5'-Phosphatrest und dem 3'-Hydroxylterminus der Desoxyribose und ermöglicht so eine Ligation von Insert (=PCR-Amplifikat) und Vektor. Nach Auftrennung von PCR-Amplifikat und Vektor im Agarose-Gel (**2.5.6.**) und anschließender Elution aus dem Agarose-Gel (**2.5.7.**) wurden die linearisierten Moleküle mittels der T4-Ligase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ligiert. Für die Ligation wurde ein 20 µl Ansatz verwendet: 2 µl T4-Ligase, 2 µl T4-Ligase-Puffer (10 x; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), circa 50 ng Vektor-DNA und Insert-DNA wurden mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und bei 22°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss folgte die Transformation des Konstrukts in chemisch kompetente *E. coli* Zellen, Stamm MRF'(**2.3.3.2.**, **Tabelle 3**). Nach der Extraktion der Plasmide aus *E. coli* (**2.5.2.**), einem Testverdau zur Überprüfung der Richtigkeit der Insertion (**2.5.3.**, **Tabelle 4**) und Sequenzierung (**2.5.8.**, **Anhang Tabelle 5**) wurde das Konstrukt in den *E. coli* Stamm GenX transformiert (**2.3.3.2.**, **Anhang Abbildung 1**).

## 2.8. Arbeiten mit Proteinen

### 2.8.1. Proteinexpression in *E. coli* Stamm GenX

Für die rekombinante Expression des LTP2-Proteins in *E. coli* wurde *LTP2* der T7 Bakteriophagen Promotors in den Vektor pET-28b vorangesetzt (**2.7.2.**, **Anhang Abbildung 1**). Die Besonderheit des pET-Systems ist, dass die Expression des entsprechenden Gens durch die Applikation von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyransoid) induziert wird (siehe Novagen pET-System; [www.novagen.com](http://www.novagen.com)).

Für jede Proteinexpression wurden *E. coli* des Stamms GenX (**Tabelle 3**, **Tabelle 4**) stets erneut transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert (**2.3.3.2.**, **2.3.2.**). Am Folgetag wurde jeweils eine Einzelkolonie in 100 ml LB-Medium mit Kanamycin (**2.3.1.**, **2.3.2.**) überführt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann in einem Verhältnis von 1:100 in 10 l LB-Medium mit Kanamycin überführt und so lange bei 37°C und 220 rpm im Bakterien-Schüttler (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Dann wurde die Bakteriensuspension sogleich bei 18°C

inkubiert, bis die  $OD_{600}$  einen Wert von 0,6-0,8 besaß und die Induktion der Transkription von LTP2 durch die Zugabe von 1 mM IPTG (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA ) gestartet werden konnte. Über Nacht wurden die induzierten Bakterien weiter bei 18°C und 220 rpm kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die transformierten Bakterien durch Zentrifugation bei 6.000 x g (Zentrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 4°C für 15 Minuten pelletiert. Das Bakterienpellet wurde im Anschluss in gekühltem Binde-Puffer (EDTA-frei Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (Roche),  $Na_2HPO_4$ , 50 mM; NaCl, 300 mM; Imidazol, 30 mM; pH=8 mit HCl) resuspendiert. Die Proteinextraktion und Aufreinigung erfolgte unmittelbar im Anschluss (2.8.2.).

### 2.8.2. Proteinextraktion und Aufreinigung aus *E. coli* Stamm GenX

Zum Aufbrechen der Bakterienmembranen wurde die Bakteriensuspension aus 2.8.1. auf Eis im Ultraschall sonifiziert (Bandelin Sonoplus Homogenisator HD GM3200 mit VS 79T Sonotrode). Hierzu wurden die Zellen über einen Zeitraum von zehn Minuten jeweils für 20 Sekunden Ultraschall ausgesetzt, die für jeweils 20 Sekunden unterbrochen wurde. Die maximale Amplitude der Sonifikation betrug dabei 50%. Nach der Sonifikation folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 3220 rcf für 15 Minuten (Zentrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Im Anschluss wurde der Überstand bei 10.000 x g und einer Temperatur von 4°C für 30 Minuten erneut zentrifugiert (Beckmann Optima L-100K; Ultrazentrifuge, Rotor: 45Ti).

Mittels einer Affinitäts-Chromatographie wurde dann aus dem Überstand das darin gelöste LTP2-Fusions-Protein entfernt. Als Matrix zur Aufreinigung des rekombinanten mit sechs Histidin-Aminosäuren fusionierten Proteins wurde  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Histidine des Fusionsproteins werden durch eine Chelatierung mit den  $Ni^{2+}$ -Ionen immobilisiert. Erst durch die Zugabe von Imidazol werden diese wieder frei gegeben, indem die Histidine von den  $Ni^{2+}$ -Ionen durch Imidazol verdrängt werden. In einem ersten Schritt wurden 2 ml  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose in gekühltem Binde-Puffer gewaschen (EDTA-free Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (Roche),  $Na_2HPO_4$ , 50 mM; NaCl, 300 mM; Imidazol, 30 mM; pH=8 mit HCl). Im Anschluss wurde der Proteinüberstand zur  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose in einem 50 ml Falcon gegeben. Eine Inkubation mit sanftem Rotieren von 30 Umdrehungen für mindestens zwei Stunden bei 4°C folgte. Danach wurde der Überstand von der  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose mit dem gebundenen Protein über eine Zentrifugation bei 4°C und 1.800 rpm (600 x g) getrennt und verworfen. Dann folgten fünf Waschschriffe, die aus der Zugabe von jeweils 50 ml Binde-Puffer, einer Zentrifugation bei 4°C und 1.800 rpm (600 x g) und dem Abnehmen des Überstands bestanden. Nach dem Waschen wurde das gebundene Protein mit 300 mM Imidazol (AppliChem,

Darmstadt, Deutschland) im Binde-Puffer (=Elutionspuffer) von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gelöst. Dafür wurden die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose mit 2 ml Elutionspuffer versetzt und zehn Minuten vorsichtig bei Raumtemperatur kopfüber rotiert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Der Überstand wurde nach fünf Minuten auf Eis in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort dialysiert. Die Dialyse (CelluTrans; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte über Nacht bei 4°C gegen 2 l Dialysepuffer (NaCl, 150 mM; HEPES, 50 mM; pH=8). Das aufgereinigte Protein wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.8.3. Proteinextraktion aus *Nicotiana benthamina* BY-2 Zellkulturen

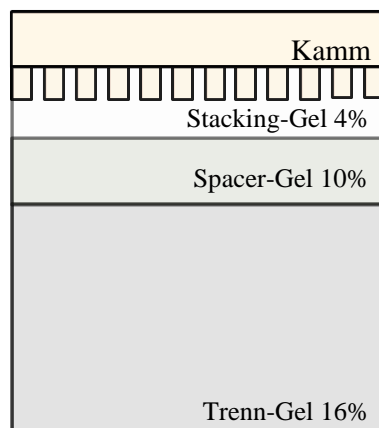
Aus transformierten BY-2 Zellsuspensionskulturen (2.1.9.) wurden Gesamt-Proteinextrakte isoliert. Dafür wurde die Zellkultur in flüssigen Stickstoff mit Hilfe von Mörser und Pistill in 50 ml Extraktionspuffer homogenisiert (Saccharose, 250 mM; EDTA, 2 mM; Dithiothreitol (DTT), 2 mM; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 mM; 5% (w/v) unlösliches Polyvinylpyrrolodin; in 30 mM Tris-HCl, pH=7,5). Das Homogenisat wurde dann bei 4°C bei 10.000 x g für 30 Minuten (Zentrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand mit den gesamten Proteinen wurde schließlich im Eisbad durch eine Nylonmembran (Porengröße: 22-25 µm; Miracloth, Merck, Darmstadt, Deutschland) filtriert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.8.4. Tris-Tricin SDS-PAGE nach Schägger

Die Tris-Tricine SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) zur Auftrennung von Proteinen nach Schägger (2006) im elektrischen Feld wurde leicht verändert durchgeführt. Die Herstellung der Gele, sowie die Auftrennung der Proteine, im elektrischen Feld erfolgte mit Apparaturen der Firma Hoefer (Mighty Small II, SE250/SE260; Hoefer, Holliston, USA). Die Gele bestanden aus drei Phasen (**Abbildung 7**), welche jeweils 2,5 ml Gel-Puffer (4 x; Tris, 4 M; SDS 0,4% (w/v); pH=8,45) enthielten. Die erste Phase, das sogenannte Trenngel, enthielt zudem 16% Acrylamid/Bisacrylamid mit einem Vernetzungsgrad von 4% (5 ml einer Lösung aus: Harnstoff, 6 M; Rotiphorese<sup>®</sup> Gel A (Rotiphorese<sup>®</sup>; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3,3 ml; Rotiphorese<sup>®</sup> Gel B, 5 ml; Gel-Puffer, 1,7 ml; APS (Ammoniumpersulfat; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 25 µl; TEMED (N, N, N, N –Tetramethylethyldiamin; Roth, Karlsruhe, Germany), aus 25% (w/v) Stock 7,5 µl). Zur Gewährleistung eines ebenen Übergangs zur nächsten Gel-Schicht wurde die erste Phase sofort mit Wasser überzogen. Nach etwa 30 Minuten wurde das Wasser von dem bereits polymerisiertem Gel mit saugfähigem Papier abgezogen und die nächste Schicht, das 10%ige Zwischen-Gel (engl.: „Spacer-Gel“) wurde

gegossen (Rotiphorese® Gellösung 40 (29:1), 2,5 ml; Gel-Puffer, 2, 5 ml; H<sub>2</sub>O, 4,9 ml; APS, 25 µl aus 25% (w/v) Stock; TEMED, 5 µl). Erneut wurde das frisch gegossene *Spacer-Gel* mit Wasser überschichtet, welches nach dem auspolymerisieren abgezogen wurde. Das letzte Gel war das sogenannte *Stacking-Gel*, welches der Aufkonzentrierung der Proteine diente. Das 4%ige *Stacking-Gel* setzte sich aus 2,5 ml 4x Tris-Puffer (Tris, 0,5 M; SDS, 0,4% (w/v); pH=6,8 mit HCl), 0,8 ml Rotiphorese® Gellösung 40 (29:1), 6,6 ml H<sub>2</sub>O, 33,3 µl APS und 10 µl TEMED zusammen. In diese oberste flüssige Gel-Phase wurde der Gelkamm eingesetzt. Dem schloss sich die Polymerisation für 30 Minuten bei Raumtemperatur an.

Die Proteinproben (2.8.1., 2.8.2.) wurden vor der Auftrennung mit SDS-Probenpuffer (Glycerin, 5% (v/v); SDS, 0,4% (w/v); Bromophenolblau, 0,02% (w/v); DTT, 0,04 M; Tris-HCl, 12 mM; pH=6,8) versetzt und zehn Minuten bei 60°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Elektrophoresekammer (SE250, Hoefer Inc, Holliston, USA) unter Verwendung von Anodenpuffer (10 x; Tris, 1 M; pH=8,9 mit HCl) und Kathodenpuffer (10 x; Tris, 1 M; Tricin, 1 M; SDS 1% (w/v); pH=8,25) bei 20 mA und 60 V für zwei Stunden.



**Abbildung 7** SDS-Gel-Aufbau

### 2.8.5. Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der einzelnen Proteinbanden wurden die Acrylamid-Gele mittels Coomassie gefärbt. Dafür wurde das SDS-Polyacrylamidgel (2.8.3.) in eine passende Glaswanne überführt, mit Coomassie-Färbelösung (Brilliant Blue-R-250 (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1% (w/v); Methanol, 45% (v/v); Essigsäure, 10% (v/v); in H<sub>2</sub>O) überschichtet und darin über Nacht unter leichtem Schwenken inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Acrylamid-Gel dreimal für 30 Minuten in Entfärbelösung (Essigsäure, 10% (v/v); in H<sub>2</sub>O) bei Raumtemperatur geschwenkt.

### 2.8.6. Western Blot-Analysen

Der erste Schritt des Western-Blots ist die Übertragung der Proteine aus dem Poly-Acrylamid-Gel (2.8.3.) auf eine Nitrocellulose-Membran mittels eines elektrischen Feldes (Elektrotransfer). Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran, 0,2 µm Porengröße, Hartenstein, Würzburg, Deutschland), Acrylamid-Gel und Filterpapier wurden in den entsprechenden Puffern für zehn Minuten vorinkubiert und wie folgt zusammengestellt:

Von unten: **Anode** (-): sechs Lagen Filterpapier in Anodenpuffer I (Tris, 300 mM; Methanol, 20% v/v), drei Lagen Filterpapier in Anodenpuffer II (Tris, 25 mM; Methanol, 20% v/v), Nitrocellulose, Acrylamid-Gel, sechs Lagen Filterpapier in Kathoden-Puffer (Tris, 25 mM; Aminocapronsäure, 40 mM; Methanol, 20% v/v), **Kathode** (+). Der Transfer wurde bei 50 mA und 20 V für eine Stunde durchgeführt.

Der zweite Schritt bei der Western-Blot-Analyse ist die Immundetektion. Dafür wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Protein-Transfer zweimal in Waschpuffer (TBS; NaCl, 137 mM; Tris, 10 mM; pH=8), gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockier-Puffer (TBS; NaCl, 137 mM; Tris, 10 mM und Albumin 5% (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); pH=8) inkubiert. Nach dem Blockieren der unbesetzten Bindestellen mit Albumin wurde die Membran zweifach in TBST (TBS pH=8; NaCl, 137 mM; Tris, 10 mM; Tween-20, 0,05% (v/v)) gewaschen und mit dem primären monoklonalen, in Maus produzierten Anti-Histidin Antikörper (1:5.000 Verdünnung, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in TBST mit 5% Albumin bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBST bei Raumtemperatur wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären, anti-Maus Antikörper 1:5000 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), der mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, geschwenkt (Verdünnung in TBST mit 5% Albumin). Die anschließende Chemilumineszenz-Reaktion wurde unter Verwendung von Luminol (Pierce, Rockford, USA) und die Detektion mittels Röntgenfilmen (Kodak-Biomax Light, Rochester, USA) entsprechend der Angaben der Hersteller durchgeführt.

### 2.8.7. Protein-Lipid-Overlay Assay (PLO)

Der Protein-Lipid-Overlay Assay wurde nach Dowler et al., (2002) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden 5 µg der im Verhältnis von 1:1 in Methanol/Chloroform gelösten langkettigen Fettsäuren und Aldehyde (von Dr. A. Hansjakob; Julius-von-Sachs-Institut, Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) und deren Derivate auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran, 0,2 µm Porengröße, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) geträufelt. Im



Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die unbesetzten Bindestellen mit 5% Albumin in TBS (NaCl, 137 mM; Tris, 10 mM und Albumin, 5% (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); pH=8) bei Raumtemperatur für eine Stunde blockiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit 50 µl LTP2:6xHis Fusionsproteinlösung (2.8.2., 2.8.3.) in 5 ml TBS mit 5% Albumin bei 4°C über Nacht. Nach zweifachem kurzen Schwenken in TBS wurde zur Membran der erste, monoklonale in Maus-produzierten Anti-Histidin-Antikörper im Verhältnis 1:5.000 in TBS zugesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut zweimal in TBS gewaschen und der sekundäre anti-Maus Antikörper aus Ziege mit Meerrettich-Peroxidase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) im Verhältnis 1:10.000 in 5 ml TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Die anschließende Chemilumineszenz-Reaktion wurde unter Verwendung von Luminol (Pierce, Rockford, USA) und die Detektion mittels Röntgenfilm (Kodak-Biomax Light, Rochester, USA) entsprechend der Angaben der Hersteller durchgeführt.

## 2.9. Lokalisationsmethoden

### 2.9.1. GUS-Färbung

Zur Entschlüsselung der Expressionsorte von *LTP2* wurde der *LTP2*-Promotor mit dem Reportergen  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) fusioniert (pmdc164-*LTP2*<sub>Prom</sub>::GUS; **Anhang Abbildung 4, Abbildung 6**). Zuerst wurden drei unabhängige transgene Pflanzenlinien in der homozygoten T<sub>3</sub>-Generation mittels PCR genotypisiert (**Anhang Tabelle 7**). Dem schloss sich die histochemische Analyse der GUS-Aktivität nach Jefferson et al. (1987) an. Dabei wird durch die enzymatische Aktivität des GUS-Enzyms X-Gluc (2-Bromo-4-Chloro-3-Indolylglucuronid) gespalten. Bei dieser Reaktion entsteht ein Indoxylderivat, welches mit Hilfe der Oxidationsmittel Ferricyanid und Ferrocyanid eine oxidative Dimerisierung durchläuft. Das Reaktionsprodukt ist ein blauer Indigofarbstoff, der als Präzipitat erkennbar ist (Blume et al., 1997). Verschiedene Arabidopsis Pflanzenorgane oder Gewebe (acht Wochen alte Rosettenblätter, Wurzeln, Blüten, Schoten und Tumore) wurden unter Vakuum (zehn Minuten, 100 mbar) mit GUS-Puffer infiltriert (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bei pH=7,0, 150 mM; EDTA, 10 mM; Kaliumferricyanid, 0,05 mM; Kaliumferrocyanid, 0,05 mM; Triton 100, 0,1% (v/v); 2-Bromo-4-Chloro-3-Indolylglucuronid (Duchefa, Haarlem, Niederlande), 1 mM; in H<sub>2</sub>O) und bei 37°C für 20 Minuten in der Dunkelheit inkubiert. Das Chlorophyll wurde zunächst mit einer 70%igen EtOH-Lösung ausgewaschen. Die Proben dreier unabhängiger Linien wurden dann mittels eines digitalen Mikroskops untersucht (Keyence VHX-

100, Keyence, Osaka, Japan). Anschließend wurden die gefärbten Pflanzenmaterialien bei 4°C in Dunkelheit bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.9.2. Einbetten von Pflanzenmaterial in Methacrylat (HEMA; 2-Hydroxy-Methacrylat)**

Für eine zelluläre Auflösung der *LTP2*-Expression im pflanzlichen Gewebe wurde Pflanzenmaterial in Kunstharz eingebettet. Die Einbettung ermöglichte die Herstellung von Dünnschnitten mittels eines Rotationsmikrotoms (Leica RM 2165; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). In einem ersten Schritt wurden mit Hilfe des Handmikrotoms 100 µm Querschnitte von Spross, Wurzel, Tumor und Hypokotyl angefertigt. Nach der GUS-Färbung (2.9.1.) wurden diese in 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (GMA; Agar Scientific, Essex, England) eingebettet. Zuvor mussten die Schnitte jedoch entwässert werden, wobei das bereits in 70% Ethanol gelagerte Pflanzengewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80%, 90%, 100%) bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken für 45 Minuten inkubiert wurde. Nach der Dehydrierung folgte eine dreimalige Inkubation in Lösung A. Danach wurde zu 50 Teilen Lösung A ein Teil Lösung B (Zusammensetzung siehe: GMA; Agar Scientific, Essex, England) gegeben und vorsichtig über die sich in einer Einbettform befindenden Schnitte pipettiert. Die Polymerisierung erfolgte bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von zwölf Stunden. Mittels eines Ultra-Mikrotoms (Leica RM 2165; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden dann 15 µm Ultradünnschnitte vom eingebetteten Gewebe angefertigt. Diese wurden dann auf einem Wassertropfen gelegt, der sich auf einem Objektträger befand und bei 52°C eingetrocknet. Zur Erhöhung des Kontrastes wurden die getrockneten Dünnschnitte mit Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) beträufelt und mit einem Deckgläschen und Nagellack versiegelt.

### 2.9.3. Safraninfärbung

Zur Visualisierung von verholzten (lignifizierten) Zellwänden wurde der Azinfarbstoff Safranin O (Alta Aesar, Ward Hill, MA, USA) verwendet. Ein Tropfen einer 0,01% (w/v) Safranin-Lösung in 70%igem Ethanol wurde auf den Objektträger mit den getrockneten Gewebsschnitten pipettiert. Es wurde sofort mit deionisiertem H<sub>2</sub>O gespült und für 20 Minuten unter leichtem Schwenken im Wasserbad bei Raumtemperatur entfärbt. Nach dem Trocknen wurden wie in 2.9.2. beschrieben die gefärbten Gewebsschnitte versiegelt.

### 2.9.4. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (engl.: *confocal laser scanning microscopy*; CLSM; nach engl. *to scan*: rastern) wurde angewendet, um C-terminale Fusionen von LTP1 und LTP2 mit dem rot-fluoreszierenden mCherry Reporterprotein sowie von SLAH3 mit mVenus, in *Nicotiana benthamina* Epidermiszellen, bzw. in Protoplasten sichtbar zu machen. Dafür wurden 72 Stunden nach der Infiltration mit transgenen *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 mit pCambia3300-35S<sub>Prom</sub>::LTP1:mCherry und pCambia3300-35S<sub>Prom</sub>::SLAH3:mVenus bzw. pCambia3300-35S<sub>Prom</sub>::LTP2:mCherry und pCambia3300-35S<sub>Prom</sub>::SLAH3:mVenus (2.7.1.2.) entweder Epidermisstreifen oder Protoplasten angefertigt und mit dem konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (TCS SP5 2; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) analysiert. Verwendet wurde dafür das 25-fache Vergrößerungsobjektiv (HCOL FLUOTAR 25,0 x 0,95; H<sub>2</sub>O). Die Anregung von mVenus erfolgte bei 514 nm mit einem Argonlaser sowie die von mCherry bei 561 nm mit dem DPSS561-Laser. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei 530–555 nm für gelbe Fluoreszenz und 580–615 nm für rote Fluoreszenz detektiert. Zusätzlich wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz bei 650-700 nm detektiert und mittels Falschfarbe in blau dargestellt. Überlagerungsbilder wurden mit Hilfe der Leica Software LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence, 2.4.1) erstellt.

## 2.10. Charakterisierung von Blattoberflächen

### 2.10.1. Kontaktwinkelmessungen und Chlorophyll Leaching Assay

Um die Oberflächenhydrophobizität von transgenen Pflanzenlinien zu ermitteln, wurde die Kontaktwinkel-Methode angewendet. Dafür wurde 1 µl destilliertes Wasser auf Blattoberflächen acht Wochen alter Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* geträufelt. Der Kontaktwinkel von Wassertropfen zur Blattoberfläche wurde von der Software SCA20 des Kontaktwinkelmesssystems ermittelt (Kontaktwinkel System OCA 15, Software System SCA20; Dataphysics Instruments, Filderstadt, Deutschland). Insgesamt wurden sieben Tropfen pro Blatt und jeweils drei Blätter von drei Pflanzen pro Linie analysiert.

Eine Methode zur Bestimmung der Durchlässigkeit der Cuticula ist der sogenannte Chlorophyll-Leaching-Assay (engl.: „to leach“: auswaschen). Rosettenblätter acht Wochen alter Pflanzenlinien wurden mittels eines Skalpell von der Pflanze abgetrennt, gewogen und in ein 15 ml Röhrchen mit 6 ml 80% Ethanol überführt. Die Röhrchen wurden unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Alle 20 Minuten wurde bis zu einem Zeitraum von zwei Stunden jeweils 1 ml Lösung entnommen und die Absorption darin bei 664 und 647 nm gemessen (ATI UNICAM UV/Vis Spectrophotometer UV 4-500, Unicam Ltd., Cambridge, UK). Der entnommene ml wurde anschließend wieder zurück gefüllt. Der Chlorophyllgehalt wurde in µmol Chlorophyllgehalt pro Gramm Frischgewicht nach Xia et al., (2009) wie folgt berechnet:

$$\frac{\mu\text{mol(Chlorophyll)}}{\text{g(Frischgewicht)}} = \frac{7,93 * A(664) + 19,53 * A(647)}{\text{g(Einwaage)}}$$

### 2.9.2. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden kleine Stücke von Blättern und Sprossen von *Arabidopsis thaliana* (WS-2) und den CER5<sub>Prom::LTP2</sub> Pflanzenlinien auf kleine Aluminiumhalter (Agar Scientific Limited, Essex, England) geklebt und für vier Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die getrockneten Blattsegmente wurden dann dreimal für 50 Sekunden mit einem Gold-Platingemisch bei 25 mA überzogen (SCD 005 Sputter Coaster BAL-TEC, Balzers, Lichtenstein). Danach wurden die Proben in das Rasterelektronenmikroskop (JEOL JSM-7500F, Rasterelektronenmikroskop) überführt, bei 5.0 kV analysiert und Bilder digital dargestellt.

## 2.11. Arbeiten mit Lipiden

### 2.11.1. Lipidanalysen mittels UPLC-MS

#### 2.11.1.1. Extraktion der Gesamtlipide

Für die Gesamtlipidextraktion wurden 25 mg Blattmaterial bzw. zehn Blüten mit zwei 5 mm Eisenkugeln in vorgekühlte 2 ml Reaktionsgefäße mittels Schwingmühle bei 30 Hz für eine Minute pulverisiert (MM 301 Mixer Mill; Retsch GmbH, Haan, Deutschland). Das Pflanzenpulver wurde in 0,4 ml Isopropanol inklusive des internen Standards (D-Erythro-Sphingosin, 100 mg/l) für 15 Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation bei 12.000 rpm und einer Temperatur von 4°C für zehn Minuten wurde das Pellet in 0,4 ml Isopropanol:Chloroform (2:1, (v/v)) resuspendiert und erneut im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde bei 12.000 rpm und einer Temperatur von 4°C für zehn Minuten zentrifugiert, um anschließend das Pellet in Chloroform:Methanol (2:1, (v/v)) zu resuspendieren, ein drittes Mal 15 Minuten Ultraschall anzuwenden, und zu zentrifugieren. Die drei Überstände wurden schließlich vereinigt, im Vakuum getrocknet und in 100 µl Isopropanol aufgenommen.

#### 2.11.1.2. Die UPLC-MS

Für die Gesamtlipidanalysen acht Wochen alter Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* sowie deren Blüten erfolgte mittels Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) und anschließender massenspektrometrischer (MS) Analyse. Alle für die UPLC-MS verwendeten Lösungsmittel entsprachen dem LC-MS Reinheitsgrad und wurden von der Firma Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) erworben. Die Reverse-Phasen Chromatographie zur Trennung der extrahierten Lipide wurde von Dr. A. Fekete (Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Institut; Botanik I) mit dem ACQUITY Ultra Performance LC System (UPLC, Waters, Milford, MA, USA;) durchgeführt. Die analytische Säule (ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>, 1,7 µm Partikelgröße, 2,1 × 100 mm Waters, Milford, MA, USA) wurde dazu auf 60°C erwärmt. Das jeweilige Injektionsvolumen der Proben betrug 5 µl. Die injizierte Probe wurde unter Verwendung eines binären Lösungsmittelgradienten von 30-100% Lösungsmittel B (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 10 mM in 2-Propanol: Acetonitril (90:10, (v/v))) zu Lösungsmittel A (60% (v/v) CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 10 mM in H<sub>2</sub>O und 40% (v/v) Acetonitril) für zehn Minuten bei einer Flussrate von 0,3 ml/min eluiert. Die UPLC war mit einem Hybrid Quadrupol Orthogonal Flugzeit-Massenspektrometer (engl.: *hybrid quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer*: qTOF-MS; SYNAPT G2 HDMS, Waters, Manchester, U.K.) gekoppelt. Positive und negative Elektrosprayionisation (ESI) mit einer Kapillar- und Innenringspannung von ±0,8 kV bzw. ±25 V wurde angewendet. Das System

war zudem ausgestattet mit einer integralen LockSpray-Einheit, mit eigenem Referenz Sprayer für Leucin ( $[M+H]^+ = 556.2771$  und Encephalin  $[M-H]^- = 554.2615$ ) als interne Referenz.

### 2.11.1.3. Auswertung der mittels UPLC-MS ermittelten Daten

Die Datenerfassung erfolgte über einen Massenbereich von 50–1.200 Da. Zwei voneinander unabhängige Bearbeitungsfunktionen wurden automatisch generiert. Die erste Funktion erfasste die Niedrig-Energie-Daten, welche die Ionen beschreibt. Die zweite Funktion erfasste hingegen die Hoch-Energie-Daten (Fragmente der Molekülonen) unter Verwendung der Kollisionsenergie von 15 bis 35 eV. In beiden Fällen wurde für die sogenannte Kollision-induzierte Dissoziation (engl.: *collision-induced dissociation*; CID) Argon Gas verwendet. Das Prozessieren der Chromatogramme, die Peak-Detektion und Integration erfolgte mittels des Programms MassLynx (Version 4.1, Waters, Manchester, U.K.). Die sogenannte „*untargeted*“ (engl., nicht zielgerichtet, ungerichtet) Lipid-Analyse der Niedrig-Energie-Daten wurde mit dem Programm MarkerLynx (Waters Corporation, Milford, MA) unter Verwendung des Verfahrens der Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principle component analysis*; PCA), einer multivariaten statistischen Analyse, ausgewertet.

Im späteren Verlauf wurden definierte Lipid-Spezies anhand des Masse zu Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) der deprotonierten Lipide und ihrer Acetat-Addukte als Niedrig-Energie-Funktion und der drei Fragmente (neutraler Verlust der Sphingobase; langkettige Fettsäuren, Ameisensäure und Wasser) in der Hoch-Energie-Funktion mit einer Fehlertoleranz von 3 mDa identifiziert. Die als Ceramide identifizierten Verbindungen bestanden aus Sphingobasen wie Sphinganin (d18:0), Sphingosin (d18:1), Phytosphingosin (t18:0) oder Dehydrophytosphingosin (t18:1), sowie Fettsäureketten aus Hexadecansäure (C<sub>16:0</sub>), Hexadecensäure (C<sub>16:1</sub>), Octadecansäure (C<sub>18:0</sub>), Octadecensäure (C<sub>18:1</sub>), Eicosansäure (C<sub>20:0</sub>), Eicosensäure (C<sub>20:1</sub>), Docosansäure (C<sub>22:0</sub>), Docosensäure (C<sub>22:1</sub>), Tetracosansäure (C<sub>24:0</sub>), Tetracosensäure (C<sub>24:1</sub>), Hexacosansäure (C<sub>26:0</sub>), Hexacosensäure (C<sub>26:1</sub>; **Anhang Tabelle 8**). Alle Verbindungen wurden über ihr  $m/z$ -Verhältnis, sowie ihrer Retentionszeit definiert und automatisiert in das Programm TargetLynx assembliert, sodass eine systematische Integration und Identifikation der Lipide in den Extrakten erfolgen konnte.

Die relative Menge in % von jedem Ceramid in den entsprechenden Proben wurde quantifiziert, indem die individuellen Ceramide auf die Einwaage sowie den internen Standard bezogen wurden. Schließlich wurde der prozentuale Anteil eines Ceramides am Gesamtceramid-Pool ermittelt.

$$\% (\text{Ceramid } x) = \left( \frac{\frac{\text{Signalwert}(x)}{g(\text{FW}) * \text{Signalwert}(\text{IS})}}{\sum \text{Signalwerte}(\text{Ceramide}) * 100} \right) * 100$$

## 2.11.2. Wachsanalysen mittels GC-MS

### 2.11.2.1. Wachsextraktion

Die Extraktion der cuticulären Wachse aus Rosettenblättern von zwölf Wochen alten CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 und aus Wildtypen *Arabidopsis thaliana* (WS-2 und Col-0) sowie *ltp2KO* wurde wie folgt durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden zehn Blätter von insgesamt zehn Pflanzen in deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend mit fusselfreiem Papier abgetupft. Die Blätter wurden dann für 30 Sekunden in 15 ml GC-MS geeignetem Chloroform (Biosolve, Valkenswaard, Niederlande) geschwenkt. Dabei war darauf zu achten, dass die Schnittstelle nicht in Kontakt mit dem Lösungsmittel kam. Anschließend wurde als interner Standard *n*-Tetracosan hinzugefügt. Das Lösungsmittel mit den darin enthaltenen Wachsen wurde dann durch Zugabe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und anschließend unter N<sub>2</sub> bei 50°C eingedampft.

Vor der Durchführung der Gaschromatographie wurden dann die Wachskomponenten, welche eine Hydroxyl-Gruppe besitzen, in ihre korrespondierenden Trimethylsilyl-Derivate mit *N,O*-bis-Trimethylsilyl-Trifluoroacetamid (BSTFA; Macherey-Nagel in Pyridin; Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 70°C für 30 min umgewandelt.

### 2.11.2.2. Wachsanalyse mittels GC-MS

Die Wachs-Analysen mittels GC-MS wurden von Dr. M. Riedel (Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Institut; Botanik I) nach dem Protokoll von Ringelmann et al. (2009) durchgeführt. Verwendet wurde dafür der Agilent 7890A Gaschromatograph (7890A; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und als Säule eine 30 m DB-1HT mit 0.32 mm i.d. und d<sub>f</sub> = 0.1 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

### 2.11.3. Suberinanalysen mittels GC-MS

#### 2.11.3.1. Suberinextraktion

Die Suberin-Extraktion wurde von J. Leide (Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Institut, Botanik II) nach dem Protokoll von Schönherr & Riederer (1986) durchgeführt. Dazu wurde das Untersuchungsmaterial zuerst enzymatisch behandelt, indem es für drei Wochen in eine Lösung aus Pektinase (Trenolin Super DF; Erbslöh) und Cellulase (Celluclast; Novo Nordisk AIS) in Zitratpuffer (Zitrat, 20 mM;  $\text{NaN}_3$ , 1 mM; pH=3) inkubiert wurde. Danach folgte das Waschen mit deionisiertem Wasser.

Das luftgetrocknete Material wurde gewogen und in 1 ml Chloroform (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur für drei Stunden extrahiert, um die löslichen Lipidbestandteile zu gewinnen. Im Anschluss folgte eine Transesterifizierung über Nacht bei 70°C in methanolischer 1,5 ml Brom-Trifluorid-Lösung (Brom-Trifluorid in Methanol, 1,3 M; Fluka). Durch diesen Schritt wurden die Methyl-Ester des Suberins gewonnen. Allen Reaktionen wurde schließlich eine gesättigte wässrige Lösung von NaCl und Chloroform sowie internen Standard *n*-Dotriacontan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) zugefügt.

Aus diesem Zwei-Phasen-System wurden die depolymerisierten transmethylierten *N,O*-Bis-Trimethylsilyl-Trifluoroacetamid-Verbindungen mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde unter Zugabe von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und anschließend filtriert, um das Pulver vollständig zu entfernen. Danach wurde die Lösung eingedampft. Vor der Durchführung der Gaschromatographie wurden dann die Suberin-Monomere mit Hydroxyl-Gruppe in ihre korrespondierenden Trimethylsilyl-Derivate mittels *N,O*-bis-Trimethylsilyl-Trifluoroacetamid (BSTFA; Macherey-Nagel in Pyridin; Merck) umgewandelt.

#### 2.11.3.2. Suberin-Analyse mittels GC-MS

Die quantitative und die qualitative Zusammensetzung des Suberins wurde von Dr. J. Leide (Universität Würzburg, Julius-von-Sachs-Institut; Botanik I) nach dem Protokoll von Leide et al. (2007) durchgeführt. Für die Analyse der qualitativen Suberinzusammensetzung wurde die temperaturkontrollierten Kapillargaschromatographie (6890N Network GC System; Agilent Technologies) durch Direktaufgabe auf die Säule (engl.: *on-Column injection*; OCI; 30 m DB-1HT, 320  $\mu\text{m}$  i.d.  $d_f = 0,1 \mu\text{m}$ ; Agilent Technologies) durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Der Druck wurde wie folgt programmiert: 50 kPa für 70 Minuten, 10 kPa/min bis 150 kPa und 150 kPa für 30 Minuten, wobei die einzelnen Komponenten unter Verwendung eines Transmissions-Quadrupol-Massenspektrometers (70 eV,  $m/z$  50–750; 5973 Network MSD;



Agilent Technologies) detektiert wurden. Die Trennung der Suberin-Mischung erfolgte mittels Temperaturgradienten von 50°C für eine Minute und einem langsamen Anstieg um 10°C pro Minute bis auf 150°C erreicht. Diese Temperatur wurde dann für zwei Minuten gehalten, bis ein Anstieg von 3°C pro Minute bis auf 320°C folgte. 320°C wurden dann für 30 Minuten gehalten. Die quantitative Zusammensetzung des Suberins wurde im Anschluss mit der Kapillargaschromatographie (6890N Network GC System; Agilent Technologies) und der Flammenionisations-Detektion unter den gleichen Bedingungen wie zuvor ermittelt, allerdings mit Wasserstoff als Trägergas. Die einzelnen Komponenten wurden gegen den internen Standard von Dr. J. Leide quantifiziert.

## **2.12. Biotische und abiotische Stressexperimente**

### **2.12.1. Agrobakterienapplikation**

Übernachtskulturen des *Agrobacterium tumefaciens* Stamms C58+pJZ383, die bis zu einer OD<sub>600</sub> von eins gewachsen waren, wurden in AB-Minimalmedium dreifach gewaschen (2.2.1.; 2.2.2.). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Agrobakterien in AB-Minimalmedium mit 150 µM Acetosyringon zur Induktion der Virulenz aufgenommen. Nach einer Regeneration bei 28°C bei Dunkelheit und 220 rpm für zwei Stunden wurden 150 µl der Bakteriensuspension zu 21 Tage alten sterilen Wurzelkulturen (2.1.3.) gegeben. Die Wurzelkulturen wurden drei, sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden später geerntet. Als Kontrolle wurden Wurzelkulturen nur mit 150 µl Acetosyringon (150 µM) in AB-Minimalmedium versetzt. Nach der Ernte schloss sich die mRNA-Extraktion (2.6.1.), Reverse Transkription (2.6.2.) und Echtzeit-PCR an (2.6.3.).

### **2.12.2. Phytohormon-Behandlung**

21 Tage alte sterile Wurzelkulturen (2.1.3.) von *Arabidopsis thaliana* wurden mit Abscisinsäure (ABA, 100 µM in Methanol) sowie zur Kontrolle mit der gleichen Menge reinen Lösungsmittels versetzt. Für die Auxin-Applikation wurden die Kulturen mit dem synthetischen Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D; 10 µM in EtOH) sowie reinem Ethanol versetzt. Die Ernte der Wurzelkulturen erfolgte für Auxin nach drei und sechs Stunden und für ABA nach drei, sechs und zwölf Stunden sowie fünf Tagen durchgeführt. Nach der Ernte wurde mRNA extrahiert (2.6.1), die Reverse Transkription (2.6.2.) und Echtzeit-PCR (2.6.3) durchgeführt.

### 2.13. Sequenzanalysen

Sämtliche Nukleotid-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Gene oder Promotoren wurden unter Verwendung des Genomic iSect Tools von SIGnAL (Salk Institute Genomic Analyses Laboratory; (<http://signal.salk.edu/isects.html>)) erstellt. Die entsprechenden Nukleotid-Sequenzen wurden für Klonierungsprozesse oder Sequenzvergleiche verwendet. Mittels des Programms Clustal Omega (Sievers et al., 2011; [www.clustal.org/omega/](http://www.clustal.org/omega/)) von EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>) wurden die Aminosäuresequenzen diverser LTPs verglichen (Sequenzen siehe **Anhang Tabelle 1**). Basis für die Erstellung des phylogenetischen Baumes war der Algorithmus der „*Neighbour-Joining*“-Methode nach Saitou & Nei (1987). Nach dieser Methode wird ein Baum mit den kürzesten „Astlängen“ erstellt. Die Messung der Distanzen erfolgte nach der sogenannten PID-Methode. Diese beschreibt die Homologie zwischen zwei Sequenzen an jeder Position (Anzahl identischer Basen pro 100 Basen-Paaren).

Als potentielle Promotoren für *LTP1* (1874 Bp) und *LTP2* (1272 Bp) wurden die Bereiche zwischen zwei Genloki angesehen. Weitere wichtige Motive wie Startcodons (ATG=Basentriplett zur Initiation der Transkription), 3' und 5'UTRs (=Untranslationierte Regionen), sowie Introns (aus engl.: „*intervening regions*“; nicht kodierende Bereiche) und Exons (aus engl.: „*expressed region*“; kodierende Bereiche) wurden unter Verwendung von PlantpromotorDB2.0 (<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) ermittelt. Stammbäume wurden mit Hilfe von Clustal Omega ([www.clustal.org/omega/](http://www.clustal.org/omega/)) errechnet sowie visualisiert (Sievers et al., 2011).

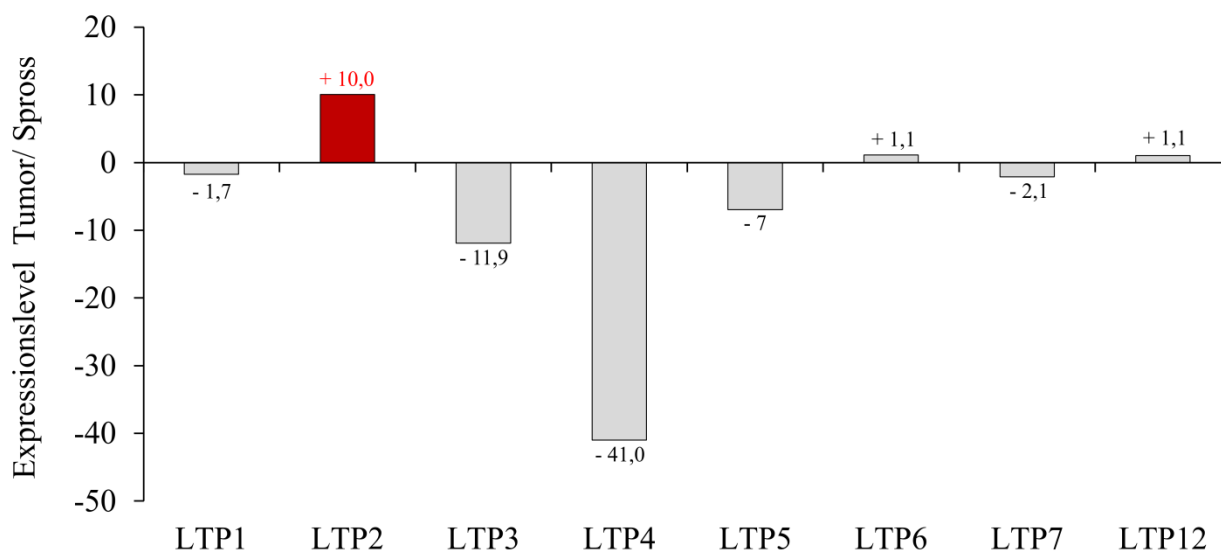
### 2.14. Statistische Auswertung

Sämtliche Daten in den Diagrammen repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte (MW). Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, wobei die Fehlerbalken bei n=3 die Standardabweichung (SA) beschreiben. Zur Ermittlung der Signifikanzen wurde der Student's t-Test verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Sequenzanalysen von LTP2

Micro-Array Analysen von Wurzelhalsgallen, die sich an *Arabidopsis thaliana* nach der Infektion mit virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) entwickeln, haben gezeigt, dass das Lipidtransferprotein 2 (LTP2; At2g38530) zehnfach transkriptionell induziert ist (Deeken et al., 2006). Aus der LTP-Gen-Familie mit mehr als 49 Mitgliedern ist im Tumor kein weiteres LTP transkriptionell induziert (**Abbildung 8**). Da tendenziell mehr LTPs transkriptionell in Tumoren reprimiert sind (z.B.: LTP3, LTP4), scheint LTP2 in Tumor-Gewebe eine ganz besondere Rolle einzunehmen.

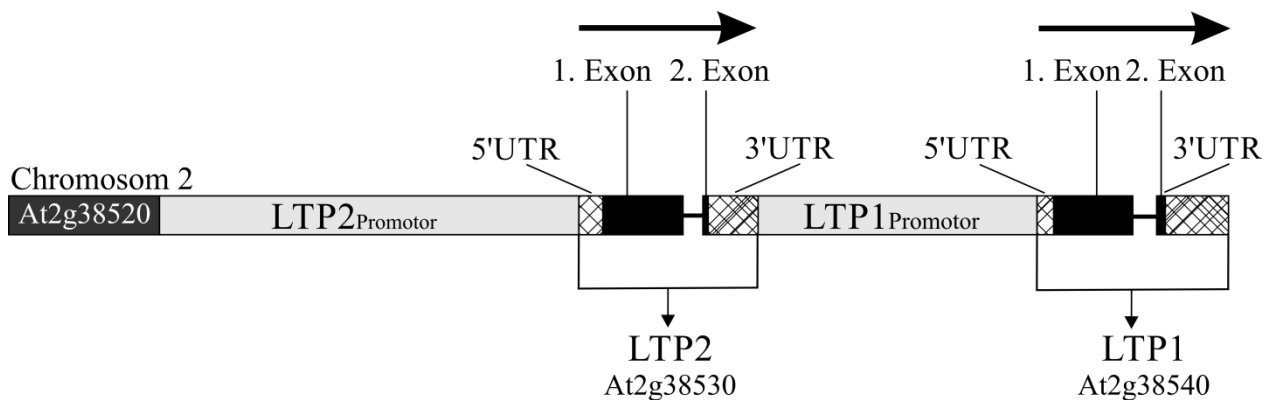


**Abbildung 8** Verhältnisse der *LTP*-Gen-Expressionslevel im *Arabidopsis thaliana* Spross zu 35 Tage alten durch *Agrobacterium tumefaciens* induzierten Tumoren auf Basis der Micro-Array Analysen nach Deeken et al., 2006. LTP: Lipidtransferprotein.

Funktionell wurden LTPs bislang als Transferproteine von Lipiden definiert (Kader et al., 1996). Warum ausgerechnet nur LTP2 als einziges Mitglied der LTP-Familie im Tumor transkriptionell induziert ist und welche Rolle das Protein einnehmen könnte, soll in dieser Arbeit geklärt werden. Um Informationen über die Funktion und Regulationen, sowie über die besondere Stellung von LTP2 im Tumor zu gewinnen, wurden in einem ersten Schritt Sequenzanalysen durchgeführt.

### 3.1.1. Position von *LTP1* und *LTP2* auf dem 2. Chromosom

Die Ergebnisse aller durchgeführten Sequenzanalysen offenbaren, dass *LTP1* die größte Homologie zu *LTP2* besitzt (**Tabelle 13, 3.1.1.**). Die Genloki von *LTP1* (At2g38540) und *LTP2* (At2g38530) sind auf dem zweiten Chromosom von *Arabidopsis thaliana* direkt hintereinander angeordnet (**Abbildung 9**). Für das *LTP2*-Gen umfasst der kodierende Bereich auf der genomischen DNA inklusive der 3' und 5' untranslationierten Region (UTR) 777 Basenpaare. Das *LTP1*-Gen besitzt hingegen einen kodierenden Bereich von 821 Basenpaaren. Beide Gene weisen zwei Exons (engl.: „*expressed region*“) und ein Intron (engl.: „*intervening regions*“) auf. Das zweite Exon umfasst jeweils zehn Basenpaare und das erste 347 (*LTP2*) bzw. 344 (*LTP1*) Basenpaare. Die Introns besitzen eine Länge von 111 (*LTP2*) bzw. 119 (*LTP1*) Basenpaaren. Dem *LTP2*-Gen vorgelagert ist ein transposabler Locus (At2g38520; West et al., 2006).

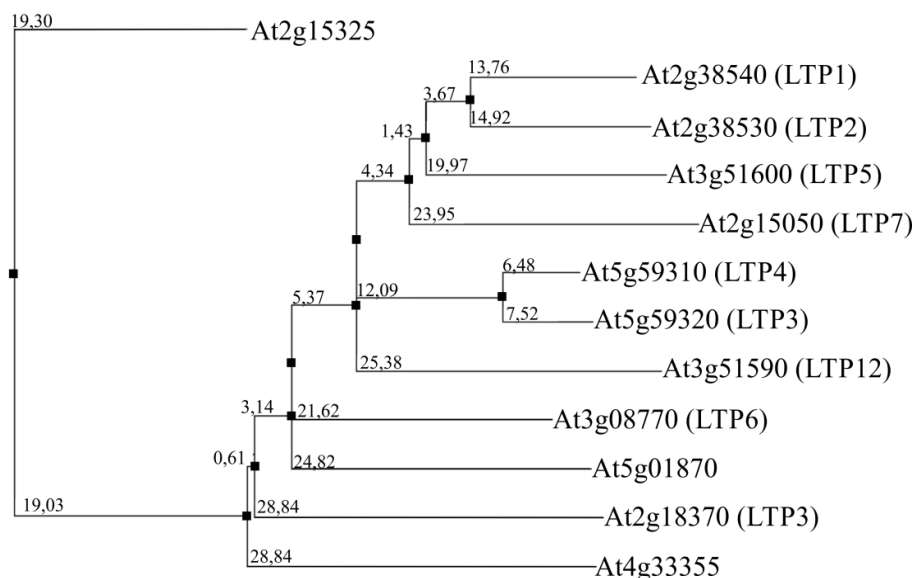


**Abbildung 9** Struktur von *LTP1* (At2g38540) und *LTP2* (At2g38530) auf dem zweiten Chromosom von *Arabidopsis thaliana*. Die Genloki sind inklusive der Exons und Introns sowie der 5' und 3' UTRs mittels SIGnAL (Salk Institute Genomic Analyses Laboratory, <http://signal.salk.edu/isects.html>) erstellt worden. Als potentielle Promotor für *LTP1* (1874 Bp) und *LTP2* (1272 Bp) wurden die Bereiche zwischen den kodierenden Abschnitten definiert. UTR: untranslationierten Region. Graue Balken: Promotor; Schwarze Balken: Exons; Schraffierte Balken: UTRs; Schwarzer Strich: Intron; Pfeile: Transkriptionsrichtung.

### 3.1.2. Aminosäurevergleich von *LTP2* mit anderen LTPs aus *Arabidopsis*

Auf der Grundlage von Aminosäuresequenzen wurde *LTP2* mit den übrigen Mitgliedern der Unterfamilie der LTPs aus *Arabidopsis thaliana* nach einer Kategorisierung von Boutrot et al. (2008) verglichen. Die über die Datenbank NCBI ermittelten Aminosäuresequenzen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) wurden mit Hilfe des Programms Clustal Omega (Sievers et al., 2011; <http://www.ebi.ac.uk>; **2.13.**) miteinander in einem Phylogramm visualisiert. Das Phylogramm veranschaulicht, dass das am nächsten zu *LTP2* verwandte Protein *LTP1* (At2g38540) ist (**Abbildung 10**). Ebenso sind auch die Proteine *LTP3* (At5g59320) und *LTP4* (At5g59310), sowie *LTP6* (At3g08770) und das bisher unbekannte Protein At5g01870 zueinander sehr stark homolog. Eine entwicklungsgeschichtliche Trennung der Äste *LTP1*,

LTP2, LTP5, LTP7 und LTP3, LTP4 erfolgte erst spät. Die nächsten Homologen zu LTP2 sind neben LTP1, LTP5, LTP7, LTP3 und LTP4 (**Abbildung 10, Tabelle 13**).



**Abbildung 10** Verwandtschaften der LTPs von *Arabidopsis thaliana* (Boutrot et al., 2008). Das Phylogramm wurde mit Hilfe von multiplen Aminosäuresequenzvergleichen durch das Programm Clustal Omega erstellt. Angegeben sind die AGI-Codes, sowie die bisher bekannten Gen-Namen.

**Tabelle 13** Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der LTPs aus *Arabidopsis thaliana*, ermittelt durch Clustal Omega. In den Klammern ist die prozentuale Übereinstimmung ohne Signalpeptid angegeben. Die bekannten Gen-Namen, sowie die dazugehörigen AGI-Codes sind dargestellt. Die Abbildung ist der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen.

Name (AGI-Code)	LTP1	LTP2	LTP3	LTP4
<b>LTP1 (At2G38540)</b>	100 (100)	<b>68 (63)</b>	53 (59)	53 (59)
<b>LTP2 (At2G38530)</b>	<b>68 (63)</b>	<b>100 (100)</b>	<b>52 (57)</b>	<b>52 (58)</b>
<b>LTP3 (At5G59320)</b>	53 (59)	<b>52 (57)</b>	100 (100)	83 (82)
<b>LTP4 (At5G59310)</b>	53 (60)	<b>52 (58)</b>	83 (82)	100 (100)
<b>LTP5 (At3G51600)</b>	61	<b>55</b>	49	46
<b>LTP6 (At3G08770)</b>	40	<b>36</b>	42	41
<b>LTP7 (At2G15050)</b>	39	<b>42</b>	52	53
<b>LTP12 (At3G51590)</b>	56	<b>56</b>	42	45
<b>At2G15325</b>	19	<b>22</b>	26	29
<b>At2G18370</b>	31	<b>30</b>	33	34
<b>At4G33355</b>	33	<b>34</b>	36	36
<b>At5G01870</b>	42	<b>37</b>	41	39

Für den Vergleich der in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten LTPs: LTP1, LTP2, LTP3 und LTP4 wurden die Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programmes ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk>) gegenüber gestellt (**Abbildung 11**). Die von Arondel et al. (2000) als Signalpeptid definierten Abschnitte sind schwarz umrahmt dargestellt. Auffällig ist ein bei den vier LTPs konservierter Bereich von neun Aminosäuren (Aminosäuren 67-75). Neben den acht konservierten Cysteinen (Position 30, 40, 54-55, 75, 77, 101, 115) sind in allen vier Sequenzen auch zwei Valin (Positionen 33 und 58) und Leucin (Position 37 und 61) sowie je ein Glycin (Position 47) und Alanin (Position 82) vorhanden (**Abbildung 11**).

```

AT2G38540_LTP1   MAGVMK-LACLLACMTVAGPITSNAALSCGSVNSNLAACIGVVLQGGVIPPACCSGVKN 59      68%
AT2G38530_LTP2   MAGVMK-LACMVLACMTVAGPITANALMSCGTVNGNLAGCIAYLTRGAPLTQGCCNGVTN 59      100%
AT5G59320_LTP3   MAFALRFFFTCLVLTVCIVA---SVDAAITSCGTVAGSLAPCATYLSKGGLVPPSCCAGVKT 57      52%
AT5G59310_LTP4   MAFALRFFFTCFVLTVCIVA---SVDAAITCGTVASSLSPCLGYLSKGGVPPPPCCAGVKK 57      52%
**  .:.  .:.*:.*:  ***  :  :*  :*:*:.*  ..*:  *  *  :  :.  .:  **  **..

AT2G38540_LTP1   LNSIAKTTPDRQQACNCIQGAARALGSGLNAGRAAGIPKACGVNIPYKISTSTNCKTVR 118     68%
AT2G38530_LTP2   LKNMASTTPDRQQACRCLQSAAKAVGPGLNTRARAAGLPSACKVNI PYKISASTNCNTVR 118     100%
AT5G59320_LTP3   LNSMAKTTPDRQQACRCIQSTAKSI-SGLNPSLASGLPGKCGVSI PYPIISMSTNCKNIK 115     52%
AT5G59310_LTP4   LNGMAQTTPDRQQACRCLQSAAK---GVNPSLASGLPGKCGVSI PYPIISTSTNCATIK 112     52%
*:.:*.*****.*:.*:.*:  *:*..  *:*:*  **  *.***  **  *****  .:.

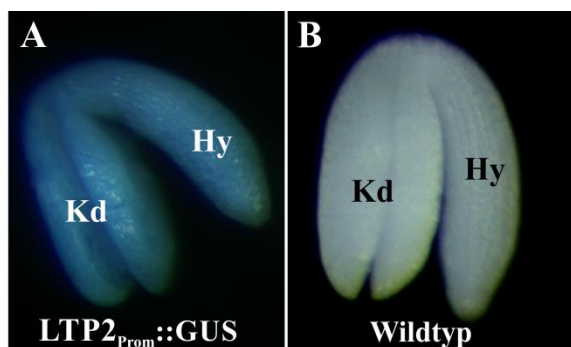
```

**Abbildung 11** Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Arabidopsis thaliana* LTP1, LTP2, LTP3 und LTP4 mittels ClustalW2. Grau markiert sind die identischen Aminosäuren aller vier Proteine. Nur zu LTP2 identische Aminosäuren sind in roten Buchstaben dargestellt. Die prozentuale Übereinstimmung in Bezug auf LTP2 (100%) ist auf der rechten Seite angegeben. Der Kasten rahmt die Aminosäuren des Signalpeptides ein (Arondel et al., 2000). Konservierte Aminosäuren: \* = in 80% der Sequenzen; : = in 40% der Sequenzen; . = in 20% der Sequenzen. Die Abbildung ist der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen.

## 3.2. Gewebsspezifische Expression

### 3.2.1. *LTP2*-Promotoraktivität in *Arabidopsis thaliana*

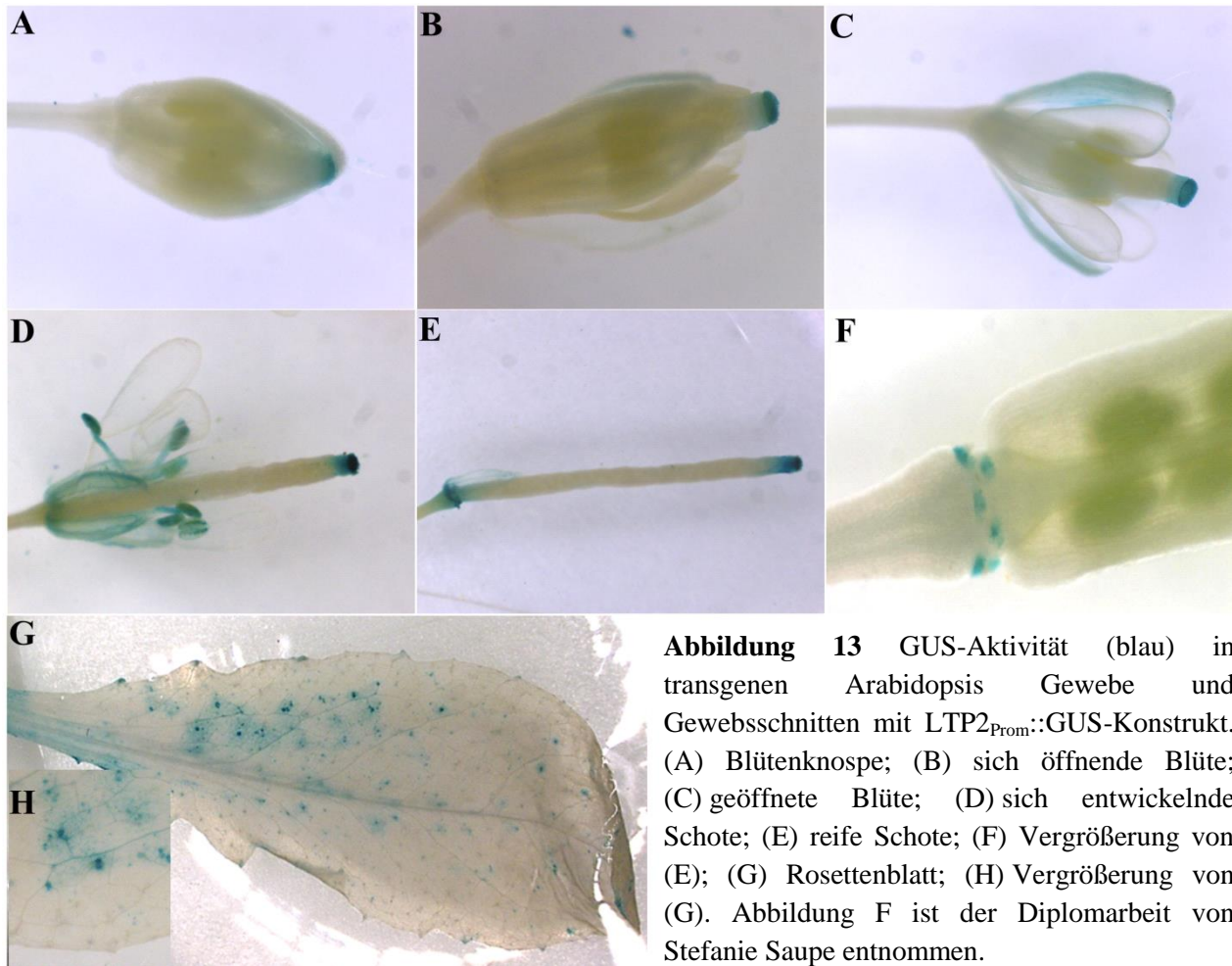
Zur Analyse der Funktion von *LTP2* wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. *LTP2*-Promotor-*GUS*-Analysen ermöglichen das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des *LTP2*-Gens zu bestimmen. Als Promotor von *LTP2* dient eine 1874 Bp lange Nukleotidsequenz *stromaufwärts* des Translationsstartes. In den transgenen Pflanzen wurde das  $\beta$ -D-Glucuronidase-Gen (*gusA*, *GUS*) unter Kontrolle des *LTP2*-Promotors gestellt. Als Negativkontrollen dienen Vektoren mit *gusA* ohne die entsprechende *LTP2*-Promotorsequenz (2.9.; **Anhang Abbildung 4**). Drei unabhängige Linien mit identischen Expressionsmuster wurden untersucht. Exemplarisch ist nur jeweils eine Linie in den folgenden Abbildungen dargestellt. Vor der *GUS*-Färbung erfolgte die Überprüfung der genomischen DNA mittels PCR auf die *GUS*-Insertion (**Anhang Abbildung 4, Anhang Tabelle 7**). Zur Überprüfung der erfolgreichen T-DNA-Insertion wurden spezifische Primer verwendet, wobei sich der eine Primer (*sense*) direkt innerhalb des Promotors, und der andere (*antisense*) innerhalb der *GUS*-Insertion anlagerte (**Anhang Tabelle 7**). Zur Visualisierung der *GUS*-Expression in Keimlinge wurden diese zuerst zwölf Stunden in Wasserquellen gelassen. Nach dem Entfernen der Samenschale erfolgte eine 30-minütige Inkubation in *GUS*-Färbelösung (9.1.). Die Keimlinge von allen drei getesteten Linien sind ubiquitär blau gefärbt (**Abbildung 12 A**). Dass diese Färbung spezifisch für den Keimling ist, zeigt sich in den Kontrollen, welche das *GUS*-Gen ohne den *LTP2*-Promotor enthalten (**Abbildung 12 B**).



**Abbildung 12** *GUS*-Aktivität (blau) in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* (WS-2). (A) Keimling einer transgenen *LTP2*<sub>Prom</sub>::*GUS*-Pflanze. (B) Keimling von Pflanze mit *GUS*-Gen ohne *LTP2*-Promotor. Hy: Hypokotyl; Kd: Kotyledonen. Die Abbildungen wurden der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen und verändert.

Für die Blüte wurde zudem der zeitliche Verlauf der *GUS*-Expression ermittelt. In allen Entwicklungsstadien der Blüte lässt sich eine starke *GUS*-Expression in den Papillen des Stigmas beobachten (**Abbildung 13 A-E**). Im Vergleich dazu weisen Kelchblätter (Sepalen), Antheren und Schoten nur in bestimmten Entwicklungsstadien eine Blaufärbung auf (**Abbildung 13 A-E**). Diese ist immer dann zu erkennen, wenn die Blütenbestandteile altern und abgeworfen werden (Sepalen: **Abbildung 13 C**; Antheren: **Abbildung 13 D**; Kronblätter (Petalen): **Abbildung 13 D-F**). So sind z.B. an den Ansatzstellen, an denen die Sepalen ursprünglich an den

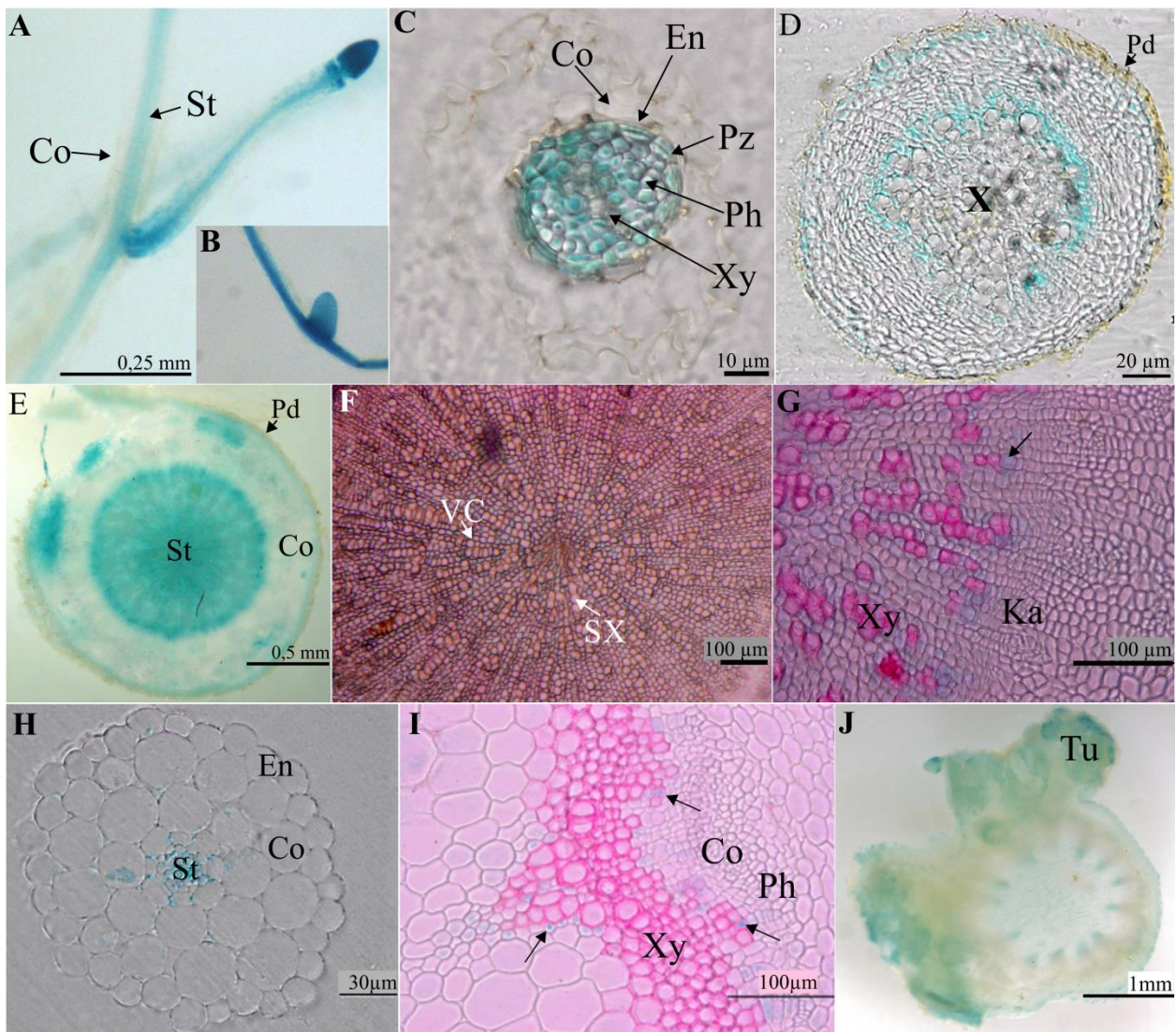
reifenden Schoten verankert waren, Blaufärbungen zu erkennen (**Abbildung 13 F**). Des Weiteren zeigt die Lamina der Rosettenblätter von acht Wochen alten Pflanzen punktartige blaue Areale. Dies lässt auf eine Aktivität des *LTP2*-Promotors in Zellen, welche die Trichom-Entwicklung durchlaufen, schließen (**Abbildung 13 G & H**).



**Abbildung 13** GUS-Aktivität (blau) in transgenen *Arabidopsis* Gewebe und Gewebsschnitten mit *LTP2*<sub>Prom</sub>::GUS-Konstrukt. (A) Blütendknospe; (B) sich öffnende Blüte; (C) geöffnete Blüte; (D) sich entwickelnde Schote; (E) reife Schote; (F) Vergrößerung von (E); (G) Rosettenblatt; (H) Vergrößerung von (G). Abbildung F ist der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen.

Die Analyse der GUS-Aktivität in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* zeigt, dass der *LTP2*-Promotor in jüngeren Wurzelabschnitten teilweise an der Wurzelspitze, sowie an der ausknospenden Wurzel aktiv ist (**Abbildung 14 A & B**). Insbesondere kann eine Blaufärbung in der Stele, nicht jedoch im Cortex erkannt werden (**Abbildung 14 A & E**).





**Abbildung 14** GUS-Aktivität von  $LTP2_{Prom}::GUS$  in transgenen *Arabidopsis* Geweben und Gewebsschnitten visualisiert anhand von Blaufärbung. (A) Wurzel in Übersicht; (B) ausknospende Wurzel; (C) Querschnitt einer Wurzel einer zwei Wochen alten Pflanze; (D) Querschnitt einer Wurzel einer vier Wochen alten Pflanze; (E, F, G) Querschnitte einer Wurzel einer drei Monate alten Pflanze mit sekundärem Dickenwachstum; (H) Querschnitt eine Hypokotyli; (I) Ausschnitt eines Sprossquerschnitts einer drei Monate alten Pflanze; (J) Querschnitt eines 21 Tage alten Tumors. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 100  $\mu$ m dicken Handmikrotom-Querschnitten (E, J) und von 15  $\mu$ m Dünnschnitten von in Harz eingebettetem Gewebe (C, D, F, G, H, I). Färbung verholzter Xylemgefäße mit Safranin (rot; F, G, I). Co: **C**ortex; CP: **C**ortexparenchym; En: **E**ndodermis; Ka: **K**ambium; Ph: **P**hloem; Pd: **P**eriderm; Pz: **P**erizykel; St: **S**tele; SX: sekundäres **X**ylem; Tu: **T**umor; VK: vaskuläres **K**ambium Xy: **X**ylem; Pfeile in I und G zeigen GUS-Aktivität. Die Abbildungen A-I sind der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen.

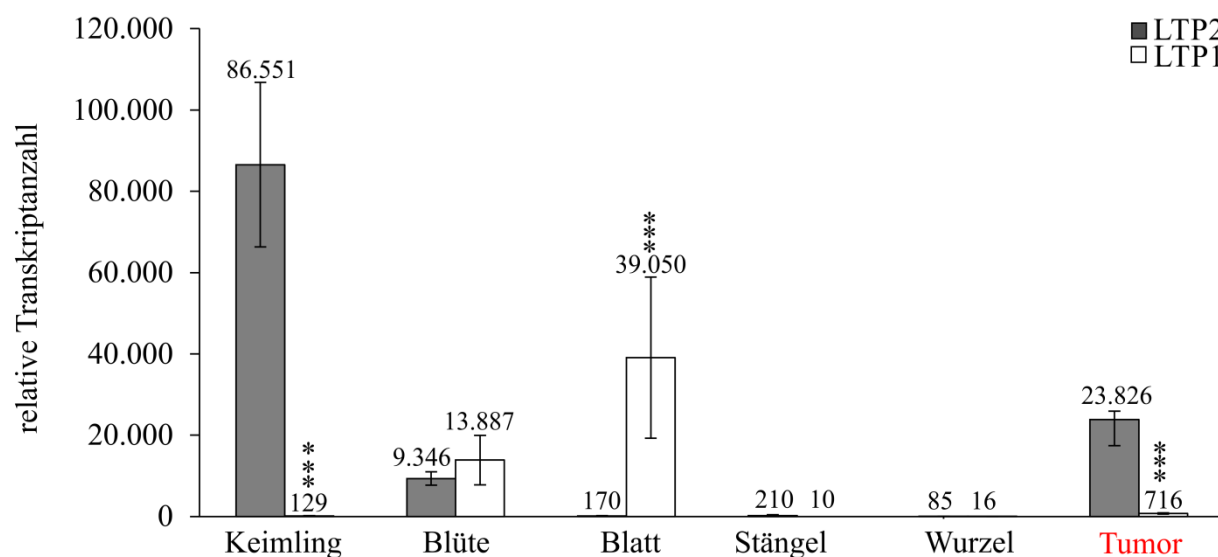
Die Ultradünnschnitte verdeutlichen, dass in jungen Wurzeln alle lebenden Zellen der Stele Aktivitätsbereiche des *LTP2*-Promotors sind (**Abbildung 14 C**). Querschnitte von der Hauptwurzel drei Monate alter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit dem Transgen  $LTP2_{Prom}::GUS$  zeigen eine Blaufärbung im Zentralzylinder, sowie in den äußersten Zellschichten unterhalb des

Periderms (**Abbildung 14 E**). Wurzeln mit beginnendem sekundärem Dickenwachstum besitzen eine deutliche GUS-Aktivität in mehreren Zellschichten als geschlossener Ring außerhalb des Xylems sowie direkt unterhalb des Periderms (**Abbildung 14 D**). In Wurzeln mit fortgeschrittenem sekundärem Dickenwachstum sind blaufärbte Zellen zwischen sekundären Xylemgefäßen eingestreut (**Abbildung 14 F & G**).

Zur besseren Zellauflösung wurde nach dem Einbetten mit Safranin gefärbt. Der Farbstoff visualisiert sekundär verdickte Zellwände des Protoxylems. Der Querschnitt eines Hypokotyls zeigt eine deutliche *LTP2*-Promotoraktivität in Zellen innerhalb der Stele ebenso, wie an den Flanken des Casparischen Streifens und in Endodermiszellen (**Abbildung 14 H**). Ultradünnschnitte des Sprosses visualisieren eine Blaufärbung in Xylemparenchymzellen in direkter Nachbarschaft zu verholzten Zellen (**Abbildung 14 I**, Rotfärbung durch Safranin). Tumore weisen eine Aktivität des *LTP2*-Promotors in der Peripherie, sowie im zentralen Bereich des Xylemgewebes auf (**Abbildung 14 J & L**). Aus den Analysen zur gewebsspezifischen Lokalisation von *LTP2* geht somit hervor, dass der *LTP2*-Promotor in Zellen von Geweben, mit sekundären Zellwandmodifikationen aktiv ist.

### 3.2.2. Quantitative Bestimmung von *LTP2*-Transkripten im Vergleich zu *LTP1*

Zur Verifizierung der histochemischen Expressionsuntersuchungen wurde die Transkriptanzahl des *LTP2*-Gens mittels Echtzeit-PCR quantifiziert (**2.6.3.**) und mit der des nächsten Homologes (*LTP1*) verglichen. Beide Gene sind direkt hintereinander auf dem zweiten Chromosom des Arabidopsis Genoms angeordnet, haben aber unterschiedliche Promotorsequenzen (**3.1.3.**). Die Quantifizierung bestätigt das via GUS ermittelte Expressionsmuster. Die Transkriptanzahl von *LTP2* ist am höchsten im Keimling, in der Blüte und im Tumor. *LTP1* hingegen, ist zwar ähnlich häufig wie *LTP2* in der Blüte vertreten, aber im Keimling können nur vergleichsweise wenig Transkripte gemessen werden. Auch im Tumor sind nur wenig Transkripte *LTP1* zu detektieren - das bedeutet, dass *LTP2* im Tumor eine 33-fach höhere Expression als *LTP1* aufweist. Im Blatt hingegen, wird *LTP1* am stärksten exprimiert, wohingegen *LTP2* dort nur ein vergleichsweise niedriges Expressionsniveau besitzt. In Stängel und Wurzel werden beide *LTP*-Gene nur schwach exprimiert (**Abbildung 15**). *LTP1* und *LTP2* weisen trotz hoher Sequenzhomologien unterschiedliche Expressionsorte auf. *LTP2*-Transkripte dominieren im Keimling und im Tumor.



**Abbildung 15** Transkriptanzahl von *LTP1* und *LTP2* in den verschiedenen Organen und dem 21 Tage alten durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) induzierten Tumor an *Arabidopsis thaliana*. Die Transkriptanzahl wurde auf 10.000 Transkripte *ACT2/8* normiert. Dargestellt ist der Mittelwert mehrerer biologisch unabhängiger Experimente  $\pm$  SA. Keimling: n=3; Blüte: n=6; Blatt: n=6; Stängel: n=3; Wurzel: n=6; Tumor: n=6. Signifikanzlevel wurden mittels des Student's t-Tests ermittelt:\*\*\*=p<0,01; \*\*=p<0,05; \*=p>0,1. Die Werte für Keimling, Blüte, Stängel und Wurzel sind der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen.

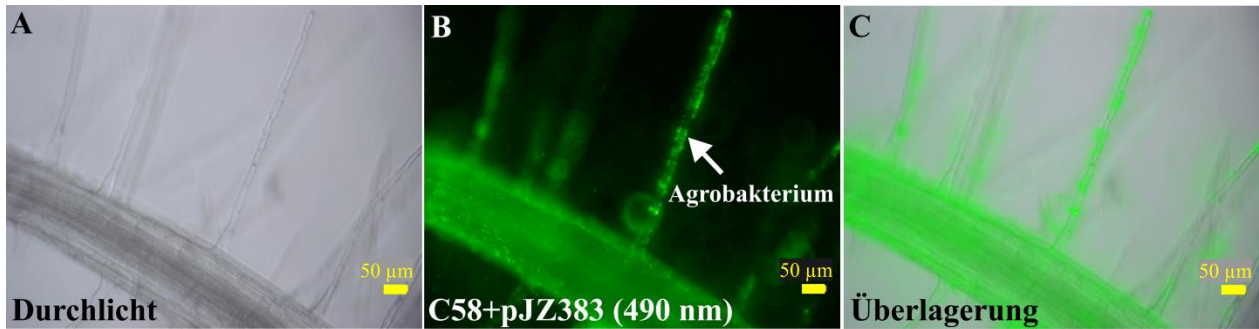
### 3.3. Regulation der *LTP2*-Gen-Expression

Ebenso wie durch die Micro-Array Analysen von Tumoren an *Arabidopsis thaliana* gezeigt wurde, ist auf Basis von quantitativen Echtzeit-PCR-Messungen die Expression des *LTP2*-Gens stark erhöht (Deeken et al., 2006; **Abbildung 8**, **Abbildung 15**). Kein anderes LTP, nicht einmal das nächste Homolog *LTP1*, weist eine erhöhte Transkription im Tumor auf. In der Folge soll der Einfluss tumortypischer Faktoren auf die *LTP2*-Gen-Expression analysiert werden.

#### 3.3.1. Einfluss von Agrobakterien

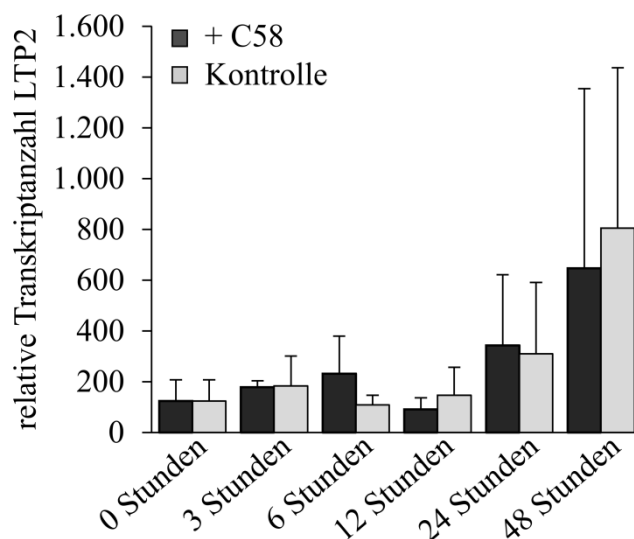
Micro-Array Analysen von Wurzelhalsgallen, die sich an *Arabidopsis thaliana* nach der Infektion mit virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) entwickeln, haben gezeigt, dass *LTP2* zehnfach transkriptionell induziert ist (Deeken et al., 2006). Um zu prüfen, ob die Induktion der *LTP2*-Expression durch *Agrobacterium tumefaciens* ausgelöst wird, wurde die *LTP2*-Transkriptanzahl als Antwort auf eine Infektion von *Arabidopsis thaliana* Wurzelkulturen mit Agrobakterien gemessen. Hierfür wurde der onkogene *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58 mit dem Zusatz-Plasmid pJZ383 (**Tabelle 2**) verwendet. Durch die Expression des auf dem Zusatz-Plasmid enthaltenden Fluorophors (GFP; grün-fluoreszierendes Protein) ist es bei einer Anregung mit UV-Licht (490 nm) möglich, die Agrobakterien anhand ihrer grünen Fluoreszenz

zu detektieren und somit zu lokalisieren. Drei Stunden nach der Applikation des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes C58+pJZ383 zu *Arabidopsis thaliana* Wurzelkulturen (2.11.1) ist anhand des Fluoreszenzsignals eine Anlagerung der Bakterien an die Wurzeloberfläche inklusive der Wurzelhaare zu erkennen (**Abbildung 16**).



**Abbildung 16** *Arabidopsis thaliana* Wurzelkultur drei Stunden nach der Applikation des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes C58+pJZ383. (A) Durchlicht; (B) Fluoreszenzdetektion bei 490 nm; (C) Überlagerung von (A) & (B). Pfeil deutet auf einzelne fluoreszierende Bakterien.

Quantitative Echtzeit-PCR-Messung (2.6.3) von *LTP2*-Transkripten in *Arabidopsis thaliana* Wurzelkulturen drei, sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden nach der Applikation von *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58+pJZ383 zeigen keine signifikanten Veränderungen in der Transkriptanzahl von *LTP2* (**Abbildung 17**). Ein leichter Anstieg der *LTP2*-Gen-Expression um das 1,5-fache ist erstmalig nach 24 Stunden zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Anstieg der *LTP2*-Expression in *Arabidopsis thaliana* nicht durch *Agrobacterium tumefaciens* per se ausgelöst wird, da er zu einem sehr späten Zeitpunkt erfolgt. Es müssen demnach andere Faktoren innerhalb des Tumors positiv die *LTP2*-Expression beeinflussen.

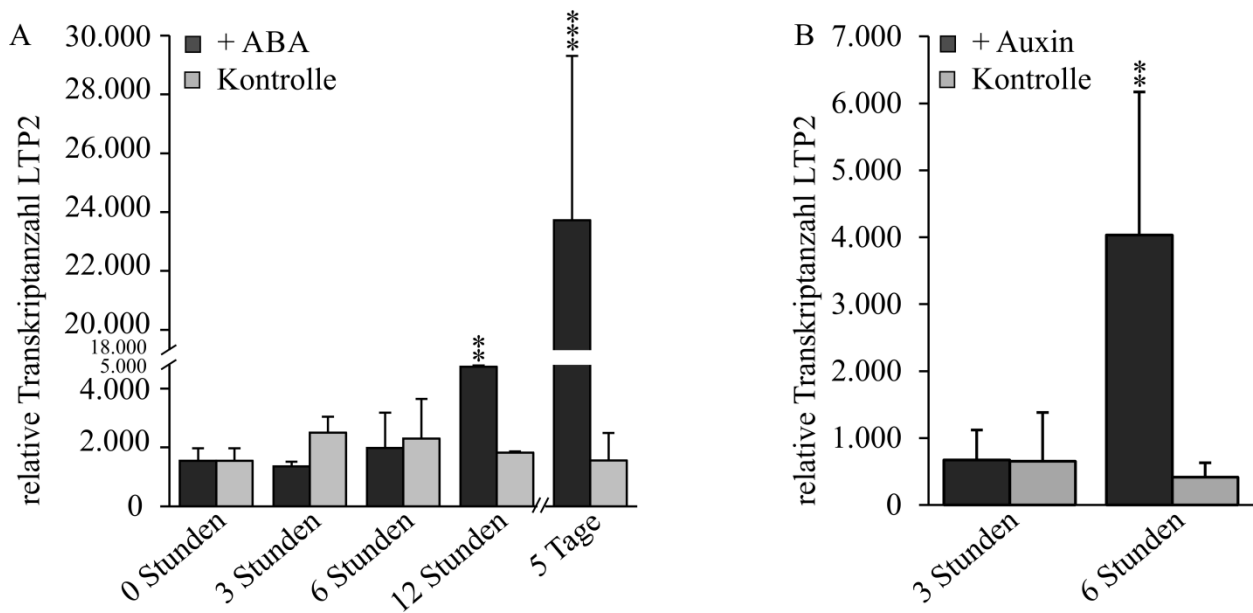


**Abbildung 17** *LTP2*-Transkriptanzahl in unbehandelten (graue Balken) und mit *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58+pJZ383 infizierten (schwarze Balken) *Arabidopsis thaliana* Wurzelkulturen. Die Berechnung basiert auf Mittelwerten von jeweils vier unabhängigen biologischen Experimenten. Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SA.

### 3.3.2. Phytohormonbehandlung

Phytohormone, wie ABA und Auxin, spielen eine essentielle Rolle bei der Tumorentwicklung. Die *LTP2*-Promotor-GUS-Analysen haben gezeigt, dass sowohl im zentralen Bereich der Tumore an *Arabidopsis thaliana*, als auch in der Peripherie eine erhöhte *LTP2*-Expression stattfindet. Um zu prüfen, ob *LTP2* durch ABA induziert wird, wurde der experimentelle Ansatz nach Efetova et al. (2007) wiederholt. Es wurden sowohl die kurzzeitigen Antworten der *LTP2*-Gen-Expression auf die ABA-Applikation (null, drei, sechs und zwölf Stunden), als auch die Langzeitwirkung untersucht. Drei und sechs Stunden nach der ABA-Applikation kann keine signifikante Veränderung der *LTP2*-Expression gemessen werden (**Abbildung 18 A**). Nach zwölf Stunden ist ein leichter Anstieg der Expression auf das Zweifache zu messen. Fünf Tage nach der ABA-Applikation zu Wurzelkulturen steigt die *LTP2*-Expression signifikant 14-fach an. Eine Langzeit-ABA-Applikation begünstigt folglich die *LTP2*-Gen-Expression.

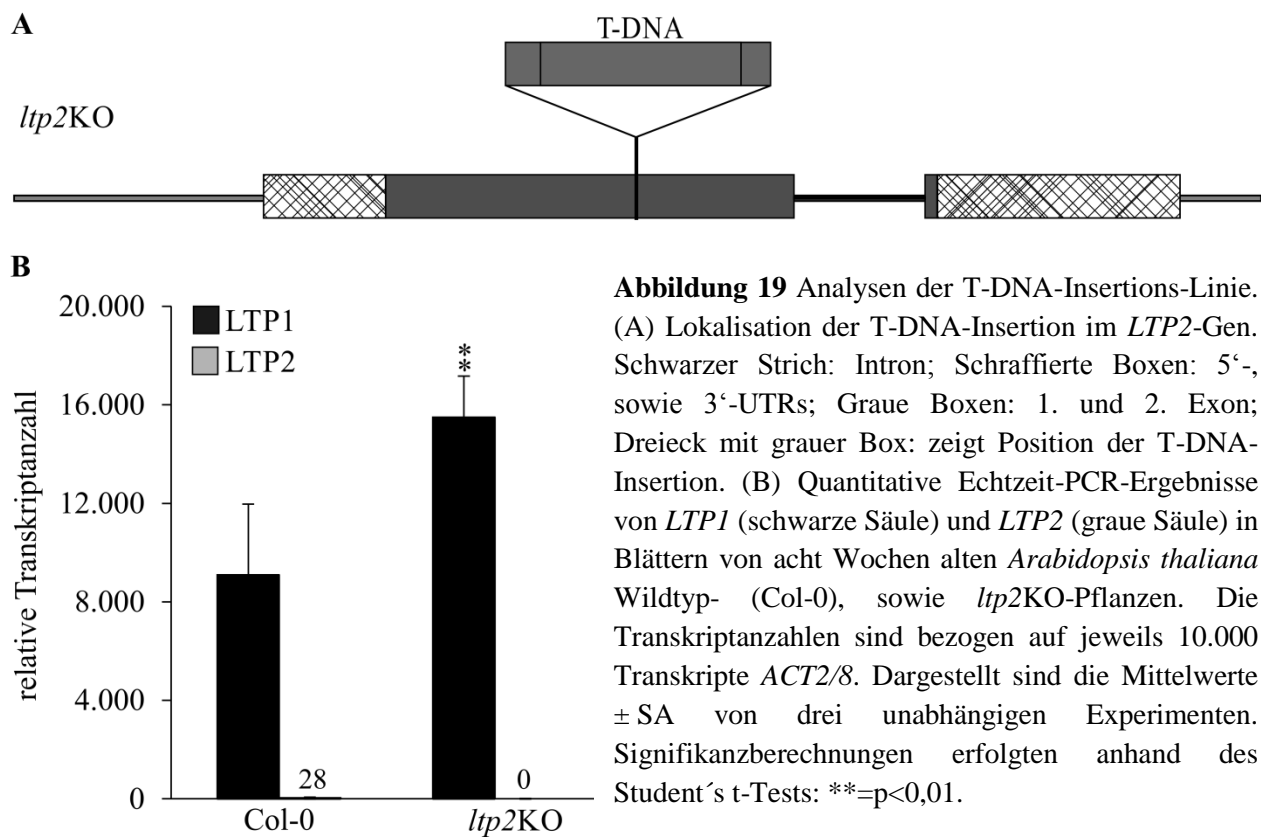
Die Antwort der *LTP2*-Expression auf die Auxin-Applikation wurde in der Folge untersucht. Drei Stunden nach Applikation des synthetischen Auxins 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) kann keine signifikanten Veränderungen der *LTP2*-Transkriptanzahl gemessen werden. Jedoch ist ein Anstieg der *LTP2*-Transkripte um das Vierfache sechs Stunden nach der Zugabe von 2,4-D zu verzeichnen (**Abbildung 18 B**). Auxin beeinflusst die Expression von *LTP2* also positiv.



**Abbildung 18** Antwort der *LTP2*-Expression auf Phytohormonapplikation. *LTP2*-Transkriptanzahl pro 10.000 Transkripte *ACT2/8* in Wurzelkulturen von *Arabidopsis thaliana* (Col-0). (A) Zeitreihe der Transkriptanzahl von *LTP2* nach der Applikation von Abscisinsäure (ABA; 10  $\mu$ M in EtOH) sowie reinem Lösungsmittel (Kontrolle) zu Wurzelkulturen. (B) *LTP2*-Transkriptanzahl drei, sowie sechs Stunden nach der Applikation von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D; 10  $\mu$ M) oder reinem Lösungsmittel (EtOH). Dargestellt sind Mittelwerte biologisch unabhängiger Experimente  $\pm$  SA. ABA: n=4; 2,4-D: n=3. Abbildung (B) sowie die Daten zur fünftägigen ABA-Applikation aus Abbildung (A) sind der Diplomarbeit von Stefanie Saupe entnommen. Signifikanzlevel wurden mittels des Student's t-Tests ermittelt:\*\*\*=p<0,01; \*\*=p<0,05; \*=p>0,1.

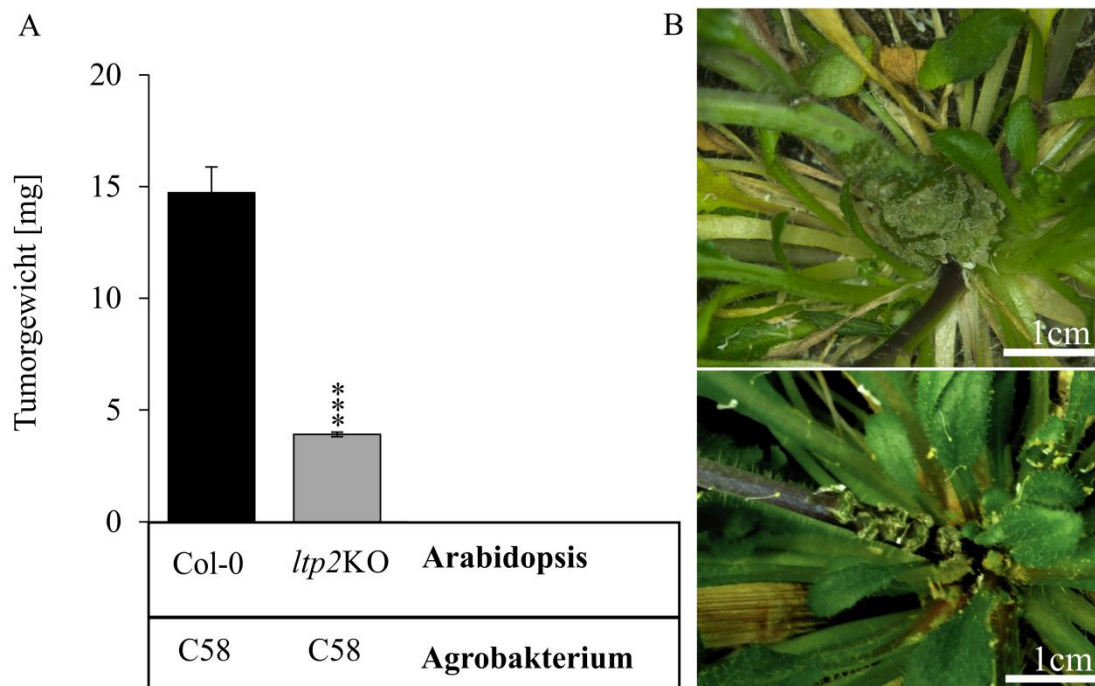
### 3.4. Die *LTP2*-T-DNA-Insertionsmutante (*ltp2KO*)

In einem nächsten Schritt sollte *in planta* die Auswirkung eines Verlusts von *LTP2*-Transkripten im Tumor untersucht werden. Grundlage für die Analysen bildet eine Pflanzenlinie mit einer T-DNA-Insertion im *LTP2*-Gen des Nottingham Arabidopsis Stock Centers (GK-639E08; NASC Stock-Nummer: N736747). Bei der geordneten Linie befindet sich die T-DNA-Insertion in der zweiten Hälfte des ersten Exons des *LTP2*-Gens (**Abbildung 19 A**). Anschließende Transkriptionsanalysen wurden durchgeführt, um die Effektivität der T-DNA-Insertion in Bezug auf die *LTP2*-Gen-Expression zu ermitteln. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Messungen können in der untersuchten T-DNA-Insertions-Linie keine *LTP2*-Transkripte detektiert werden (**Abbildung 19 B**). Im Gegensatz zu *LTP2* ist die Transkription des *LTP1*-Gens (At2g38540) in Blättern der T-DNA-Insertions-Linie fast zweifach im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Col-0; **Abbildung 19 B**). Homozygote Pflanzen mit einer T-DNA-Insertion in beiden Allelen (*ltp2KO*) werden für alle folgenden Studien verwendet.



### 3.4.1. Tumorbildung an *ltp2*KO-Pflanzen

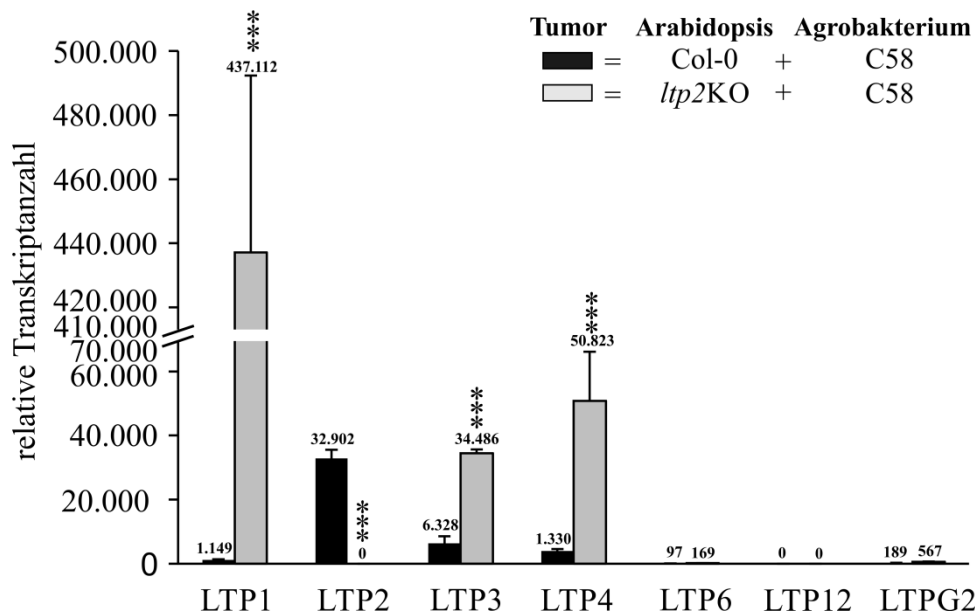
Zwischen *ltp2*KO-Pflanzen und dem Wildtyp kann kein morphologischer Unterschied beobachtet werden. Da die Expressionsanalysen (qRT-PCR, Histochemie) ergaben, dass die Expression von *LTP2* in Tumoren von *Arabidopsis* stark induziert ist, stellt sich die Frage, ob ein *LTP2*-Verlust einen Effekt auf das Tumorstadium hat. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die *ltp2*KO-Mutante sowie der Wildtyp (Col-0) mit dem onkogenen *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58 infiziert. Die Quantifizierung der Tumorgewichte 28 Tagen nach der Infektion zeigt, dass die Tumore der *ltp2*KO-Pflanzen signifikant kleiner sind, als die Tumore des Wildtyps (Col-0; **Abbildung 20 A & B**). Eine makroskopische Untersuchung der Tumore an *ltp2*KO-Pflanzen und dem Wildtyp führt zu keinen morphologischen Unterschieden (**Abbildung 20 B**).



**Abbildung 20** Effekte des *LTP2*-Verlusts auf das Wurzelhalsgallenwachstum an *Arabidopsis thaliana*. (A) Tumorgewichte in mg von Col-0 und *ltp2*KO-Pflanzen nach Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) an der Basis der Infloreszenzachse. Eines aus drei vergleichbaren Experimenten ist gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ SA. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels Student's t-Test: \*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ . (B) Morphologie von durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) induzierten Tumoren an dem Wildtyp (Col-0) und an der Mutante *ltp2*KO.



Von den Mitgliedern der LTP<sub>1</sub>-Familie (*LTP1*, *LTP2*, *LTP3*, *LTP4*, *LTP6*, *LTP12*) und *LTPG2* wurden Transkript-Analysen im Tumorgewebe durchgeführt. *LTP2* ist in mit *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) induzierten Tumoren an *Arabidopsis thaliana* (Col-0) am stärksten exprimiert, gefolgt von *LTP3*, *LTP4* und *LTP1*. Nur geringe Transkriptanzahlen weisen *LTP6* und *LTPG2* auf, während keine Transkripte *LTP12* zu detektieren sind (**Abbildung 21**). In Tumoren von *ltp2KO*-Pflanzen, die durch C58 induziert wurden, können keine *LTP2*-Transkripte gemessen werden. Dafür ist stattdessen die Transkriptanzahl von *LTP1*, des nächsten Homologes zu *LTP2*, im Vergleich zum Wildtyp-Tumor 380-fach erhöht. Zusätzlich ist die Transkription von *LTP3* fünffach und von *LTP4* zwölffach induziert (**Abbildung 21**). Es lässt sich zusammenfassen, dass der Tumor der Mutante (*ltp2KO*), trotz stark erhöhter Transkription der nächsten Verwandten von *LTP2*, im Vergleich zum Wildtyp-Tumor deutlich kleiner ist. Der Verlust der *LTP2*-Transkripte kann nicht durch den Anstieg der Transkripte nächster verwandter LTPs kompensiert werden.



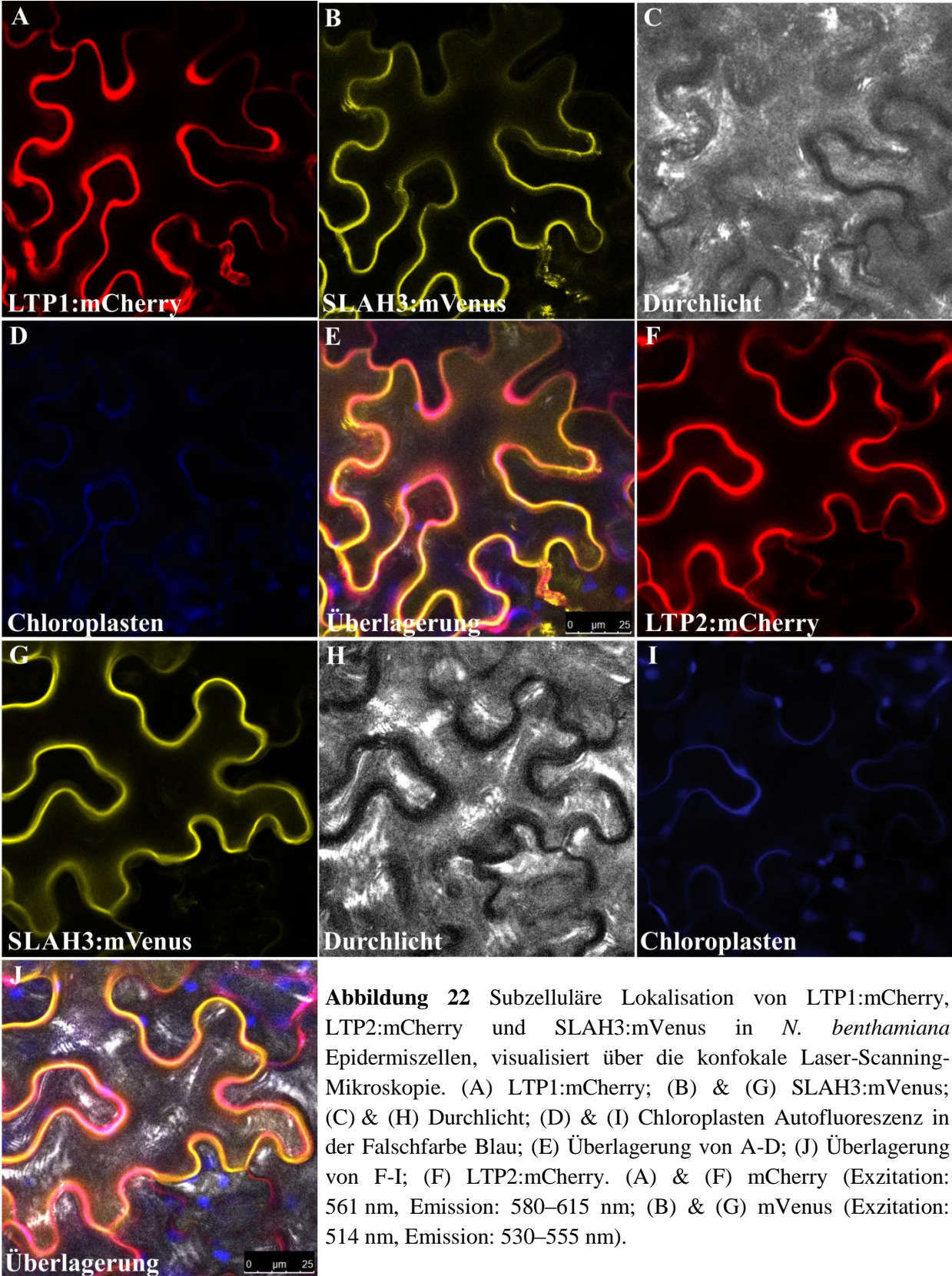
**Abbildung 21** Transkript-Anzahl von *LTP*-Genen in *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) induzierten Tumoren an *Arabidopsis thaliana* (Col-0) oder *ltp2KO*. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SA der auf 10.000 Transkripte *ACT2/8* normalisierten *LTP*-Transkriptanzahl. Insgesamt wurden vier bis fünf Proben mit jeweils zehn Tumoren eingesetzt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels des Student's t-Tests: \*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ .

### 3.5. Subzelluläre Lokalisation von LTP2 im Vergleich zu LTP1

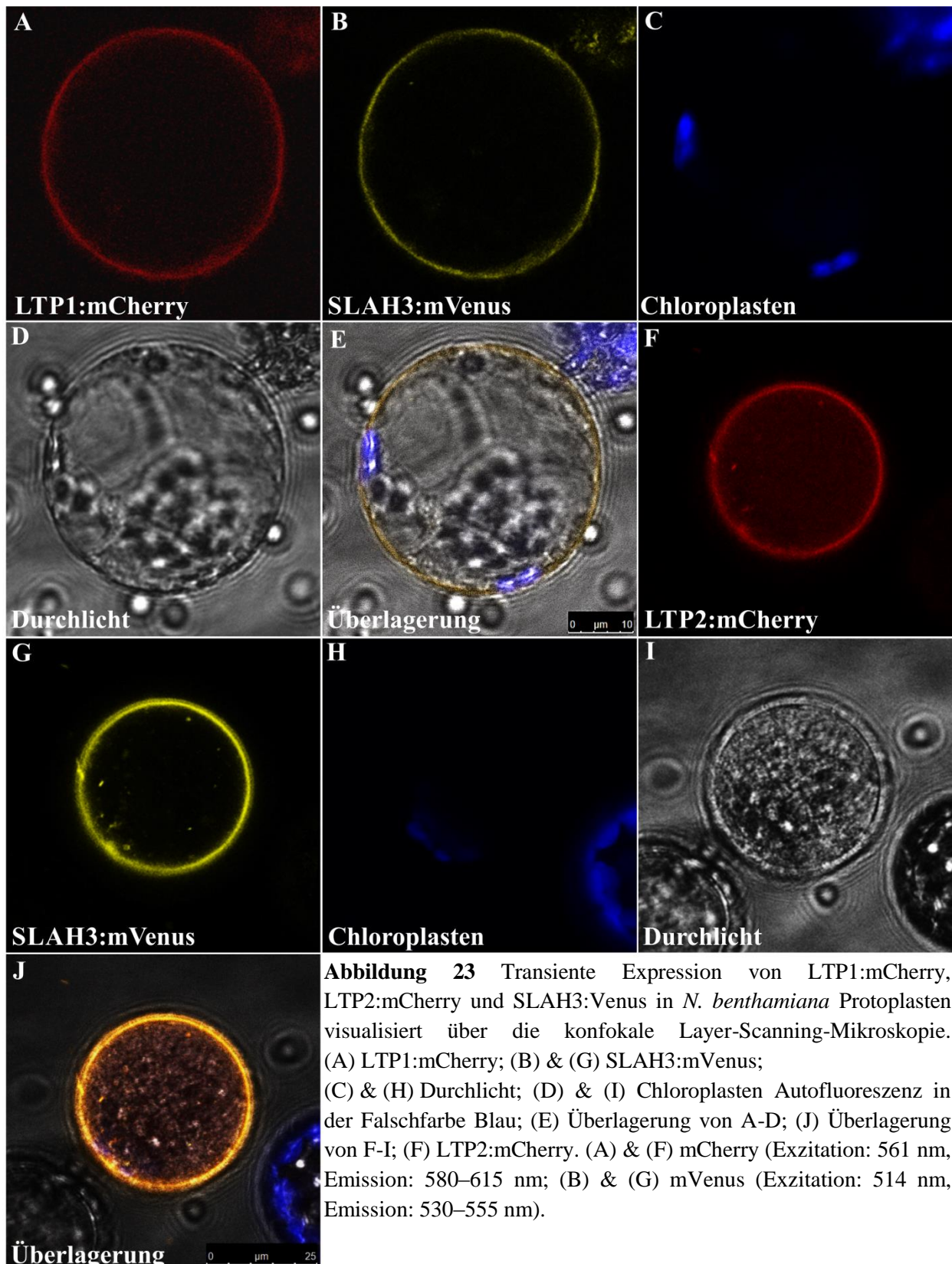
Wenn die *LTP2*-Gen-Expression einen positiven Effekt auf das Tumorwachstum ausübt, welche Funktion besitzt das Protein dann im Tumor? Sollte LTP2, wie die histochemischen Promotoraktivitäts-Analysen implizieren, an Zellwand-Modifikations-Prozessen beteiligt sein, so wäre eine Lokalisation des Proteins in der Zellwand zu erwarten. Das nächste Homolog zu LTP2, LTP1 ist in der Zellwand lokalisiert (Thoma et al., 1993).

Zur subzellulären Lokalisation wurde am 3'-Terminus der *LTP2*-Nukleotidsequenz die für das rot-fluoreszierende Reporterprotein mCherry kodierende Sequenz (engl.: „*coding sequence*“; CDS) fusioniert. Die ebenfalls mit mCherry fusionierte CDS von *LTP1* dient als Zellwandmarker. Außerdem fungierte das transmembrane Protein SLAH3 (**SLAC1** **homologue 3**; At5g24030), welches an seinem C-terminalen Ende mit dem gelb-fluoreszierenden Reporterprotein mVenus fusioniert ist, als Marker für die Plasmamembran. Für die Lokalisationsstudien wurden die LTP1:- bzw. LTP2:mCherry-Fusionsproteine jeweils mit dem Plasmamembranmarker SLAH3:mVenus in *Nicotiana benthamiana* Blätter koinfiltriert (**2.9.4.**; **Anhang Abbildung 7**, **Anhang Abbildung 8**). Die transiente Expression der Fusionsproteine in den epidermalen Zellen wurde mittels der konfokalen **Laser-Scanning-Mikroskopie** (engl.: *confocal laser scanning microscopy*; CLSM; nach engl. *to scan*: rastern; **2.9.4.**) analysiert.

Die Koinfiltrationen von LTP1:mCherry mit SLAH3:mVenus zeigt deutlich, dass die Fluoreszenz beider Fusionsproteine zumindest partiell überlagert. Obwohl eine Lokalisation von LTP1 in der Zellwand bekannt ist (Thoma et al., 1993), könnte das LTP1-Fusionsprodukt auch in der Plasmamembran lokalisiert sein (**Abbildung 22 A-E**). Die transiente Expression des Fusionsproduktes von LTP2:mCherry in epidermalen Zellen von *Nicotiana benthamiana* zeigt, ebenso wie für LTP1, eine partielle Überlagerung mit dem Fluoreszenz-Signal von SLAH3:mVenus und impliziert ebenfalls eine plasmamembranständige Lokalisation (**Abbildung 22 F-J**). Bedingt durch die unzureichende Auflösung des Mikroskops ist eine klare Unterscheidung zwischen Plasmamembran und Zellwand nicht möglich. Um dennoch zwischen Plasmamembran oder Zellwand differenzieren zu können, wurden aus den transformierten *N. benthamiana* Epidermiszellen Protoplasten hergestellt (**2.1.11.**). Ebenso wie die Tabak Epidermiszellen wurden auch die Protoplasten im LSM analysiert.

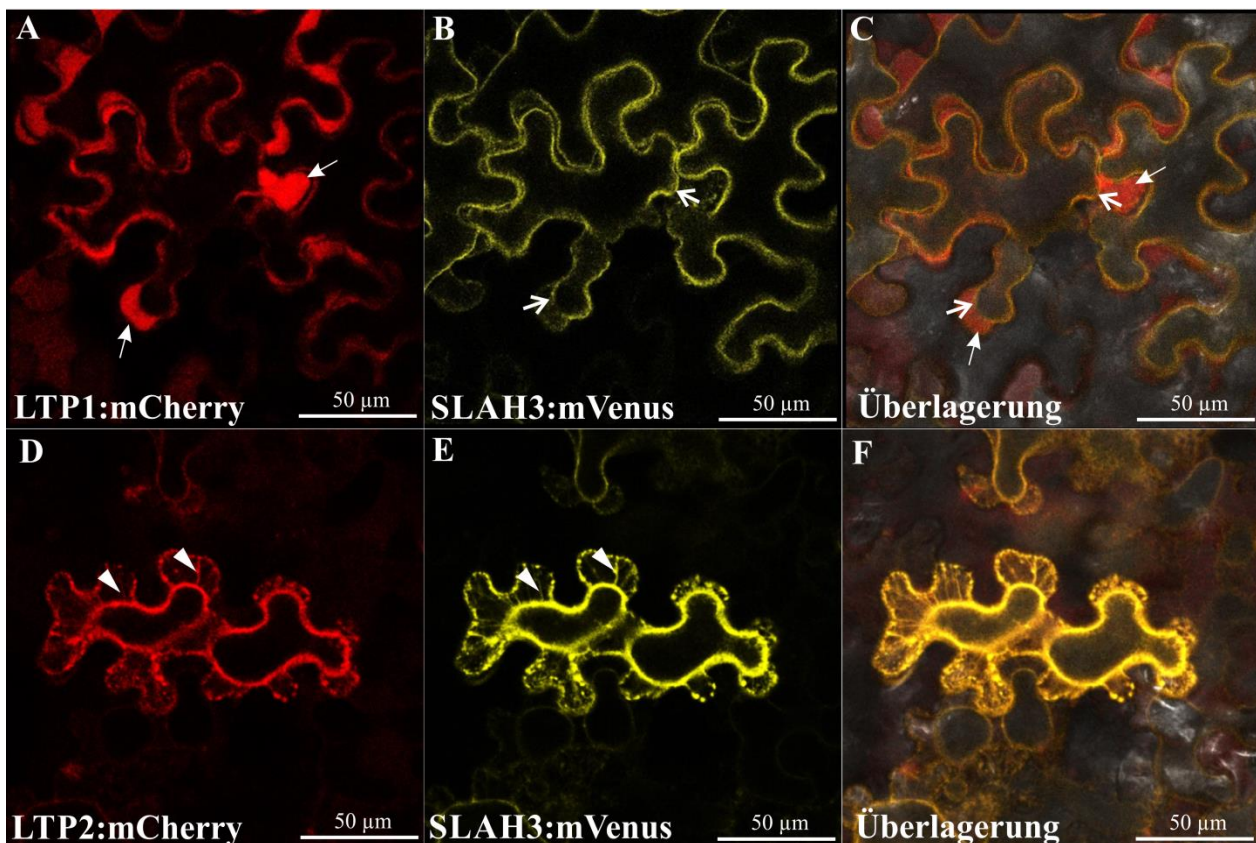


**Abbildung 22** Subzelluläre Lokalisation von LTP1:mCherry, LTP2:mCherry und SLAH3:mVenus in *N. benthamiana* Epidermiszellen, visualisiert über die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. (A) LTP1:mCherry; (B) & (G) SLAH3:mVenus; (C) & (H) Durchlicht; (D) & (I) Chloroplasten Autofluoreszenz in der Falschfarbe Blau; (E) Überlagerung von A-D; (J) Überlagerung von F-I; (F) LTP2:mCherry. (A) & (F) mCherry (Exzitation: 561 nm, Emission: 580–615 nm; (B) & (G) mVenus (Exzitation: 514 nm, Emission: 530–555 nm).



Protoplasten der transient transformierten *N. benthamiana* Blättern zeigen, ebenso wie die Epidermiszellen (**Abbildung 23**), ein deutliches Fluoreszenzsignal für LTP1:mCherry sowie SLAH3:mVenus in der Plasmamembran (**Abbildung 23 A-E**). Auch eine Koinfiltration von

LTP2:mCherry mit SLAH3:mVenus offenbart ein kolokalisiertes Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran. Um dennoch eine deutliche Unterscheidung zwischen Plasmamembran- und Zellwand-Lokalisation zu ermöglichen, wurden die Tabak Epidermis-Zellen mit 1 M  $\text{KNO}_3$  zur Induktion der Plasmolyse behandelt. Es zeigt sich zehn Minuten nach dem Einsetzen der Plasmolyse, dass LTP1:mCherry nicht mit dem Plasmamembran-Marker SLAH3:mVenus kolokalisiert. Besonders in Arealen, an denen sich die Plasmamembran deutlich von der Zellwand ablöst und sogenannte Hechtsche Fäden gebildet werden, ist die Expression des roten LTP1:mCherry Fluorophors in der Zellwand sichtbar (**Abbildung 24 A-C**). Des Weiteren wird veranschaulicht, dass LTP2:mCherry mit SLAH3:mVenus kolokalisiert (**Abbildung 24 D-F**). Die Plasmamembran Lokalisation von LTP2:mCherry ist besonders innerhalb der Hechtschen Fäden zu erkennen (**Abbildung 24 E**).



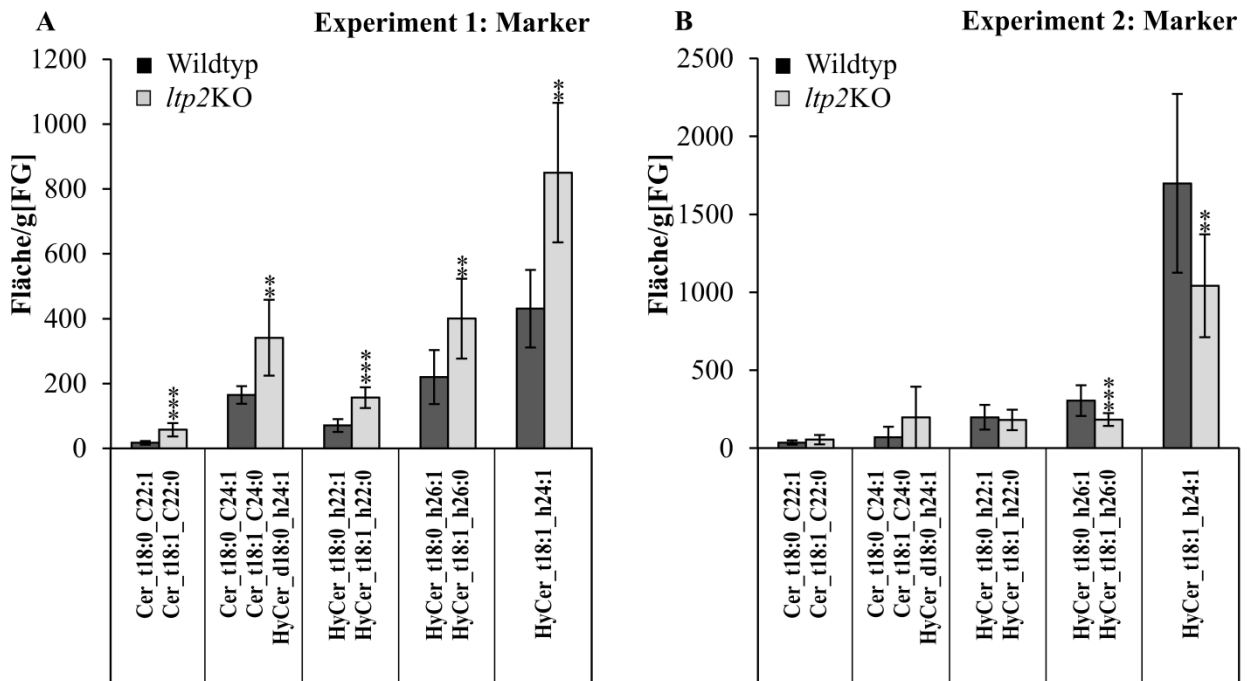
**Abbildung 24** Plasmolyse nach transienter Expression von LTP1:mCherry, LTP2:mCherry und SLAH3:mVenus in *N. benthamiana* Blättern, visualisiert über die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. (A) LTP1:mCherry in der Zellwand; (B) & (C; E, F) SLAH3:mVenus in der Plasmamembran; (C) Überlagerung von A-B im Durchlicht; (D) LTP2:mCherry in der Plasmamembran; (F) Überlagerung von (D-E) im Durchlicht; (F). (A) & (D) mCherry (Exzitation: 561 nm, Emission: 580–615 nm; (B) & (E) mVenus (Exzitation: 514 nm, Emission: 530–555 nm). Dokumentation 10 min nach der Plasmolyse, induziert mittels 1 M  $\text{KNO}_3$ . →:Zellwand; ⇨: Plasmamembran; ▶: Hechtsche Fäden.

Die subzellulären Lokalisationsanalysen mittels transienter Expression von LTP1 bzw. LTP2 mit Fluorophoren zeigen deutlich eine Lokalisation von LTP1 in der Zellwand und von LTP2 in der Plasmamembran. Eine Transmembrandomäne – oder eine Ankerstruktur zur Assoziation an die Plasmamembran besitzt das LTP2-Protein nicht (Boutrot et al, 2008).

### 3.6. Ungerichtete Lipid-Analyse von *ltp2KO*: Veränderungen des Ceramid-Musters

Bereits im Jahr 1996 wurde von Kader postuliert, dass LTPs Lipide zwischen Membranen transferieren (Kader et al., 1996). Die Lokalisation von LTP2 an der Plasmamembran kann ein Indiz auf einen potentiellen durch LTP2 vermittelten Lipidtransfer zum bzw. innerhalb des Apoplasten sein. Um zu erfahren, ob LTP2 *in vivo* an solch einen Lipidtransfer beteiligt ist bzw. welche Lipide LTP2 transferieren könnte, wurde mittels UPLC-MS eine ungerichtete Lipid-Analyse von Blättern der *ltp2KO* Linie durchgeführt (**2.10.1.**). Aus jeweils fünf Lipidextraktionen von den *ltp2KO*-Pflanzen wurden im Vergleich zum Wildtyp (Col-0), Lipidverbindungen sogenannte Marker ermittelt, die in den *ltp2KO* Pflanzen reduziert oder erhöht sind. Diese Experimente wurden dreifach mit jeweils fünf Lipidextrakten für den Wildtyp bzw. für die Mutante wiederholt, wobei stets die gleichen Lipidverbindungen als Marker identifiziert werden konnten.

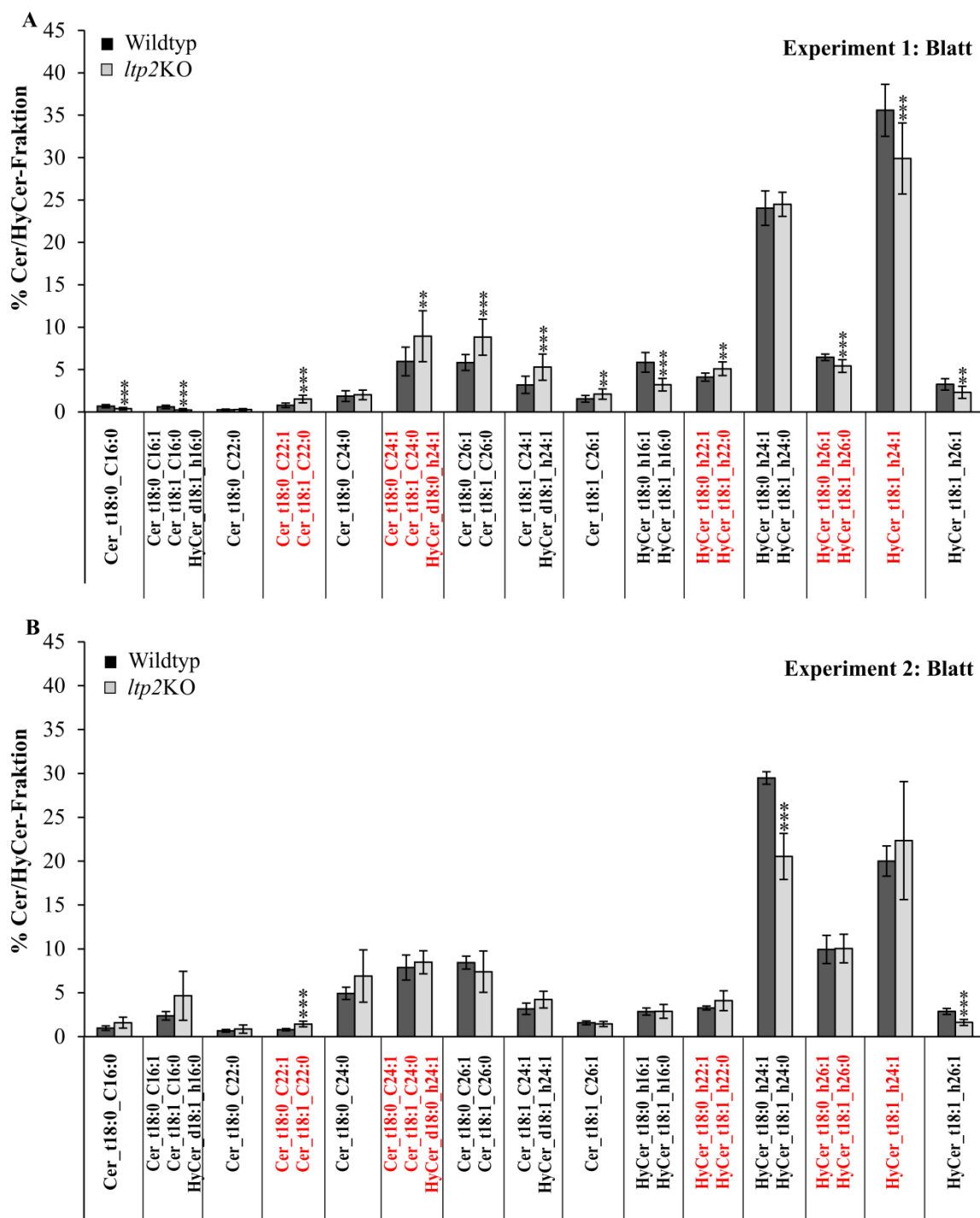
Die jeweiligen Lipid-Spezies wurden schließlich über Fragmentationsanalysen und basierend auf den spezifischen Masse-zu-Ladung-Verhältnissen (*m/z*-Verhältnisse) analysiert und als Ceramide, eine Untergruppe der Sphingolipide, identifiziert (**Anhang Tabelle 8; 2.10.1.2.**). Bezogen auf die Fläche des Signals ergeben sich die beiden mehrfach bestätigten Marker HyCer\_t18:0\_h24:1 und HyCer\_t18:0\_h26:1/HyCer\_t18:1\_h26:0. Allerdings ist z.B. in Experiment 1 die Menge an HyCer\_t18:0\_h24:1 um 79,5% erhöht, in Experiment 2 allerdings um 42,5% reduziert (**Abbildung 25 A & B**). Ähnliches zeigt sich für die Verbindungen HyCer\_t18:0\_h26:1/HyCer\_t18:1\_h26:0, welche im ersten Experiment um 47,7% erhöht und im zweiten Experiment um 58,3% reduziert ist. Andere Marker des ersten Experiments, wie Cer\_t18:0\_C22:1/Cer\_t18:1\_C22:0, Cer\_t18:0\_C24:1/Cer\_t18:1\_C24:0/HyCer\_d18:0\_h24:1 und HyCer\_t18:0\_h22:1/HyCer\_t18:1\_h22:0 (erhöht um: 257,7%; 329,47% bzw. 61,1%) konnten in den folgenden Experimenten nicht bestätigt werden (**Abbildung 25 A & B**).



**Abbildung 25** Ceramid Zusammensetzung von zwölf Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern von *ltp2KO* und dem Wildtyp Col-0. Dargestellt sind die Mittelwerte der Signal-Flächen von jeweils fünf Lipidextrakten  $\pm$  SA zweier unabhängiger Experimente (A) und (B). Die Signifikanzberechnungen basieren auf den Student's t-Test:\*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ . Die UPLC-MS-Messungen wurden von Dr. A. Fekete (Julius-von-Sachs-Institut; Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

Um ein deutlicheres Bild über die Veränderungen innerhalb des Ceramid-Pools in Blättern von *ltp2KO* im Vergleich zum Wildtyp zu erhalten, wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Ceramide innerhalb der zugehörigen Ceramid-Fraktion ermittelt werden.

In allen Experimenten ist in den Blattproben die Menge der Marker HyCer\_t18:0\_h22:1/HyCer\_t18:1\_h22:0 (ca. 80-90%) erhöht, sowie des Hydroxyceramids HyCer\_t18:1\_h26:1 signifikant erniedrigt (ca. 30-40%) (**Abbildung 26**). Bis auf diese drei Verbindungen kann in den drei unabhängigen Experimenten aus jeweils fünf Blatt-Lipidextrakten des Wildtyps bzw. der Mutante (*ltp2KO*) kein einheitliches, signifikantes Muster der Erhöhung bzw. Reduktion bestimmter Ceramide ermittelt werden (**Abbildung 26**). Anfänglich bestimmte weitere Marker, wie Cer\_t18:0\_C24:1/Cer\_t18:1\_C24:0/HyCer\_d18:0\_h24:1 und HyCer\_t18:0\_h22:1/ HyCer\_t18:1\_h22:0 waren nur im ersten Experiment signifikant erhöht.



**Abbildung 26** Ceramid Zusammensetzung von zwölf Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern von *ltp2KO* und dem Wildtyp (Col-0). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SA zweier unabhängiger Experimente (A) und (B). Die Signifikanzberechnungen basierten auf den Student's t-Test:\*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ . Die UPLC-MS-Messungen wurden von Dr. A. Fekete (Julius-von-Sachs-Institut; Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.



Waren z.B. die Marker HyCer\_t18:0\_C26:1/HyCer\_t18:1\_C26:0 und HyCer\_t18:1\_C24:1 im ersten Experiment signifikant reduziert (**Abbildung 26 A**) bleiben diese Verbindungen im zweiten unabhängigen Ansatz aus Blatt-Lipidextrakten in der Mutante (*ltp2KO*) im Vergleich zum Wildtyp mengenmäßig unverändert (**Abbildung 26 B**).

Die ungerichtete Lipidanalyse zeigt in drei unabhängigen Experimenten Veränderungen in den Verbindungsklassen der Ceramide bzw. Hydroxyceramide. Keine andere pflanzliche Lipidverbindung weist in der Mutante in allen drei Probensätzen signifikante Veränderungen auf. Mit Ausnahme der Erhöhung der Menge an HyCer\_t18:0\_h22:1/HyCer\_t18:1\_h22:0 und der Erniedrigung der Menge an HyCer\_t18:1\_h26:1 ist jedoch kein einheitliches Muster zu erkennen. Folglich lässt sich durch die ungerichtete Lipidanalyse nicht eindeutig klären welche Lipide *LTP2 in planta* transferieren könnte. Augenscheinlich ist nur, dass durch die Reduktion der *LTP2*-Transkripte das Ceramid-Muster in Blättern von Arabidopsis beeinflusst wird.

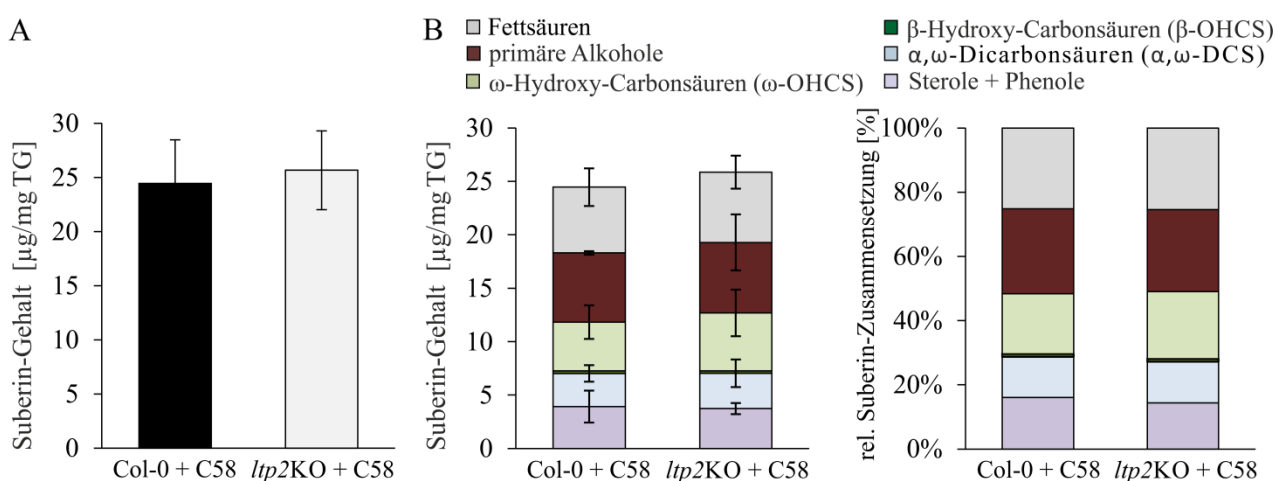
### 3.7. Suberinanalysen im Tumorgewebe

Auf Basis der ungerichteten Lipidanalyse von Rosettenblättern der Mutante (*ltp2KO*) im Vergleich zum Wildtyp (Col-0) ließ sich nicht deutlich erkennen welche Verbindungen *LTP2* transferieren könnte (**3.6**). Allerdings muss *LTP2* eine prominente Rolle bei der Entwicklung von Tumoren spielen (**3.5.3**), denn bei einem Verlust der *LTP2*-Transkripte bilden sich kaum noch Tumore. Da zudem die Wurzelhalsgallentumore keine Cuticula besitzen, sondern die Zellwände der äußeren Tumorschichten zum Schutz vor Wasserverlust suberinisiert sind, wurde der Gehalt und die Zusammensetzung des Suberins von Tumoren mittels Gas-Chromatographie (GC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS) analysiert. Wenn *LTP2* am Transport von Suberin-Monomeren zum Apoplasten beteiligt sein sollte, wären bei einem *LTP2*-Verlust Unterschiede in der Zusammensetzung des Suberins von Tumoren zu erwarten.

Im Fokus der vorliegenden Analysen steht die Zusammensetzung des Suberins von durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) induzierten Wurzelhalsgallen an *ltp2KO* und dem Wildtyp (Col-0). Um von vornherein eine Kontamination mit wachsartigen aliphatischen Verbindungen auszuschließen, wurden die Tumore vor der Suberin-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gewaschen.

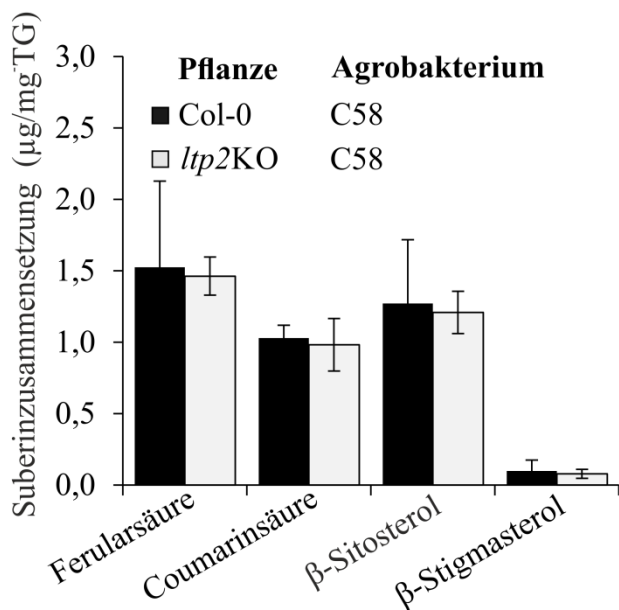
Diese Analysen zeigen deutlich, dass ein *LTP2*-Verlust keinerlei Auswirkungen auf den Gesamtgehalt des Suberins von Tumoren hat (**Abbildung 27 A**). Ein genaueres Bild liefert die

Aufteilung der einzelnen Stoffklassen innerhalb des Suberins von Tumoren (**Abbildung 27 B**). So beträgt z.B. der Fettsäureanteil im Suberin von Tumoren des *Arabidopsis* Wildtyps (Col-0) ebenso wie in der *ltp2KO*-Mutante 25% (6,1 bzw. 6,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht). Auch der Anteil an Alkoholen mit 27% im Wildtyp und 25% in der Mutante unterscheidet sich kaum (je 6,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht).  $\beta$ -Hydroxy-Carbonsäuren ( $\beta$ -OHCS) sind in Wildtyp und Mutante mit einem Anteil von 1% vertreten,  $\omega$ -Hydroxy-Carbonsäuren ( $\omega$ -OHCS) mit 19 bzw. 21% (4,5 bzw. 5,4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht). Der Gehalt an  $\alpha$ ,  $\omega$ -Dicarbonsäuren ( $\alpha$ ,  $\omega$ -DCS) ist ebenso mit jeweils 13 % in der Mutante unverändert. Auch in der Menge an Sterolen und Phenolen lässt sich mit 16 bzw. 14 % kaum ein Unterschied erkennen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch in Bezug auf die Menge der einzelnen Stoffklassen, im Suberin von Tumoren der *ltp2KO*-Mutante keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp existieren (**Abbildung 27 B**).



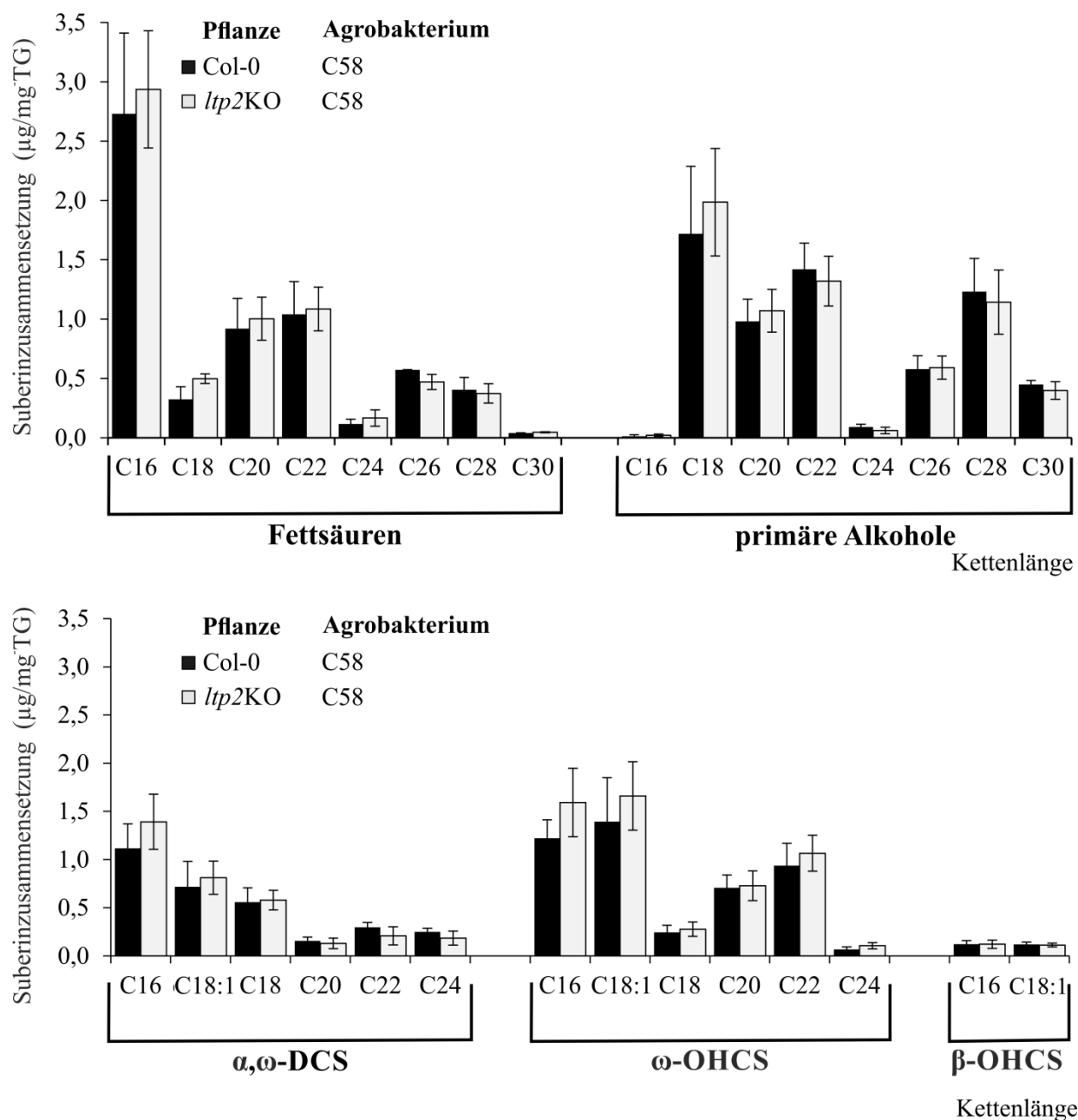
**Abbildung 27** Suberinanalyse von 21 Tage alten Tumoren an dem *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0), sowie der Mutante (*ltp2KO*) mit dem onkogenen Agrobakterien Stamm C58. (A) Gesamt-Suberin-Gehalt. (B) Absolute und relative stoffklassenspezifische Suberinzusammensetzung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SA aus einem von zwei vergleichbaren Experimenten mit Proben aus bis zu zehn Tumoren, wobei  $n=2$  für Wildtyp + C58;  $n=4$  für *ltp2KO* + C58. Signifikanzlevel Berechnung mittels Student's t-Tests: \*\*\*=  $p<0,01$ ; \*\*=  $p<0,05$ ; \*=  $p<0,1$ . TG: Trockengewicht. Die Suberinextraktion, GC-MS-Messungen sowie die quantitative und qualitative Analyse wurden von Dr. J. Leide (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

Um einen genaueren Einblick in mögliche Veränderungen der Menge der einzelnen Komponenten innerhalb der Stoffklassen Fettsäuren, primäre Alkohole,  $\omega$ -Hydroxy-Carbonsäuren,  $\beta$ -Hydroxy-Carbonsäuren,  $\alpha, \omega$ -Dicarbonsäuren, sowie primäre Alkohole zu erhalten, wurde die Suberin-Zusammensetzung der Tumore von Wildtyp (Col-0) und der Mutante *ltp2KO* im Detail analysiert. In Bezug auf die Menge an Aromaten und Phenole, wie Ferularsäure, Coumarinsäure,  $\beta$ -Sitosterol und  $\beta$ -Stigmasterol sind keinerlei Veränderungen zu messen (**Abbildung 28**).



**Abbildung 28** Aromatische und Phenolische Komponenten des Suberins von 21 Tage alten Tumoren am *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und der Mutante (*ltp2KO*), induziert über *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SA aus einem von zwei vergleichbaren Experimenten mit Proben aus bis zu zehn Tumoren, wobei  $n=2$  für Wildtyp + C58;  $n=4$  für *ltp2KO* + C58. Signifikanzlevel Berechnung mittels Student's t-Tests: \*\*\*=  $p<0,01$ ; \*\*=  $p<0,05$ ; \*=  $p<0,1$ . TG: Trockengewicht. Die Suberinextraktion, GC-MS-Messungen sowie die quantitative und qualitative Analyse wurden von Dr. J. Leide (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

Auch die Zusammensetzung des aliphatischen Suberins in Tumoren ohne *LTP2*-Transkripte war kaum verändert (**Abbildung 29**). Ein Verlust der *LTP2*-Transkripte führte im Suberin von Wurzelhalsgallen zu einer leicht aber nicht signifikant reduzierten Menge der  $C_{26}$ -Fettsäuren. Primäre Alkohole, Hydroxylierte Säurederivate, wie  $\omega$ - und  $\beta$ -hydroxylierte Carbonsäuren und  $\alpha, \omega$ -Dicarbonsäuren sind ebenso unverändert (**Abbildung 29**). Ein Verlust der *LTP2*-Transkripte hat folglich keinen Effekt auf die Zusammensetzung des Suberins von Tumoren.



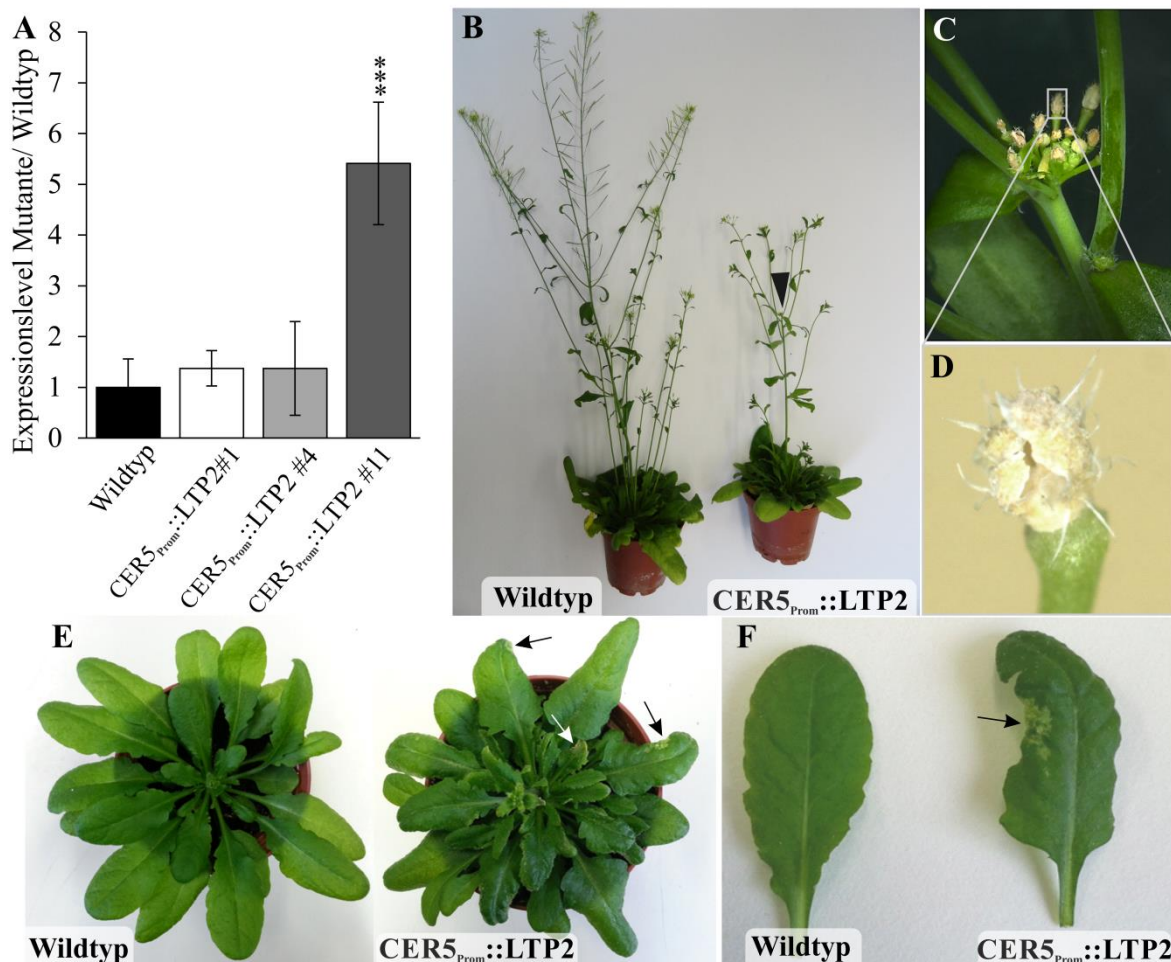
**Abbildung 29** Suberinanalyse von 21 Tage alten Tumoren an dem *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und der Mutante (*ltp2KO*), induziert durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58). Menge an aliphatischen Suberin-Monomeren, wie Fettsäuren, primären Alkoholen,  $\alpha, \omega$ -Dicarbonsäuren ( $\alpha, \omega$ -DCS);  $\omega$ -Hydroxy-Carbonsäuren ( $\omega$ -OHCS) und  $\beta$ -Hydroxy-Carbonsäuren ( $\beta$ -OHCS). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SA. Visualisiert ist eines aus zwei vergleichbaren Experimenten. Es gilt  $n=2$  für Wildtyp + C58;  $n=4$  für *ltp2KO* + C58. TG: Trockengewicht. Die Suberinextraktion, GC-MS-Messungen sowie die quantitative und qualitative Analyse wurden von Dr. J. Leide (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

### 3.8. Ektopische Expression von *LTP2* in der Epidermis: $CER5_{Prom}::LTP2$

Da die Analysen von Suberin und Rosettenblattlipiden der Mutante (*ltp2KO*) keinen deutlichen Hinweis auf die Funktion von *LTP2* *in planta* lieferten (3.6., 3.7.), sollten in einem nächsten Schritt Pflanzenlinien generiert werden, die sich durch eine erhöhte *LTP2*-Transkriptanzahl vom Wildtyp unterscheiden. Diese Pflanzen könnten, im Vergleich zur *ltp2KO*-Mutante, eine Erhöhung der Menge potentieller von *LTP2* transferierter Lipide besitzen.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit ist es nicht gelungen die *LTP2*-CDS unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors stabil in das *Arabidopsis thaliana* Genom zu integrieren. Möglicherweise ist die starke Expression von *LTP2* embryonal letal. Daher entstand der Gedanke *LTP2* unter der Kontrolle eines starken Arabidopsis-Promotors in einem Gewebe zu exprimieren, in dem *LTP2* sonst nicht, bzw. nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Der  $LTP2_{Prom}::GUS$ -Assay (3.2.1.) hatte gezeigt, dass der *LTP2*-Promotor nicht in Blattepidermiszellen aktiv war (Abbildung 13 G-H). Das Gen *Eceriferum 5* (*CER5*, *ABCG12*; At1g51500) wird in oberirdischen Organen, speziell in epidermalen Zellen, exprimiert. Das *CER5*-Protein ist ein ABC-Transporter (engl.: „*ATP binding cassette*“; ABC), der langkettige, aliphatische Wachsvorläufer über die Plasmamembran zum Apoplasten transportiert (Pighin et al., 2004). Dieser *CER5*-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* wurde verwendet, um *LTP2* ektopisch in epidermalen Blattzellen zu exprimieren. Die Generierung des Konstrukts (2.7.1.2.), die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (2.1.5.), sowie die Anzucht bis hin zu stabilen homozygoten Pflanzen der T<sub>3</sub>-Generation (2.1.2.) sind dem Material und Methoden-Teil zu entnehmen. Die erfolgreiche Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom wurde neben der Basta-Selektion mit PCR- überprüft (Anhang Tabelle 7; 2.7.1.2.). Für alle weiteren Studien wurden jeweils drei unabhängige Linien untersucht (#1, #4, #11). Echtzeit-PCR-Messungen der *LTP2*-Transkriptanzahlen von  $CER5_{Prom}::LTP2$  Rosettenblättern zeigen, dass Linie #11 ein fünffach erhöhtes *LTP2*-Gen-Expressionsniveau aufweist. Die beiden anderen untersuchten Linien (#1 und #4) besitzen im Vergleich zum Wildtyp nur eine zweifach erhöhte *LTP2*-Transkriptanzahl (Abbildung 30 A). In Abhängigkeit von der Transkriptanzahl lassen sich phänotypische Auffälligkeiten der  $CER5_{Prom}::LTP2$ -Pflanzen erkennen. Diese treten besonders bei Linie #11 in Erscheinung und sind in reduzierter Form auch bei den beiden Linien #1 und #4 erkennbar. Zu diesen Auffälligkeiten gehören: ein verzögertes Wachstum sowie reduzierte primäre Hauptinfloreszenzen mit fehlentwickelten Blütenständen (Abbildung 30 B & C). Die Blüten der ersten Infloreszenz sind oftmals von bräunlicher Farbe, besitzen viele lange Trichome und vertrockneten am Pedicellus bevor sie sich öffnen können (Abbildung 30 C & D). Dieser

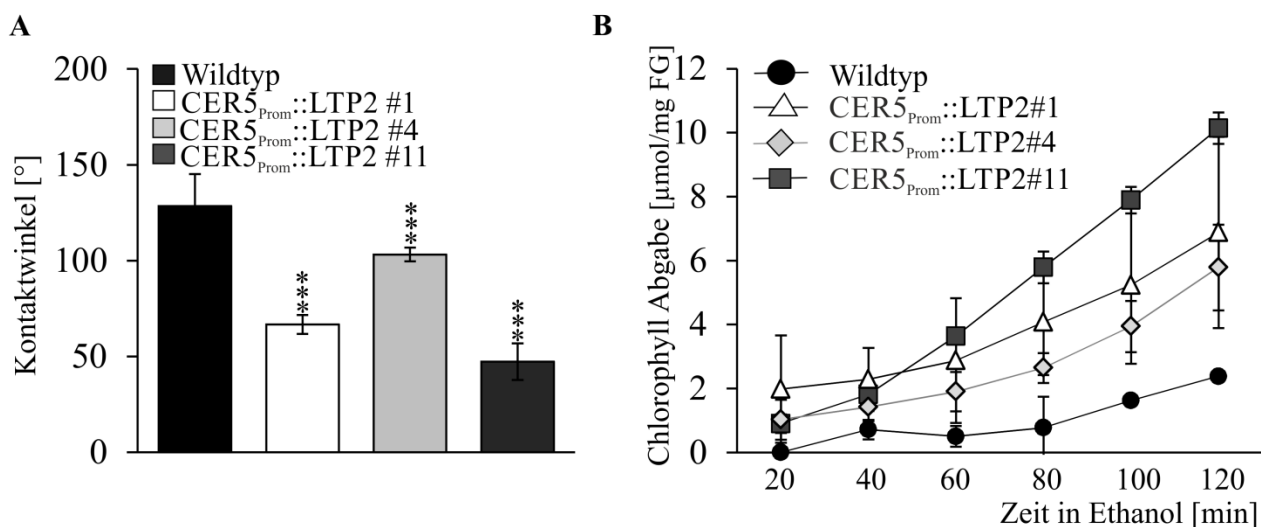
Phänotyp der  $CER5_{Prom}::LTP2$ -Pflanzen tritt sehr häufig in Linie #11, jedoch seltener in den Linien #1 und #4 auf. Des Weiteren können Auffälligkeiten in der Blattanatomie der Transgenen  $CER5_{Prom}::LTP2$  erkannt werden. Häufig sind die Blätter in abaxiale Richtung eingerollt und besitzen in der Peripherie braun-gelbliche Areale (**Abbildung 30 E**). Zudem sind Läsionen mit vermindertem Chlorophyll an den Blatträndern erkennbar. Die Pfeile in **Abbildung 30 E & F** deuten auf diese Form der Missbildungen.



**Abbildung 30** Effekte der ektopischen Expression von *LTP2* in epidermalen Zellen von *Arabidopsis thaliana*. (A) Verhältnisse der *LTP2*-Transkripte in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps (WS-2) zu transgenen  $CER5_{Prom}::LTP2$ -Linien (#1, #4, #11). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SA. Signifikanzberechnungen basieren auf dem Student's t-Test: \*\*\*=  $p < 0,01$ . (B) Habitus von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und  $CER5_{Prom}::LTP2$ . Die Pfeilspitze deutet auf die reduzierte erste Infloreszenz. (C) Vergrößerung von (B) mit Blütendeformation. (E) Rosette, sowie (F) Rosettenblatt acht Wochen alter *Arabidopsis thaliana* (WS-2), sowie transgener  $CER5_{Prom}::LTP2$ . Pfeile deuten auf Blattdeformationen.

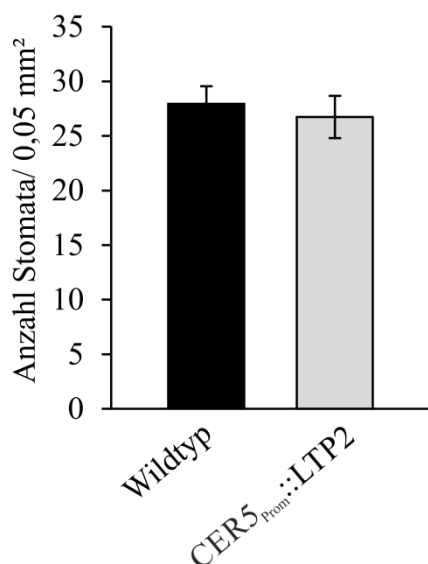
Diese Blattfehlbildungen treten bei allen drei Linien in Erscheinung – jedoch sind sie unterschiedlich stark ausgeprägt, sodass es auch transgene Pflanzen ohne Auffälligkeiten gibt. Blattfehlbildungen können ein Indiz für eine veränderte Zusammensetzung der Cuticula sein. Diese ist zudem oft begleitet von Veränderungen der Hydrophobizität der Blattoberflächen (Hauke & Schreiber, 1998). Aus diesem Grund wurde die Hydrophobizität der Rosettenblättern

des *Arabidopsis thaliana* Wildtyps und der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 über die Kontaktwinkelmethode bestimmt (Kasahara et al., 1993). Dazu wurden die Kontaktwinkel von destilliertem Wasser in Bezug zur Blattoberfläche gemessen (2.10.1.). Der Kontaktwinkel der Wassertropfen auf *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Blättern ist im Mittel circa 130° groß, der Kontaktwinkel auf den transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#1 beträgt 67°, auf CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#4 103° und auf CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11 47°. Somit lässt sich beginnend mit dem Wildtyp zu CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#4 gefolgt von CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#1 bis hin zu CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11 eine Reihe absteigender Hydrophobizität der Rosettenblatt-Oberflächen feststellen (Abbildung 31 A). Diese Reihe korrelierte mit der Transkriptanzahl von LTP2. Je mehr LTP2-Transkripte im Blatt gemessen werden, desto hydrophiler sind die Rosettenblatt-Oberflächen (Abbildung 30 A).



**Abbildung 31** Oberflächeneigenschaften von CER5<sub>Prom</sub>::LTP2. (A) Kontaktwinkelmessung von einem 1 µl Wassertropfen auf acht Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (WS-2) und transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 Rosettenblättern (#1, #4, #11). Dargestellt sind Mittelwerte ±SA. Signifikanzlevel wurden mittels des Student's t-Tests ermittelt: \*\*\*= p<0,01; \*\*= p<0,05; \*= p<0,1. (B) Chlorophyll-Leaching-Assay (engl.: „to leach“ = auswaschen) von acht Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und den transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 Rosettenblättern (WS-2; #1, #4, #11). Dargestellt sind Mittelwerte ±SA.

Die kleineren Kontaktwinkel der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien im Vergleich zum Wildtyp lassen auf eine hydrophilere Blattoberfläche der transgenen Pflanzen schließen. Die Ursache können Veränderungen der Zusammensetzung der Cuticula sein. Um weiteren Indiz dafür zu sammeln, wurde in einem nächsten Schritt die Permeabilität der Cuticula gemessen. Diese wurde mit Hilfe des sogenannten Chlorophyll-Leaching-Assays (engl.: „to leach“=auswaschen)

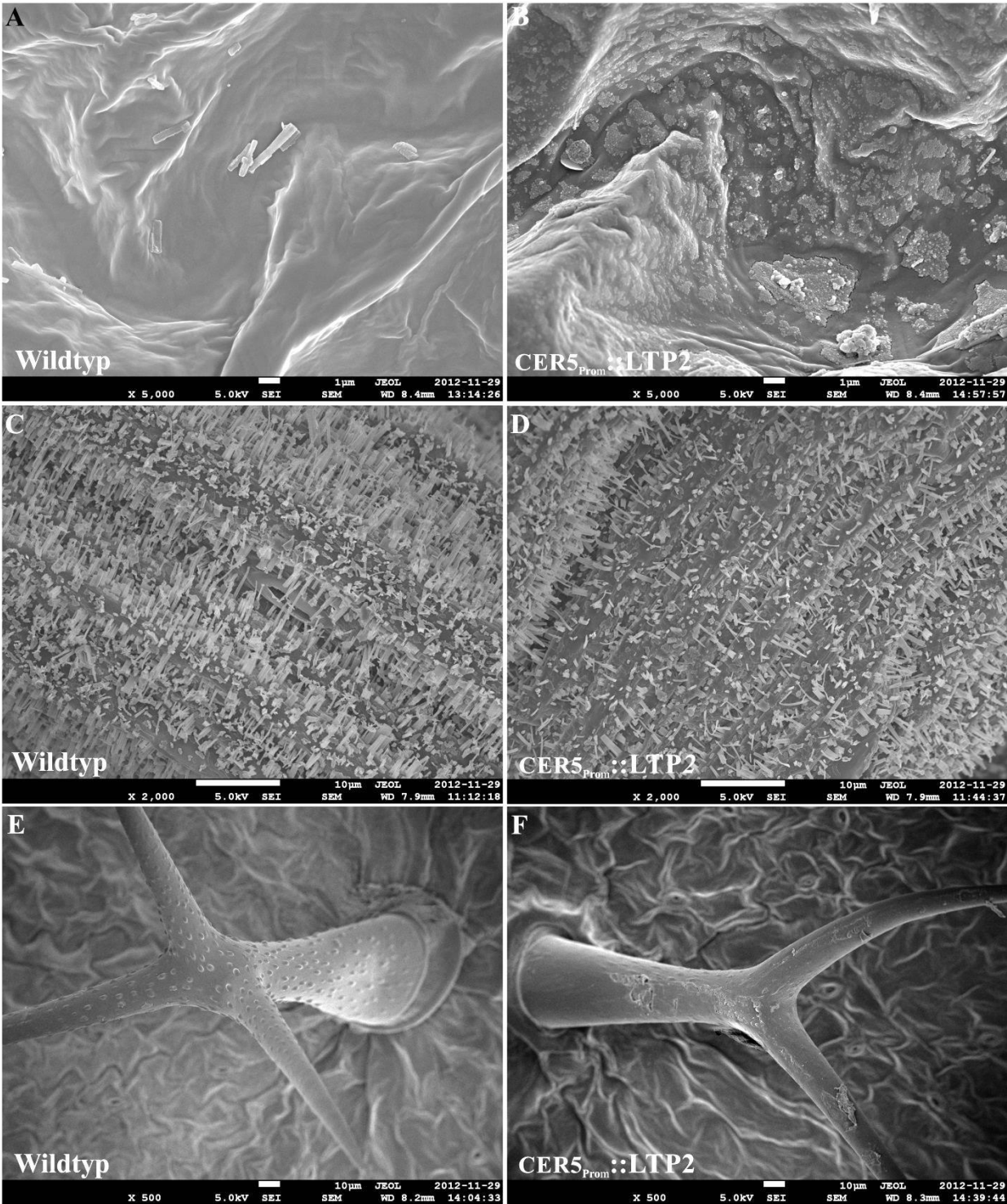


**Abbildung 32** Anzahl der Stomata in acht Wochen alten Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (WS-2) und transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 pro 0,05 mm<sup>2</sup>. Ausgezählt wurden zehn Blätter pro Pflanze bei drei Pflanzen pro Linie. Dargestellt sind Mittelwerte ± SA.

dass dieser Effekt nicht mit einer Zunahme der Anzahl an Stomata in Verbindung steht, wurden diese auf der abaxialen Seite von acht Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern, sowie den transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien ausgezählt. Wie **Abbildung 32** verdeutlicht, bestehen keine Unterschiede in der Stomata-Dichte von Wildtyp und transgenen Linien. Um einen tieferen Einblick in die Struktur der Cuticula von den transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien zu erhalten, wurden Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der Blattoberflächen angefertigt. Die Blattoberfläche von *Arabidopsis thaliana* (WS-2) Rosettenblättern ist glatt und besitzt kaum epicuticuläre Wachskristalle (**Abbildung 33 A**).

bestimmt. Grundlage des Assays ist das Auswaschen von Chlorophyll aus Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* mit 70%igem Ethanol (**2.10.1**). Aus allen drei transgene CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien kann das Chlorophyll im Vergleich zum Wildtyp schneller isoliert werden (**Abbildung 31 B**). Dies bedeutet, dass die Cuticulae der transgenen Pflanzen stärker permeabel für Ethanol sind, als die Cuticula des Wildtyps. Erneut ergibt sich eine Korrelation zwischen Anzahl an *LTP2*-Transkripten und der Durchlässigkeit der Cuticula. Je mehr *LTP2*-Transkripte gemessen werden, desto durchlässiger ist die Cuticula. Die Linie CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11 besitzt z.B. im Durchschnitt in Blättern 6 x mehr Transkripte *LTP2* und zeichnet sich zudem durch die größte Cuticula-Durchlässigkeit aus. Die Durchlässigkeit der Cuticula der transgenen Linie #1 und Linie #4 liegt zwischen der von Linie #11, mit der größten und dem Wildtyp mit der geringsten Cuticula-Durchlässigkeit (**Abbildung 31 A & B**). Um zu beweisen,





**Abbildung 33** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Arabidopsis thaliana* CER5<sup>Prom::LTP2</sup> (A, C, E), sowie dem Wildtyp (WS-2; C, D, F). (A) & (B) adaxiale Blattoberfläche eines acht Wochen alten Rosettenblattes. (B) & (C) Stängel. (E) & (F) Trichom eines acht Wochen alten Rosettenblattes.

Alle drei CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien besitzen hingegen Areale mit Anhäufungen von plättchenähnlichen Kristallen, die unregelmäßig auf der Blattoberfläche verteilt sind (**Abbildung 33 A-B**). Zudem kann eine geringere Anzahl an röhrenförmigen Wachskristallen auf der Stängel-Oberfläche der CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (**Abbildung 33 C-D**). Außerdem besitzen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Pflanzen auffällig viele einfach verzweigte Trichome ohne Papillen (**Abbildung 33 E-F**).

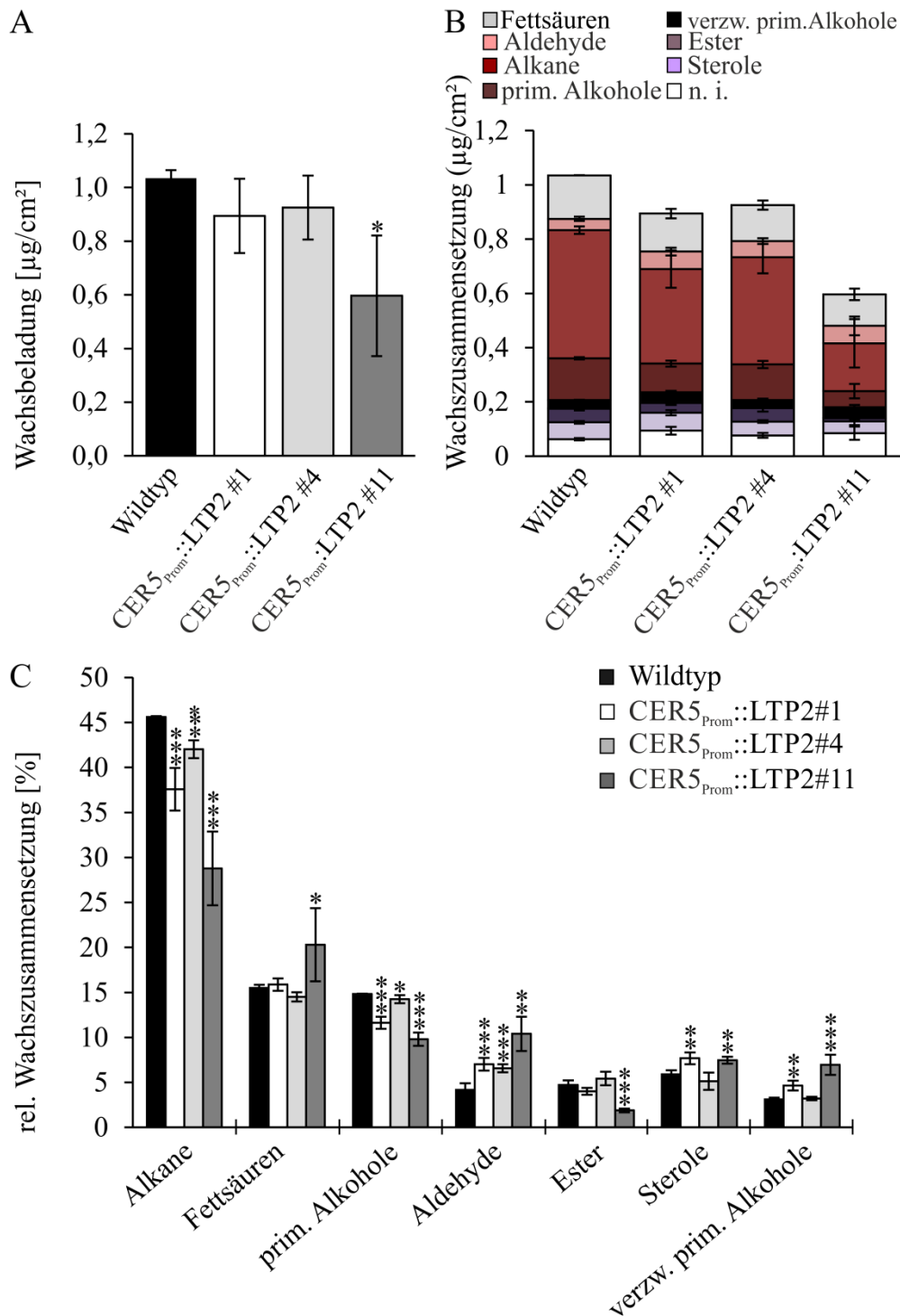
Analysen der Anzahl der Trichom-Verzweigungspunkte der drei untersuchten transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien, sowie des Wildtyps (WS-2) zeigen, dass der Wildtyp nur 29% einfach verzweigte Trichome besitzt - wohingegen 54% der Trichome in CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11, 44% in Linie #1 und 42% in Linie #4 einfach verzweigt sind (**Tabelle 14**). Die Reduktion der Trichom-Verzweigungspunkte in CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 korreliert mit der Zunahme der *LTP2*-Transkriptanzahl (**Abbildung 31 A**).

**Tabelle 14** Anzahl an Trichom-Verzweigungspunkten auf *Arabidopsis thaliana* Blattoberflächen der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2, sowie des Wildtyps (WS-2)

Allele	Anzahl an Verzweigungspunkten <sup>a</sup>			Anzahl an gezählten Trichomen
	0	1	2	
Wildtyp (WS-2)	-	29	71	508
CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2#11	3	54	43	479
CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2#1	-	44	56	495
CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2#4	1	42	58	508

<sup>a</sup> Prozent aller Trichome      <sup>b</sup> Trichome wurden an drei Blättern von vier Pflanzen gezählt

Die veränderten Oberflächeneigenschaften, wie z.B. die verminderte Hydrophobizität von *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern mit ektopischer Expression von *LTP2* in epidermalen Zellen (CER5<sub>Prom</sub>::LTP2), deuteten auf eine veränderte Wachsbeladung der Blattoberflächen hin. Um diese Unterschiede zu verdeutlichen wurden GC-MS-Analysen von Rosettenblatt-Wachsen des Wildtyps (WS-2), sowie der drei CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien (#1, #4, #11) durchgeführt. Die Analyse der Gesamt-Wachsbeladung in µg pro cm<sup>2</sup> Blattoberfläche zeigt, dass statistisch gesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 (#1, #4) und dem Wildtyp (WS-2) zu erkennen sind. Die leichte Reduktion der Wachsbeladung in der transgenen Linie #11 weist nur ein sehr geringes Signifikanzniveau auf (**Abbildung 34 A**).



**Abbildung 34** Zusammensetzung cuticulärer Wachse von zwölf Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern des Wildtyps (WS-2) und der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien (#1, #4, #11). (A) Wachsbeladung in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  mit Zusammensetzung der Stoffklassen (B). (C) Prozentuale Anteile der Verbindungsklassen in cuticulären Wachsen. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SA. Signifikanzlevel Berechnung mittels Student's t-Tests: \*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ . Die GC-MS-Messungen sowie die quantitative und qualitative Analyse wurden von Dr. M. Riedel (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

Eine Gen-Expression von *LTP2* in epidermalen Zellen führt somit nicht zu einer Veränderung der Wachseladung von Rosettenblättern (**Abbildung 34 A**).

Bei der Betrachtung der Wachszusammensetzung der Cuticulae der Rosettenblätter des Wildtyps und der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien (#1, #4,#11) ergibt sich ein genaueres Bild. Die Menge an Aldehyden und Fettsäuren ist in den transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 (#1, #4,#11) im Vergleich zum Wildtyp (WS-2) erhöht, wohingegen z.B. die Alkane reduziert sind (**Abbildung 34 B**).

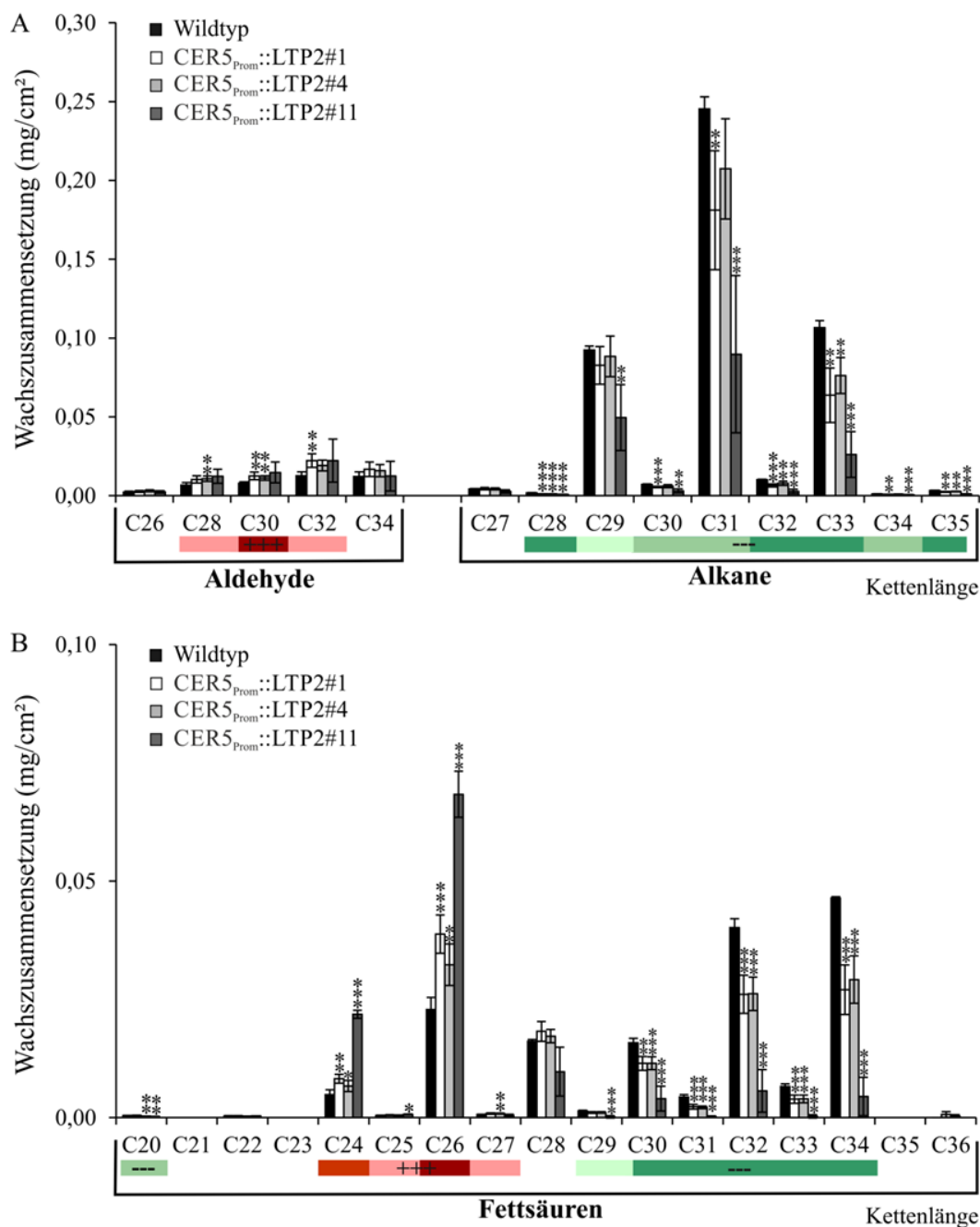
Betrachtet man die prozentualen Anteile der Hauptverbindungsklassen, so lässt sich in allen drei transgenen Linien eine signifikante Reduktionen der Menge an Alkanen und primären Alkoholen erkennen (**Abbildung 34 C**). Wohingegen der Aldehyd-Anteil in den untersuchten CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 Linien erhöht ist (**Abbildung 34 C**). Es kann eine direkte Korrelation zwischen der *LTP2*-Transkriptanzahl, der Hydrophobizität und der prozentualer Reduktion bzw. Erhöhung der Stoffklassen der cuticulären Wachse festgestellt werden. Je mehr Transkripte *LTP2* vorhanden sind, und je hydrophiler die Oberfläche ist, desto größer ist die Reduktion des Alkan-Anteils der cuticulären Wachse (**Abbildung 29 B + C**). So besitzt z.B. CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11 15% weniger Alkane als der Wildtyp, gefolgt von Linie #1 mit 8% und Linie #4 mit 3,5%. Nur CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11 weist eine Erhöhung des Fettsäure-Anteils, und eine Reduktion der Esterfraktion auf. Der Anteil an Sterolen und verzweigten primären Alkoholen ist hingegen in Linie #4 und Linie #11 erhöht.

Um einen genaueren Einblick in die Zusammensetzung der cuticulären Wachse der transgenen Pflanzen zu erhalten, wurden die einzelnen Stoffklassen im Vergleich zum Wildtyp (WS-2) analysiert. Betrachtet man die Stoffklasse der Aldehyde in den cuticulären Rosettenblatt-Wachsen der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien, so ist das C<sub>30</sub>-Aldehyd signifikant um 58% in Linie #1, 42% in Linie #4 und 87% in Linie #11 erhöht (**Abbildung 35 A**). Für die ebenso detektierten C<sub>26</sub>-, C<sub>28</sub>-, C<sub>32</sub>- und C<sub>34</sub>-Aldehyde kann in allen drei transgenen Linien kein einheitliches Muster der Erhöhung bzw. Erniedrigung bestimmt werden (**Abbildung 35 A**).

Sowohl der *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (WS-2), als auch die transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien (#11, #1, #4) besitzen, in den cuticulären Wachsen der Rosettenblätter, Alkane der Kettenlänge C<sub>27</sub> bis C<sub>35</sub> (**Abbildung 35 A**). Allerdings sind in den drei transgenen Linien (#1, #4, #11) signifikant weniger Alkane mit 28 (34%, 47%, 55%), 32 (36%, 22%, 74%), 33 (40%, 29%, 75%) und 35 (27%, 18%, 66%) Kohlenstoffatomen enthalten (**Abbildung 35 A**). Die transgenen Linien CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#1 und CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#11 besitzen zudem signifikant

verminderte Mengen an C<sub>32</sub>- (23%, 57%), C<sub>31</sub>- (26%, 63%) und an C<sub>34</sub>-Alkanen (19%, 43%). Tendenziell sind ab einer Kettenlänge von 28 Kohlenstoffatomen, alle nachgewiesenen Alkane der Cuticula von Rosettenblättern der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien reduziert (**Abbildung 35 A**).

Die größten Unterschiede ergeben sich allerdings bei der Betrachtung der *Fettsäuren* (**Abbildung 35 B**). C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Fettsäuren sind signifikant stark in den Wachsen von Rosettenblättern der CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien erhöht. Der prozentuale Anstieg der vergleichsweise kürzeren Fettsäuren der Fettsäureklasse mit einer Kettenlänge von 24 bzw. 26 Kohlenstoffatomen beträgt in der transgenen Linie #11 42% bzw. 200%. Dies entspricht einer 4,5-fachen bzw. einer dreifachen Erhöhung an C<sub>24</sub>- bzw. C<sub>26</sub>-Fettsäure in den cuticulären Rosettenblatt-Wachsen. CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#4 und #11 besitzen eine reduzierte Menge an der C<sub>20</sub>-Fettsäure, wohingegen in den cuticulären Wachsen von Linie #1 keine signifikanten Veränderungen zu messen sind (**Abbildung 35 B**). Sehr langkettige, stark hydrophobe Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 30-34 Kohlenstoffatomen sind in cuticulären Blattwachsen von Pflanzen, die *LTP2* in epidermalen Zellen exprimieren, deutlich reduziert. Im Arabidopsis Wildtyp dominieren in der Fettsäurefraktion C<sub>32</sub>- und C<sub>34</sub>-Fettsäuren, wohingegen in der transgenen Linie #11 diese um 86% bzw. 90% reduziert sind. Allgemein sind Linie #11 Kettenlängen von 30 bis 34 Kohlenstoffatomen um circa 75%-96% reduziert (**Abbildung 35 B**). Auch die transgenen Linien #1 und #4 weisen eine um 30%-50% verminderte Menge an C<sub>30</sub>- bis C<sub>34</sub>-Fettsäuren auf (**Abbildung 35 B**). Es besteht somit innerhalb der cuticulären Wachse von Rosettenblättern in den transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Pflanzen eine Verschiebung des Maximums von C<sub>30</sub>- bis C<sub>34</sub>-Fettsäuren zu C<sub>24</sub>- bzw. C<sub>26</sub>-Fettsäuren.



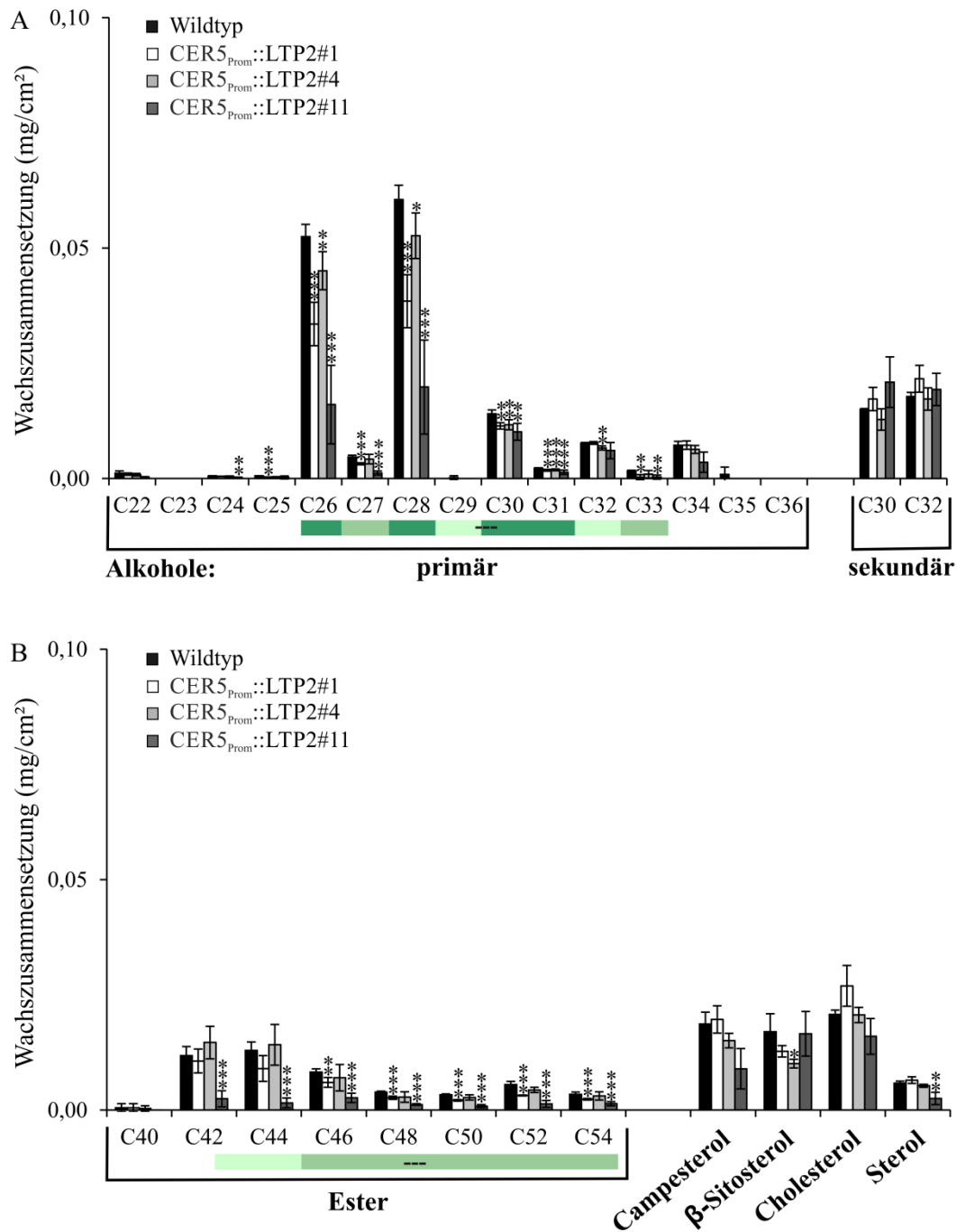
**Abbildung 35** Zusammensetzung der cuticulären Wachse von zwölf Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern (WS-2), sowie der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien (#1, #4, #11). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SA der Mengen an Aldehyden und Alkanen (A), sowie der Fettsäuren (B) aus einem Satz von zwei Proben mit Extrakten aus jeweils zehn Blättern. Dargestellt ist eines aus zwei vergleichbaren Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels des Student's t-Tests ermittelt: \*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ . Die Grün- bzw. Rottöne beschreiben, in wie vielen transgenen Linien die Reduktion/Erhöhung signifikant ist (dunkel: drei, mittel: zwei, hell: eine). Die GC-MS-Messungen sowie die quantitative und qualitative Analyse wurden von Dr. M. Riedel (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

In der Stoffklasse der primären Alkohole sind in den cuticulären Rosettenblatt-Wachsen aller CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien, mit wenigen Ausnahmen (C<sub>29</sub>, C<sub>32</sub> und C<sub>33</sub>), C<sub>26</sub>- bis C<sub>33</sub>-Aldehyde signifikant reduziert. Hervorzuheben sind insbesondere die C<sub>26</sub>- und C<sub>28</sub>-Aldehyde, welche um circa 36% in Linie #1, 14% in Linie #4 und 70% in Linie #11 reduziert sind (**Abbildung 36 A**). Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Säuren stark erhöht (**Abbildung 35 A**). Dies ist ein Indiz dafür, dass die erhöhte Expression von *LTP2* in den epidermalen Blattzellen zum Abtransport von C<sub>24</sub>-, C<sub>26</sub>- und C<sub>28</sub>-Fettsäuren führen könnte, wodurch weniger Fettsäuren für den Alkohol-bildenden Weg zur Verfügung stehen und prozentuale weniger primäre Alkohole der Kettenlängen C<sub>26</sub> und C<sub>28</sub> in der Alkohol-Fraktion zu finden sind. Die Menge an sekundären C<sub>32</sub>- und C<sub>32</sub>-Alkoholen ist in den Rosettenblatt-Wachsen von CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 im Vergleich zum Wildtyp unverändert (**Abbildung 36 A**).

Betrachtet man die Stoffklasse der Ester, so sind in den Rosettenblatt-Wachsen Kettenlängen mit 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 und 54 Kohlenstoffatomen vertreten (**Abbildung 36 B**). Im Vergleich zum Wildtyp, sind in CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#1 und #11 die Mengen an C<sub>46</sub>-, C<sub>48</sub>-, C<sub>50</sub>-, C<sub>52</sub>- und C<sub>54</sub>-Estern signifikant um 30-43% (#1) bzw. 60-75% (#11) reduziert. Außerdem findet in Linie #11 eine Reduktion des C<sub>42</sub>- und C<sub>44</sub>-Esters statt. Keine signifikanten Veränderungen sind hingegen für CER5<sub>Prom</sub>::LTP2#4 zu detektieren (**Abbildung 36 B**).

Für die ermittelten aromatische Komponenten des Cutins, wie Camphesterol,  $\beta$ -Sitosterol, Cholesterol und Sterol ist in Bezug auf die untersuchten Linien im Vergleich zum Wildtyp kein signifikant einheitliches Muster in Bezug auf die Veränderungen der Stoffmengen zu erkennen (**Abbildung 36 B**).

Zusammenfassend weist die ektopische Expression von *LTP2* in epidermalen Zellen von *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern darauf hin, dass *LTP2* ein Transferprotein für Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>24</sub> und C<sub>26</sub> sein könnte. Die erniedrigte Hydrophilie der Blätter erklärt sich durch den höheren Anteil an kurzkettigeren hydrophilen Fettsäuren zu Ungunsten des Anteils an langkettigen Fettsäuren.



**Abbildung 36** Zusammensetzung der cuticulären Wachse von zwölf Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern (WS-2), sowie der transgenen CER5<sub>Prom</sub>::LTP2-Linien (#1, #4, #11). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SA der Menge an primären und sekundären Alkoholen (A), sowie Estern und Aromaten (B). Dargestellt ist eines aus zwei vergleichbaren Experimenten von drei Lipidextrakten aus jeweils zehn Blättern. Die Grüntöne beschreiben, in wie vielen transgenen Linien die Reduktion signifikant ist (dunkel: drei, mittel: zwei, hell: eine). Signifikanzberechnung mittels Student's t-Test: \*\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*=  $p < 0,05$ ; \*=  $p < 0,1$ . Die GC-MS-Messungen sowie die quantitative und qualitative Analyse wurden von Dr. M. Riedel (Julius-von-Sachs-Institut; Botanik II, Universität Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

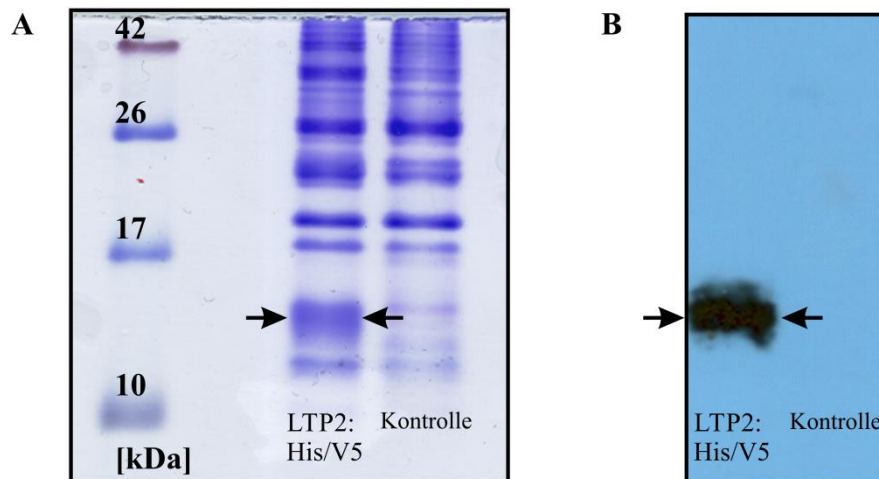


### 3.9. Das LTP2-Protein

Als nächstes ergibt sich die Frage, ob das in der Plasmamembran lokalisierte LTP2-Protein tatsächlich langkettige Aliphaten binden kann, welche z.B. bei der ektopischen Expression in den CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 Linien deutlich erhöht waren (3.8.), oder ob Verbindungen wie komplexe Ceramide (Verändertes Ceramid-Muster in *ltp2*KO; 3.6.) oder gar Suberin-Monomere (3.7.) gebunden werden können.

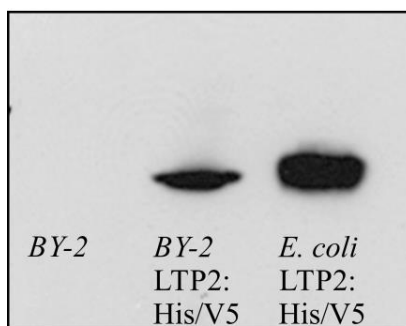
#### 3.9.1. Expression von LTP2 in *E. coli* und *BY-2*-Zellkulturen

Um den Bindepartner von LTP2 *in vitro* zu bestimmen, wurde in einem ersten Schritt das LTP2:6xHis/V5-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert (2.8.1.). Zur Überprüfung der erfolgreichen Proteininduktion wurden Gesamtproteine aus *E. coli*+pET28b (nicht induziert) bzw. *E. coli* + pET28b-LTP2:6xHis/V5 (induziert) isoliert (2.8.2.) und mittels SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; 2.8.4.) analysiert. Die im Polyacrylamid-Gel immobilisierten Proteine wurden im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blue blau angefärbt (2.8.5.). Es kann im Polyacrylamidgel eine Induktionsbande für das LTP2:6xHis/V5-Fusionsprotein im Gesamtproteinextrakt von *E. coli* + pET28b-LTP2:6xHis/V5 identifiziert werden (siehe Pfeile, **Abbildung 37 A**). Um zu bestätigen, dass diese Bande tatsächlich dem LTP2:6xHis/V5-Fusionsprotein zuzuordnen ist, wurden im Anschluss die Proteine mittels eines Western-Blots von dem Acrylamidgel auf Nitrocellulose transferiert. Nach der Antikörperdetektion folgte zur Visualisierung eine Chemilumineszenz-Reaktion (2.8.6.). Die deutliche schwarze Bande auf dem Röntgenfilm befindet sich auf gleicher Höhe wie die Induktionsbande. Western-Blot Analysen zeigen somit, dass das LTP2:6xHis/V5-Fusionsprotein erfolgreich in *E. coli* induziert und isoliert werden kann (**Abbildung 37 B**).



**Abbildung 37** Analyse des LTP2:6xHis/V5-Fusionsproteins aus *E. coli*. (A) Coomassie-Anfärbung der Proteine im Polyacrylamid-Gel. Erste Spur: Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit pET28b-LTP2:6xHis/V5; Zweite Spur: Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit pET28b (Kontrolle). (B) Western-Blot der SDS-PAGE entsprechend Abbildung (A). Erste Spur: Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit pET28b-LTP2:6xHis/V5; Zweite Spur: Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit pET28b (Kontrolle). Anti-6xHis Antikörper und anschließender Chemilumineszenz-Detektion.

Um zu zeigen, dass das LTP2-Fusionsprotein aus *E. coli* die gleichen Bindeeigenschaften besitzt wie ein LTP2-Fusionsprotein aus Pflanzen, wurde die *Nicotiana benthamina* BY-2 Zellkultur Linie mit einem Konstrukt transformiert, dass die Überexpression von dem LTP2:6xHis/V5-

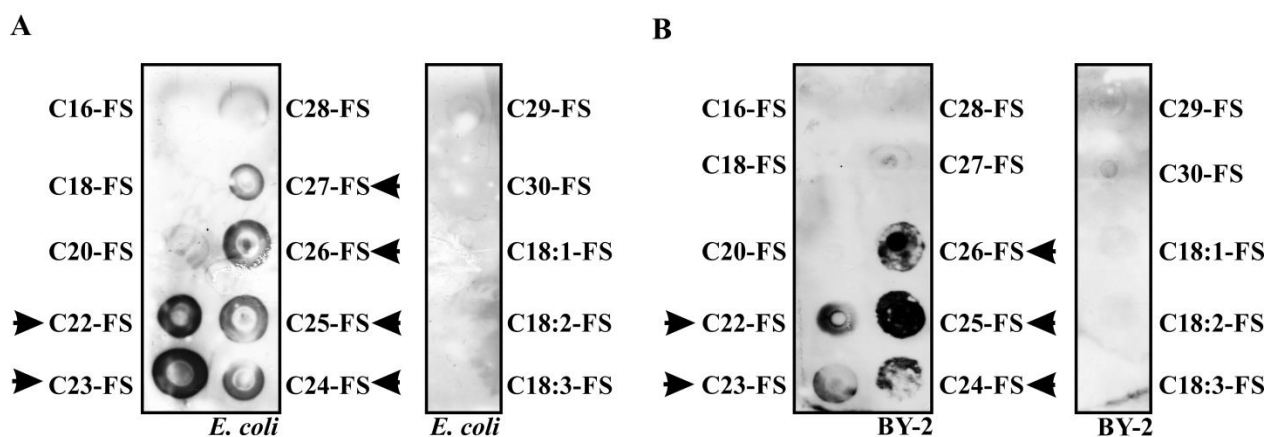


**Abbildung 38** Western Blot-Analyse mit anti-His-Antikörper von Gesamtproteinextrakt der BY-2 Zellkultur (Spur 1), des in der BY-2 (Spur 2), sowie in *E. coli* (Spur 3) produzierten LTP2:6xHis/V5-Proteins.

Fusionsprotein ermöglicht (2.1.9). Zum Beweis, dass das LTP2-Fusionsprotein in BY-2 Zellkulturen stabil produziert wurde, wurden erneut SDS-Page, sowie Western-Blot-Analysen durchgeführt. Als Negativkontrolle dient das BY-2-Gesamtproteinextrakt, als Positivkontrolle das aufgereinigte LTP2-6xHis/V5 Fusionsprotein aus *E. coli*. Auf Coomassie-Färbungen von Polyacrylamid-Gelen mit BY-2-Extrakten sind keine Proteinbanden für das Fusionsprotein aus BY-2 Zellkulturen sichtbar. Western-Blot-Analysen zeigen, dass das Protein auch von BY-2-Zellkulturen gebildet wird, und dass es wie erwartet die gleiche Größe wie das LTP2:6xHis/V5 Fusionsprotein aus *E. coli* besitzt (Abbildung 38).

### 3.9.2. LTP2-Binde-Assays

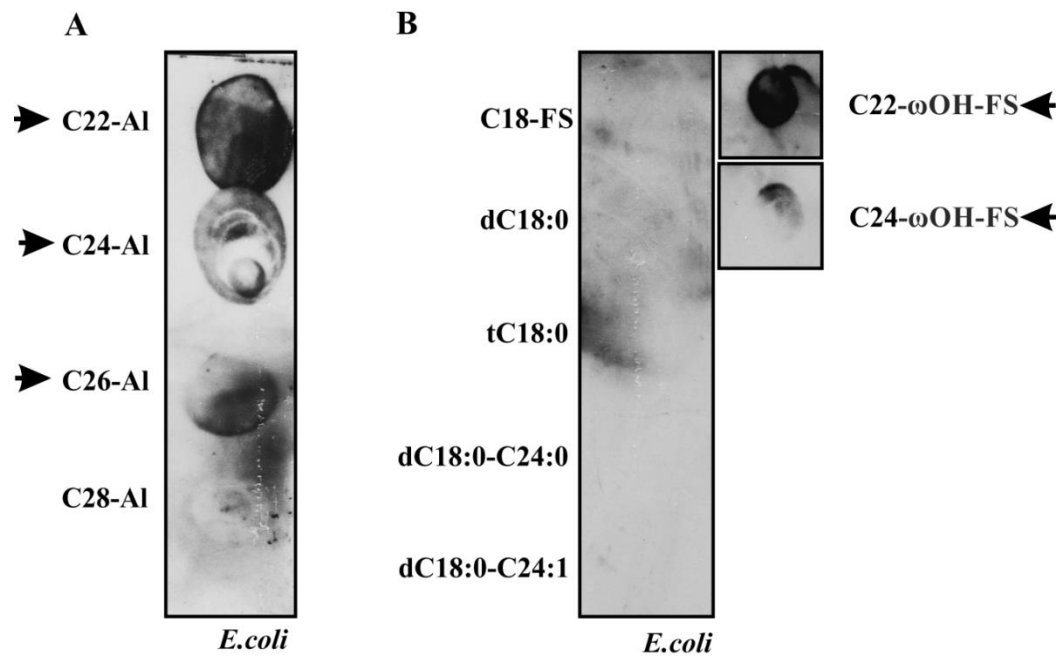
Zur Determination der *in vitro* Bindepartner von LTP2 wurde das aus dem heterologen *E. coli*-Zellkultursystem gewonnene LTP2:6xHis/V5-Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und für sogenannte Protein-Lipid-Overlay-Assays verwendet (2.8.7.). Aufgrund der geringen Menge des LTP2-Fusionsproteins in *BY-2* Zellkulturen wurde auf eine Aufreinigung verzichtet. In Protein-Lipid-Overlay-Assays wurde daher stets mit Pflanzenproteingestamtextrakt gearbeitet. Als mögliche Binde-Partner wurden zuerst Fettsäuren verschiedener Kettenlänge ( $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{22}$ ,  $C_{23}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{26}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{28}$ ,  $C_{29}$ ,  $C_{30}$ ) auf Nitrocellulosemembranen vorgelegt. Das LTP2:6xHis/V5-Fusionsprotein aus *E. coli* bindet bevorzugt  $C_{22}$ -,  $C_{23}$ -,  $C_{24}$ -,  $C_{25}$ -,  $C_{26}$ -Fettsäuren. Leichte Interaktionen zwischen  $C_{27}$ - &  $C_{28}$ -Fettsäuren mit LTP2 können ebenso erkannt werden (**Abbildung 39 A**). Das LTP2-Fusionsprotein aus *E. coli* diskriminiert demnach in der Kettenlänge seiner Lipid-Bindepartner. Einfach, doppelt, sowie dreifach ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren wurden von dem LTP2-Fusionsprotein nicht gebunden. Ebenso wie das LTP2-Fusionsprotein aus *E. coli* bindet das LTP2-Fusionsprotein aus *BY-2* Zellkulturen bevorzugt langkettige Fettsäuren, wie z.B.  $C_{22}$ ,  $C_{23}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{26}$  und vermindert auch  $C_{27}$ -Fettsäuren (**Abbildung 39 B**). Längere Kettenlängen, sowie einfach, doppelt und dreifach ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren werden hingegen nicht gebunden. Demnach besitzen die LTP2-Fusionsproteine aus *E. coli* und aus dem pflanzlichen System ähnliche Bindeeigenschaften, sodass in der Folge für weitere Analysen das in größeren Mengen zur Verfügung stehende LTP2-Fusionsprotein aus *E. coli* verwendet wurde.



**Abbildung 39** Protein-Lipid Overlay Assay von LTP2:6xHis/V5 aus *E. coli* (A) sowie aus *BY-2* Zellkulturen (B). Bindeaffinität beider Fusionsproteine zu C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>-, C<sub>22</sub>-, C<sub>23</sub>-, C<sub>24</sub>-, C<sub>25</sub>-, C<sub>26</sub>-, C<sub>27</sub>-, C<sub>28</sub>-, C<sub>29</sub>-, C<sub>30</sub>-Fettsäuren, sowie einfach-, zweifach- und dreifach-ungesättigter C<sub>18</sub>-Fettsäuren. Dargestellt ist jeweils eines von drei vergleichbaren biologischen Replikaten. FS=Fettsäure; Pfeile deuten auf Protein-Lipid-Interaktionen.

In einem nächsten Schritt sollte die LTP2-Bindeeigenschaft von Fettsäurederivaten getestet werden. Im Fokus standen insbesondere langkettige Fettsäurederivate, die *in planta* Bestandteile komplexer Polymere, wie z.B. Suberin, Cutin oder auch Ceramiden, sind.

Zuerst wurden C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>-, C<sub>26</sub>- und C<sub>28</sub>-Aldehyde, die sowohl Monomere von cuticulären Wachsen, als auch von Suberin sind, als mögliche Lipid-Binde-Partner für LTP2 vorgelegt. Die C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Aldehyde sind präferierte Lipid-Partner von LTP2, wohingegen längere Kettenlängen der Aldehyde, wie C<sub>28</sub> keine Binde-Affinität zu LTP2 aufweisen. Als Kontrolle dienten in diesem Ansatz Fettsäuren der Länge C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>. (**Abbildung 40 A**). Des Weiteren wurde die Bindeeigenschaft von LTP2 zu Ceramiden und deren Monomeren ermittelt. LTP2 kann weder die Sphingobasen Sphinganin (d18:0) und Phytosphingosin (t18:0), noch komplexe Ceramide aus Sphinganin (d18:0) bzw. Dehydrophytosphingosin (t18:1) und C<sub>24:0</sub>- bzw. C<sub>24:1</sub>-Fettsäuren binden. Fettsäure-Derivat-Monomere der Ceramide hingegen, wie  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäuren ( $\omega$ OH-S), der Kettenlänge C<sub>22</sub> und C<sub>24</sub> sind Lipid-Bindepartner von LTP2 (**Abbildung 40 B**). Die *in vitro* Lipidanalysen zeigen somit, dass LTP2 C<sub>22</sub>- bis C<sub>26</sub>-Fettsäuren, sowie C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Aldehyde und C<sub>22</sub>- und C<sub>24</sub>-  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäuren binden kann.



**Abbildung 40** Protein-Lipid Overlay Assay von LTP2:6xHis/V5 aus *E. coli*. (A) Bindeaffinität von C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>-, C<sub>26</sub>-, C<sub>28</sub>-Aldehyden zu dem LTP2 Fusionsprotein. (B) Bindeaffinität der  $\omega$ -hydroxylierten C<sub>22</sub>-, C<sub>24</sub>-Fettsäuren, C<sub>18</sub>-Fettsäure, Sphinganin (dC18:0) und Sphingosin (tC18:0), ebenso wie der Ceramide dC18:0\_C24:0, dC18:0\_C24:1. Pfeile deuten auf Protein-Lipid-Interaktionen. Al: Aldehyd; FS: Fettsäure.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Expression von *LTP2* im Tumor ist essentiell für dessen Wachstum

Grundlage dieser Arbeit sind Micro-Array Analysen, welche 21 Tage nach der Induktion von Wurzelhalsgallen an *Arabidopsis thaliana* Infloreszenzen mit dem onkogenen *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58 angefertigt wurden. Von den identifizierten 49 putativen *Arabidopsis thaliana* Lipidtransferproteinen (LTPs) konnte nur für *LTP2* (At2g38530) eine stark erhöhte Gen-Expression gemessen werden (Deeken et al., 2006; **3.1.**). Es stellt sich somit die Frage, welchen Stellenwert *LTP2* bei der Entwicklung von Wurzelhalsgallen einnehmen könnte.

Die Bedeutung von *LTP2* bei der Entwicklung von Tumoren an *Arabidopsis thaliana* wird durch den Vergleich der Tumorgewichte von mittels *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58) induzierten Tumoren an dem Wildtyp (Col-0) und der Mutante ohne *LTP2*-Transkripte (*ltp2KO*) deutlich. Der Verlust von *LTP2* wirkt sich negativ auf das Tumorwachstum aus (**Abbildung 20**). Der Vergleich der Gen-Expression neben *LTP2* zur *LTP*<sub>1</sub>-Familie gehörender LTPs (*LTP1*, At2g38540; *LTP3*, At5g59320; *LTP4*, At5g59310; *LTP6*, At3g08770; *LTP12*, At3g51590) zeigt, dass die Transkriptanzahlen der *LTP*<sub>1</sub>-Gene in *ltp2KO*-Tumoren stark erhöht sind (**Abbildung 20**). *LTP1* besitzt z.B. im Vergleich zum Wildtyp-Tumor (*Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58 an *Arabidopsis thaliana*, Col-0) im *ltp2KO*-Tumor die am stärksten erhöhte Gen-Expression. Innerhalb des Wildtyp-Tumors sind *LTP1*-Transkripte kaum nachweisbar, wohingegen die Gen-Expression von *LTP2* im Vergleich zum uninfizierten Spross zehnfach bis dreißigfach erhöht ist (**Abbildung 20**). In *Arabidopsis thaliana* ist *LTP1* der nächste Verwandte zu *LTP2*. Da beide Genloki auf dem zweiten Chromosom tandemartig direkt hintereinander angeordnet sind, und zudem sehr große Sequenzhomologien besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass *LTP1* und *LTP2* als Genduplikationen entstanden sind (**Abbildung 9**; Arondel et al., 2000). Es konnte bereits in der Diplomarbeit von Stefanie Saupe gezeigt werden, dass die Promotoren von *LTP1* und *LTP2* nur eine Sequenzhomologie von 10% besitzen. Die Spezifität der Gen-Expression wird durch sogenannte UAS (engl.: „*upstream activating sequences*“; Aktivierungssequenz eines *stromabwärts* gelegenen Zielgens) ermöglicht. Da diese Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren beinhalten, wird ihnen eine essentielle Rolle bei der Aktivierung des Promotors zugeschrieben. Durch unterschiedliche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren wird eine spezifische Regulation der Gen-Expression ermöglicht (Ogata et al., 2003; Mitchell & Tjian, 1989). Aufgrund der geringen Ähnlichkeit der Promotorsequenzen von *LTP1* und *LTP2* ist eine Spezifikation der Funktionen durch eine

gewebs- und stimulusspezifische Expression wahrscheinlich. In Bezug auf die Gen-Transkription dominiert z.B. im Arabidopsis Rosettenblatt *LTP1*, wohingegen im Embryo und im Tumor *LTP2* überwiegt (**Abbildung 15**). Der auf Transkript-Ebene durch *LTP1*, *LTP3* und *LTP4* kompensierte Verlust an *LTP2* ist allerdings nicht auf die funktionelle Protein-Ebene zu übertragen. *LTP1* kann *LTP2* nicht vollständig funktionell ersetzen, denn trotz der stark erhöhten Gen-Expression von *LTP1* ist der Tumor an der Mutante *ltp2KO* dreifach kleiner als am Wildtyp (**Abbildung 20**). Es kann resümiert werden, dass in der *LTP*<sub>1</sub>-Familie, trotz großer Sequenzähnlichkeiten, nur *LTP2* eine essentielle Rolle beim Tumorwachstum spielt.

## 4.2. Funktion von *LTP2*

Im Jahr 2002 wurde durch Maldonado et al. die These aufgestellt, dass ein entfernt zu *LTP2* verwandtes *Arabidopsis thaliana* LTP, DIR 1 (engl.: „*defective in induced resistance*“; At5g48485) an der Vermittlung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR; aus engl.: „*systemical aquired resistance*“) beteiligt ist. Die Verlustmutante des apoplastischen Proteins zeigte zwar lokale Abwehrreaktion an mit *Pseudomonas syringae* infizierten Blättern, aber an entfernten Blättern blieb die Expression der PR-Gene (engl.: „*pathogenesis-related*“) und somit die Entwicklung der SAR aus. Es wurde daraufhin vermutet, dass DIR1 ein Pathogen-Abwehrsignal des Langstreckentransports transferiert. Die Sequenzhomologie zwischen *LTP2* und DIR1 beträgt auf Basis von Aminosäuren lediglich 23% (Diplomarbeit, Stefanie Saupe). Diese Arbeit zeigt, dass eine erhöhte Expression von *LTP2* in durch *Agrobacterium tumefaciens* induzierten Tumoren an *Arabidopsis thaliana* nicht durch die Anwesenheit von Agrobakterien allein ausgelöst wird (**Abbildung 17**). Eine Applikation von Agrobakterien zu Wurzelkulturen hat auch im zeitlichen Verlauf keinen Einfluss auf die *LTP2*-Transkription (**Abbildung 17**). Die Vermutung liegt somit nahe, dass die *LTP2*-Gen-Expression nicht als Antwort auf einen Befall der Pflanze mit Agrobakterien erfolgt.

Das Phytohormon Auxin weist im Tumor eine erhöhte Biosynthese auf (Efetova et al., 2007). Auxin unterstützt die in Tumoren verstärkten Prozesse wie: Zellproliferation, -Streckung und -Differenzierung, positiv (Benjamins & Scheres, 2008; Vanneste & Friml, 2009). Auf transkriptioneller Ebene wird die *LTP2*-Gen-Expression durch Auxin induziert (**Abbildung 18 B**). Die gewebspezifische Lokalisation von *LTP2* über die transgenen *LTP2*<sub>Prom</sub>::GUS-Linien (GUS, *gusA*;  $\beta$ -D-Glucuronidase-Gen) zeigt zudem, dass der *LTP2*-Promotor eine erhöhte Aktivität im kambialen Gewebe aufweist (**3.2.1.; Abbildung 14 F-G**). Besonders in den Bereichen des Protoxylems ist eine deutliche Blaufärbung,

als Indiz einer hohen GUS-Aktivität, zu erkennen (**Abbildung 14 I**). Diese Ergebnisse könnten auf eine Beteiligung von LTP2 an Zellproliferation, -Streckung und -Differenzierung im Tumor hinweisen.

#### 4.2.1. Das in der Plasmamembran lokalisierte LTP2-Protein transferiert langkettige Aliphaten

Wird eine Zelle neu aufgebaut bzw. vergrößert müssen auch die strukturellen Bestandteile, wie z.B. Monomere der primären und sekundären Zellwand bereitgestellt werden. Lipidtransferproteine wurden durch die Eigenschaft definiert Lipide *in vitro* zu transferieren (Kader, 1996). *In vitro* Experimente demonstrieren, dass LTPs Phospholipide einer Akzeptor-Membran durch jene einer Donor-Membran austauschen können (Miguel et al., 1987). Unterstreichend zeigen Studien, dass pflanzliche LTPs Acyl-Ketten (Rickers et al., 1985) bzw. Lysophosphatidylcholin (Désormeaux et al., 1992) binden können. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde von Kader (1996) postuliert, dass LTPs Acyl-Ketten von Phospholipiden in dem hydrophoben Tunnel, der die Proteine durchspannt, binden und folglich am Aufbau von Membranen beteiligt sind. Auch LTP2 könnte Strukturlipide transferieren und den Aufbau von Membranen in proliferierendem Gewebe unterstützen. Allerdings zeigen Analysen des Gesamt-Lipid-Pools, dass in der *ltp2KO* Mutante nicht der Phospholipid-Pool, sondern der Ceramid-Pool verändert ist (**Abbildung 26**). Ceramide (Cer) gehören neben Hydroxyceramide (HyCer), Glycosyl-Ceramide (GlcCer) und Glycosyl-Inositol-Phospho-Ceramide (GIPCs) zur Gruppe der Sphingolipide (Markham et al., 2006). Der Ceramid-Grundbaustein ist das Produkt der Acetylierung von VLCFAs (engl.: „*very long chain fatty acids*“, Fettsäuren mit einer Länge von 20-30 C-Atomen) mit langkettigen Sphingobasen (Sperling & Heinz, 2003; Dunn et al., 2004; **I.3.3**). Innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht pflanzlicher Membranen befinden sich Sphingolipid- und Sterol-reiche Domänen, sogenannte Membranmikrodomänen (Fischer et al., 2004). Diese zeichnen sich insbesondere durch einen hohen Gehalt an GlcCers aus (Dunn et al., 2004).

Die genauen Transportmechanismen der Sphingolipide vom Ort der Synthese zur Plasmamembran ist derzeit noch eine wissenschaftliche Grauzone. Bislang wurde für den Transport von komplexen Sphingolipiden aus dem Endoplasmatischen Retikulum sowie aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran eine Beteiligung von ACD11 (At2g34690; engl.: „*accelerated cell death II*“) postuliert. ACD11 ist der Familie der Glyco-Lipidtransferprotein (GLTP) zuzuordnen (Petersen et al., 2008). Das ACD11-Protein erkennt selektiv die Kopfgruppe



von Ceramid-1-Phosphaten und bindet die Acyl- und Sphingosinkette in der hydrophoben Tasche. Verwandte pflanzliche Sphingolipide, wie z.B. Ceramide können allerdings nicht gebunden werden (Simanshu et al., 2014). Der Verlust an *ACD11*-Transkripten wirkt sich bei der Applikation abiotischer Stressfaktoren wie z.B. Trockenheit und Kälte auf den Sphingolipid-Pool aus. Bei Kältestress sind z.B. insbesondere Phytoceramide mit einer Acyl-Kettenlänge von 22, 24, 26 und 28 bzw. Ceramid-1-Phosphate mit Kettenlängen von 16, 18, 20 und 24 Kohlenstoffatomen stark erhöht (Simanshu et al., 2014). Die Autoren postulieren, dass es eine funktionelle Verbindung zwischen der Expression von *ACD11* und der Regulation des Sphingolipid-Metabolismus in Pflanzen existiert - insbesondere in Bezug auf die kritische Balance zwischen Ceramiden und Ceramid-1-Phosphaten, welche in Pflanzen und Tieren den programmierten Zelltod reguliert (Simanshu et al., 2014; Berkey et al., 2012; Chen et al., 2009; Pata et al., 2010).

Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Lipidtransferproteinen und Sphingolipiden lassen sich in der Literatur jedoch nicht finden. In drei unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch bei einem Verlust an *LTP2*-Transkripten der Ceramid-Pool nachhaltig beeinflusst ist. Hervorzuheben sind insbesondere die Verbindungen HyCer\_t18:0\_h22:1/ HyCer\_t18:1\_h22:0 und HyCer\_t18:1\_h26:1, welche in der *ltp2*KO-Mutante signifikant erhöht bzw. erniedrigt sind (**Abbildung 26**). Über diese Verbindungen hinaus lässt sich im Vergleich zum Wildtyp kein einheitliches Muster der veränderten Mengenverhältnisse einzelner Ceramide erkennen. Das *LTP2*-Protein bindet, wie die Protein-Lipid-Overlay-Assays veranschaulichen, weder Sphingobasen noch komplexe Sphingolipide (**Abbildung 40 B**). Eine Funktion als Transferprotein von Sphingolipiden kann somit ausgeschlossen werden. Vielleicht besteht allerdings, ähnlich wie für *ACD11* ein indirekter Zusammenhang, sodass durch das Fehlen von *LTP2*-Transkripten Regulationsmechanismen verändert werden, die den Ceramid-Pool beeinflussen.

Ein weiterer Ansatz ist die mögliche Beteiligung von *LTP2* bei Abbauprozessen der Ceramide in der Plasmamembran. Es wurde postuliert, dass innerhalb der Plasmamembran komplexe Sphingolipide durch die GlcCer-Glucuronidase (GCG) bzw. die GIPC-Phospholipase C (PLC) in Hydroxyceramide hydrolysiert werden. Beide Enzyme sind aus dem tierischen System bekannt, wurden aber bisher für Pflanzen noch nicht entdeckt (Markham, 2013). Die freien Hydroxyceramide sollen dann in der Zellwand über Ceramidasen zu Fettsäuren und LCBs hydrolysiert werden (Markham et al., 2013; Tsegaye et al., 2007). Diese freien Fettsäuren müssen dann auf irgendeine Weise verstoffwechselt werden. Das *LTP2*-Protein kann Fettsäuren ab einer Kettenlänge von 22 Kohlenstoffatomen binden (Lipid-Overlay-Assay, **Abbildung 39**). Es wäre

somit möglich, dass z.B. bei Abbauprozessen der Ceramide in der Plasmamembran C<sub>22</sub>-Fettsäuren von LTP2 weiter transferiert werden könnten. Ein Indiz dafür ist ggf. die signifikant erhöhte Menge an C<sub>22</sub>-Ceramiden in der *ltp2*KO-Mutante (**Abbildung 26**).

Wenn allerdings LTP2 nicht direkt am Transfer von Membranbausteinen der primären Zellwand, wie z.B. den Phospholipiden oder Shingolipiden beteiligt ist, welche Funktion übt dann das Protein in Tumoren aus?

Anhaltspunkte in welcher Art und Weise LTP2 am Tumorwachstum beteiligt sein könnte, werden durch die subzelluläre Lokalisation gewonnen. Das nächste Homolog zu LTP2, LTP1 wurde über die Immunelektronenmikroskopie mit monoklonalen Antikörpern, in der Zellwand detektiert (Thoma et al., 1993). Für die Lokalisation von *Arabidopsis thaliana* LTP2 finden sich in der Literatur kontroverse Angaben. Zellwandextrakten aus fünf bzw. elf Tage alten etiolierten *Arabidopsis* Hypokotylen, zeigen erhöhte Mengen des LTP2-Proteins und deuten somit auf eine Zellwandlokalisation hin (Irshad et al., 2008). Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass LTP2 eventuell an der Bildung der Cuticula während der Stängel-Elongation im Keimling beteiligt sein könnte (Irshad et al., 2008). Des Weiteren konnte aber auch in einer Untersuchung zur Proteinlokalisation LTP2 in Plasmamembranextrakten von *Arabidopsis thaliana* Kalluskulturen nachgewiesen werden (Dunkley et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wird LTP2 prädominant in der Plasmamembran lokalisiert (**Abbildung 24**). Wie allerdings LTP2 an der Plasmamembran assoziiert ist bleibt fraglich. Eine Transmembrandomäne, die das Protein direkt in die Plasmamembran integriert, kann durch die Struktur des LTPs ausgeschlossen werden (Yeats & Rose, 2008; persönl. Mitteilungen Prof. Dr. Thomas Müller, Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg, Deutschland). Innerhalb der großen LTP-Familie gibt es eine Gruppe, die einen sogenannten Glykosylphosphatidyl-Anker (GPI-Anker) besitzt. Dieser Anker ermöglicht eine Assoziation des Proteins an der Plasmamembran (DeBono et al., 2009). Ein bekannter Vertreter dieser Familie, LTPG1, ist wie die meisten Proteine mit GPI-Anker, auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert (Bolte et al., 2004; DeBono et al., 2009). LTP2 besitzt ebenso wie LTP1 keinen GPI-Anker. Allerdings werden beide Proteine als Pro-Proteine synthetisiert, die ein N-terminales Signalpeptid besitzen, welches ihre Sekretion in den extrazellulären Raum dirigiert (Bernhard et al., 1991; Meijer et al., 1993; Thoma et al., 1993).

Für andere Spezies, wie z.B. Reis konnte eine Anlagerung eines LTPs (nsLTP110) an Rezeptoren bzw. proteinhaltige Areale der Plasmamembran gezeigt werden (Wang et al., 2009). Außerdem

ist bekannt, dass das LTP1 aus Tabak über Cryptogein-Rezeptoren an der Plasmamembran assoziieren kann (Buhot et al., 2004). Ein ähnliches Szenario wäre auch für LTP2 vorstellbar.

Die Lokalisation an der Plasmamembran kann darauf hinweisen, dass LTP2 nahe der Zellwand Lipide transferieren könnte. Bereits im Jahr 1991 wurde von Sterk et al. eine Beteiligung von Lipidtransferproteinen (LTP) an der Assemblierung der Cuticula postuliert. Dabei sollen LTPs als Shuttle fungieren, die im apoplastischen Milieu Lipide von der Plasmamembran zur Cuticula transferieren (Sterk et al., 1991; Meijer et al., 1993; Kunst & Samuels, 2003). Zudem wurde gezeigt, dass LTP1, das nächste Homolog zu LTP2, primär in der Zellwand und in der Cuticula von epidermalen Zellen akkumuliert (Thoma et al., 1993). *LTP2* exprimiert hingegen, im Unterschied zu *LTP1*, kaum in epidermalen Zellen (**Abbildung 13 G-H**; Thoma et al., 1993). Dies ist aber eine grundlegende Voraussetzung für eine Beteiligung von LTP2 am Aufbau der Cuticula von Arabidopsis Blättern. Eine Überexpression des *LTP2*-Gens unter Kontrolle des 35S-Promotors war in der vorliegenden Arbeit in drei unabhängigen Ansätzen nicht geglückt (3.8.). Möglicherweise ist die starke Expression von *LTP2* embryonal letal. Als elegantere Methode wurde daher das LTP2-Protein ektopisch in epidermalen Zellen exprimiert. Welche Veränderungen treten aber in Morphologie und Zusammensetzung der Cuticula auf, wenn das LTP2-Protein in epidermalen Zellen vorkommt?

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von *LTP2* in Arabidopsis-Epidermiszellen (*CER5<sub>Prom</sub>::LTP2*) zu einer Erhöhung der Permeabilität der Cuticula führt, wohingegen der Wachsegehalt unverändert bleibt (**Abbildung 31, Abbildung 34 A**). Dies widerspricht sich nicht, da die Permeabilität und damit die wasserabweisenden Eigenschaften der Cuticula nicht mit der Wachsmenge der Cuticula korrelieren. Vielmehr bestimmt die Ultrastruktur, gekoppelt mit der kristallinen Mikrostruktur der Cuticula ihre Permeabilität (Jenks et al., 2002). Die beiden Proteine *knobhead* (KNB) und *bicentifolia* (BCF) sind an der Biosynthese des cuticulären Wachses involviert. Die *knb* und *bcf* Mutanten besitzen, wie *CER5<sub>Prom</sub>::LTP2*, plättchenartige epicuticulären Wachskristalle auf der Blattoberfläche (**Abbildung 33 A+B**), die beim dem Wildtyp nicht zu beobachten sind. Obwohl die Expression von *LTP2* zur partiellen Auflagerung von Wachs-Clustern auf der Blattoberfläche führt, ist die gesamte Wachsmenge in *CER5<sub>Prom</sub>::LTP2* nahezu unverändert (**Abbildung 34 A+B**). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei der *bcf*-Mutante beobachtet werden (Jenks et al., 1996). Zusätzlich besitzen *CER5<sub>Prom</sub>::LTP2* Pflanzen Blatt- und Blüten-Anomalien (**Abbildung 30 C-F**). In der Literatur sind mehrere Beweise für die Korrelation zwischen aberranter Blatt- oder Blütenmorphologie und Veränderungen der Zusammensetzung der Wachse der Cuticula zu finden. So besitzt z.B. die *bcf*-Mutante missgebildete, blau-grünliche Rosettenblätter

(Jenks et al., 1996). Das Heterodimer aus COF1 (ABCG11, WBC11; At1g17840) und CER5 (ABCG12; At1g51500) bildet einen ABC-Transporter (engl.: „*ATP binding cassette*“; ABC), der cuticuläre Wachsmomere über die Plasmamembran transportiert (Bernard & Joubès, 2013). Die *cofl* -Mutante zeichnet sich durch cuticuläre Defekte, wie eine reduzierte Dicke der Cuticula aus - zudem treten Organfusionen auf (Ukitsu et al., 2007). Der Fettsäure-Elongase Komplex an der Membran des endoplasmatischen Retikulum besteht aus der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS), der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Reduktase (KCR), der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase (HCD) und der Enoylreduktase (ECR). Wird die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Reduktase KCR1 in ihrer Expression reprimiert, so treten morphologische Veränderungen einschließlich Kleinwuchs, eingerollte Stängelblätter und fusionierte Blütenknospen auf (Beaudoin et al., 2009).

Das Epidermis-spezifische, extrazelluläre Protein *Bodyguard* ist für die Bildung der Cuticula in Arabidopsis erforderlich. Die *Bodyguard*-Verlust-Mutante (*bdg*) ist zwergwüchsig und besitzt abnorm entwickelte Blätter mit einer reduzierten Anzahl an Trichomen (Kurdyukov et al., 2006). Mutanten der  $\beta$ -Acetyl-CoA-Reduktase (KCR1; At1g67730), eine Fettsäure-Elongase, die VLCFAs für alle Klassen von Lipiden bereitstellt, zeigen deutlich verändert Trichom-Morphologie der Stängelblätter (Beaudoin et al., 2009). Es besteht demnach ein Zusammenhang zwischen der Anzahl bzw. der Morphologie von Trichomen und der Zusammensetzung der Cuticula. In der Literatur lassen sich auch Indizien dafür finden, dass *LTP2* zumindest in Trichom-Initialen stark exprimiert wird (Kryvych et al., 2008). Auch die GUS-Analysen der vorliegenden Arbeit von Arabidopsis Rosettenblättern zeigen gleichmäßig verteilte blaue Areale der *LTP2*-Promotor-Aktivität in Zellen, welche die Trichom-Entwicklung durchlaufen (**Abbildung 13 G-H**). Erhöht man die Anzahl an *LTP2*-Transkripten in epidermalen Zellen zusätzlich (*CER5<sub>Prom</sub>::LTP2*), so treten fehlerhaft entwickelte Trichome auf (**Abbildung 33 E-F**). Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an *LTP2*-Transkripten und der Morphologie von Trichomen hinweisen, welcher sich eventuell durch eine veränderte Lipid-Zusammensetzung der Cuticula in den *CER5<sub>Prom</sub>::LTP2* ergibt.

Die Anwesenheit von *LTP2* in epidermalen Zellen in den transgenen *CER5<sub>Prom</sub>::LTP2*-Pflanzen führt zu einer Verschiebung des Fettsäurespektrums zu „kurzkettigeren“ Fettsäuren mit einem Maximum bei der C<sub>26</sub>-Fettsäure (**Abbildung 35 B**). Die Menge an C<sub>24</sub>- bzw. C<sub>26</sub>-Fettsäuren ist im Vergleich zum Wildtyp z.B. sechsfach bzw. vierfach erhöht, während die korrespondierenden Derivate (Alkane, primäre Alkohole, Alkylester) abnehmen. Es besteht eine Korrelation zwischen der Menge an der C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Fettsäure und der Anzahl an *LTP2*-Transkripten, d.h. je mehr *LTP2*-Transkripte exprimiert werden, desto mehr akkumulieren

C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Fettsäuren (**Abbildung 30 A** & **Abbildung 35 B**). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das an Plasmamembran assoziierte LTP2-Protein an dem Transfer von C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-VLCFAs in die Zellwand beteiligt ist. Alle beobachteten morphologischen Aberrationen der Transgenen (CER5<sub>Prom</sub>::LTP2) wie, missgebildete Blätter, Blüten und Trichome, können das Ergebnis der veränderten Lipidzusammensetzung der Cuticula sein, welche sich durch die ektopische Expression von *LTP2* in epidermalen Zellen ergibt.

#### **4.2.2. LTP2 ist an Prozessen beteiligt, die aliphatische Lipide zur Versiegelung der Zellwand benötigen**

Bei diversen Umweltstimuli, wie z.B. Salzstress, Sauerstoffdefizit, und auch Verwundungen werden lokal langkettige Aliphaten eingelagert, um Zellwände zu versiegeln und den sessilen Kormophyten gegen veränderte Umweltbedingungen zu wappnen (Krishnamurthy et al., 2009; Kotula et al., 2009). Gleichzeitig sind sämtliche oberirdische Pflanzenorgane mit einer variablen Cutinschicht überzogen, um die Pflanze vor der Austrocknung zu schützen (Kolattukudy, 1996). Auch innerhalb von Geweben unterschiedlicher Funktion treten Einlagerungen von langkettigen Aliphaten auf. In der Wurzel hat die Endodermis z.B. die besondere Funktion durch die Suberineinlagerungen in den Zellwänden die Stele vom Cortex zu trennen (Peterson et al., 2003). Betrachtet man die Lokalisation von LTP2, so zeigen die *LTP2*-GUS-Expressions-Analysen eine Promotor-Aktivität innerhalb der Wurzeln und zwar insbesondere in den Zellen der Stele, inklusive des Pericycles und der parenchymatischen Xylemzellen. In den endodermalen Zellen ist keine GUS-Färbung zu beobachten (**Abbildung 14 C-I**). In diesem Gewebe könnte LTP2 eine maßgebliche Rolle bei dem Transfer von Aliphaten zur Trennschicht spielen. Die Promotoraktivität von *LTP2* außerhalb der Endodermis, sowie das Fehlen von *LTP2*-Transkripten in der Endodermis sprechen dem nicht entgegen (Endodermis-Microarrays in Genevestigator V3, <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>; Philip Benfey, Duke University, Durham, NC, USA). Die Fettsäureelongase DAISY, welche an der Biosynthese des aliphatischen Suberins beteiligt ist, zeigt in der Wurzel das gleiche *GUS*-Expressionsmuster wie LTP2. Die Autoren erklären eine Expression außerhalb der Endodermis dadurch, dass Zellen der Stele und des Perizykels gemeinsam an der Biosynthese und Deposition von Suberin beteiligt sind. Dass ein Gen an einem anderen Ort transkribiert wird, als das entsprechende Protein agiert, wurde bereits für die Enzyme der Biosynthese des Lignins gezeigt (Franke et al., 2000). Allerdings gelten in der Literatur bislang Theorien zur metabolische Plastizität im Zuge der Bildung der sekundärer Zellwände als hochgradig spekulativ (Franke et al., 2009). Alternativ könnte eine

Translokalisierung des Proteins von der Stele zur Endodermis stattfinden (Franke et al., 2009; Nakajima et al., 2001). Solch eine interzelluläre Protein-Bewegung wurde für wurzelspezifische Proteine bereits oftmals beobachtet (Lee et al., 2006). Ob allerdings *LTP2* in einem anderen Gewebe exprimiert wird, als am Ort des Bedarfs bleibt fraglich.

Bei mechanischer Verwundung, sowie beim Abwurf von Blütenteilen oder Blattorganen treten um Wasser- sowie Nährstoffverlust zu minimieren und die Pflanze von der Umgebung abzugrenzen sekundäre Zellwand-Modifikationen auf. Im Zuge der Versiegelung, wie z.B. der Suberinisierung bzw. Lignifizierung, werden an der Wundperipherie langkettige Aliphaten angelagert (Kolattukudy, 2001). Werden Blattorgane oder Blütenteile abgeworfen, wird die sogenannte Abscissionsschicht gebildet. Diese Trennschicht ist aus dünnen Zellen mit schwachen Zellwänden aufgebaut. Der Trennschicht aufgelagert, sind Lagen aus Zellen mit suberinierten Zellwänden, die die Trennstelle versiegeln noch bevor das Blatt oder die Frucht abfällt. Das pflanzliche Gewebe kann so vollständig von der Umgebung abgeschlossen werden (Narbors, 2007). In dieser Arbeit wird über GUS-Analysen gezeigt, dass vor dem Abwurf der alternden Pflanzenteile in der Abscissionsschicht von Sepalen, Petalen und Schoten der *LTP2*-Promotor stark induziert ist (**Abbildung 13 A-F**). Des Weiteren konnte bereits in der Diplomarbeit von Stefanie Saupe gezeigt werden, dass die Expression von *LTP2* durch Verwundung induziert wird. Dies sind mögliche Indizien für die Beteiligung von *LTP2* an der Einlagerung langkettiger Aliphaten in die Abscissionsschicht. Eine weitere pflanzliche Grenzschicht in die langkettige Aliphaten, wie *LTP2* sie transferieren kann, integriert werden, ist das suberinartige Polymer der Stigmata von *Arabidopsis thaliana* Blüten. Typische Enzyme der Biosynthese von Suberin, wie z.B. die Fettsäureelongase *DAISY*, werden sehr stark in den Papillen des Stigmas exprimiert (Franke et al., 2009). Die Autoren erklären dies durch den Wundheilungsprozess nach dem Eindringen des vom rehydrierten Pollen ausgehenden Pollenschlauchs in die Zellwand der Stigmazelle (Franke et al., 2009). Der Pollenschlauch wächst dann in Richtung Griffel, während gleichzeitig nach der Zellwand-Degradation an den Wundrändern Suberin eingelagert wird (Franke et al., 2009). Ebenso wie *DAISY* lokalisiert *LTP2* in den Papillen des Stigmas (**Abbildung 13 A-F**). Die GUS-Expressionsanalysen zeigen, dass *LTP2* kontinuierlich und nicht nur als Antwort auf eine Befruchtung in allen Entwicklungsschritten in den Papillen des Stigmas exprimiert wird (**Abbildung 13 A-F**). An der Suberinisierung, im Wundheilungsprozess von Stigmazellen, kann *LTP2* folglich nicht beteiligt sein. Das nächste Homolog zu *LTP2*, *LTP1* ist in den Zellwänden des Stigmas lokalisiert (Thoma et al., 1993). *Arabidopsis* besitzt ein sogenanntes trockenes Stigma, das von einer

kontinuierlichen Cutinschicht überzogen ist (Swanson et al., 2004). Die in allen Entwicklungsstadien der Blüte vorhandene *LTP2*-Promotoraktivität könnte z.B. darauf hinweisen, dass *LTP2* an der Assemblierung lipophilen Komponenten in den Papillen des Stigmas beteiligt sein könnte.

Neben der mechanischen Verwundung können durch Mikroorganismen pflanzliche Grenzschichten auch indirekt perforiert werden. Mittels *Agrobacterium tumefaciens* induzierte Wurzelhalsgallen an *Arabidopsis thaliana* besitzen durch Zellstreckungs- und Proliferationsprozesse keine intakte Epidermis und folglich auch keine durchgängige Cuticula. Um die Tumore gegen transpirationsbedingtem Wasserverlust und somit vor der Austrocknung zu schützen werden langkettige Aliphaten in den äußersten Zellschichten eingelagert (Efetova et al., 2007). Deren Akkumulation an der Tumoroberfläche wird, wie auch nach mechanischer Verletzung um Verwundungsareale, durch das pflanzliche universelle Stresshormon ABA induziert (Efetova et al., 2007; Birkenmeier & Ryan, 1998). Efetova et al. (2007) konnten zeigen, dass fünf Tage nach ABA-Applikation zu Wurzelkulturen eine Suberinisierung, sprich eine Einlagerung langkettiger Aliphaten, innerhalb der Wurzel stattfindet.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob *LTP2* am Aufbau von Suberin beteiligt sein könnte, wurde das Experiment nach Efetova et al., (2007) wiederholt und der Effekt der Suberin-Induktion auf die *LTP2*-Gen-Expression analysiert. Der signifikante Anstieg der Expression von *LTP2* fünf Tagen nach ABA-Applikation weist auf eine langfristige Reaktion hin, die nicht unmittelbar auf ABA zurückzuführen ist, und somit im Zusammenhang mit dem Wundverschluss bzw. der Einlagerung langkettiger Aliphaten stehen könnte (**Abbildung 18 A**). Der Verlust von *LTP2*-Transkripten führt jedoch zu keiner veränderten Zusammensetzung des Suberins von Tumoren (**Abbildung 27-29**). Im Wildtyp-Tumor-Gewebe ist die aliphatische und aromatische Suberin-Zusammensetzung vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Werten (**Abbildung 28-29**; Schreiber et al, 2005; Efetova et al, 2007). Vergleichswerte für langkettige Aliphaten liegen nicht vor.

Eine hochgradig spekulative Erklärung wäre, dass *LTP2* Aliphaten transferiert, die für ganz bestimmte Zeitpunkte des Wundverschlusses benötigt werden. Daraus könnte eine veränderte Ultrastruktur des Polymers resultieren. Eine veränderte Ultrastruktur pflanzlicher Polymere kann wiederum eine Erhöhung der Wasserdurchlässigkeit bewirken (Serra et al., 2009). So wurde z.B. für die Cuticula gezeigt werden, dass eine Veränderung der Ultrastruktur, ungeachtet der Menge der Wachseladung, zu einer Erhöhung der Wasserdurchlässigkeit führt (Xiao et al, 2004; Li et al, 2008). Bei einem *LTP2*-Verlust könnte somit durch die veränderte Struktur der

Transpirationsbarriere eine erhöhte Wasserpermeabilität resultieren. Durch den resultierenden permanenten Trockenstress entstehen dann deutlich kleine Tumore als am Wildtyp.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt, dass LTP2 eine prädominante Funktion bei der Entwicklung von Tumoren besitzen muss, da bei einem Verlust von LTP2 sich kaum noch Tumore bilden (**Abbildung 20**). Welche exakte Rolle LTP2 dabei aber einnimmt ist hochgradig spekulativ. Allerdings kann postuliert werden, dass LTP2 langkettige Aliphaten im Apoplasten transferiert.

Für die Beteiligung von LTP2 an dem Transfer von langkettigen Aliphaten in den extrazellulären Raum beim Wundverschluss (mechanische Verwundung, Abwurf von Pflanzenteilen), bei der internen Gewebsabgrenzung, sowie bei der externen Abgrenzung zur Umwelt (Papillen ggf. Tumor) sprechen:

- 1) Die Gen-Expression im entsprechenden Gewebe unter Bedingungen, die Zellwandmodifikationen verlangen (**3.2.1**).
- 2) Die subzelluläre Lokalisation in der Plasmamembran (**3.5**).
- 3) Die Protein-Lipid-Overlay-Analysen, welche zeigen, dass LTP2 langkettige Aliphaten (C<sub>22</sub>-C<sub>28</sub>) binden kann (**3.9.2**).
- 4) Die Transgenen mit ektopischer *LTP2*-Expression in epidermalen Zellen (CER5<sub>Prom</sub>::LTP2), welche in Wachsen von Rosettenblättern C<sub>24</sub>- bzw. C<sub>26</sub>-Fettsäuren akkumulieren (**3.8**).

LTP2 könnte demnach auf Basis der Indizien als Transferprotein von langkettigen Aliphaten agieren, die für den Aufbau sekundärer Zellwände benötigt werden.



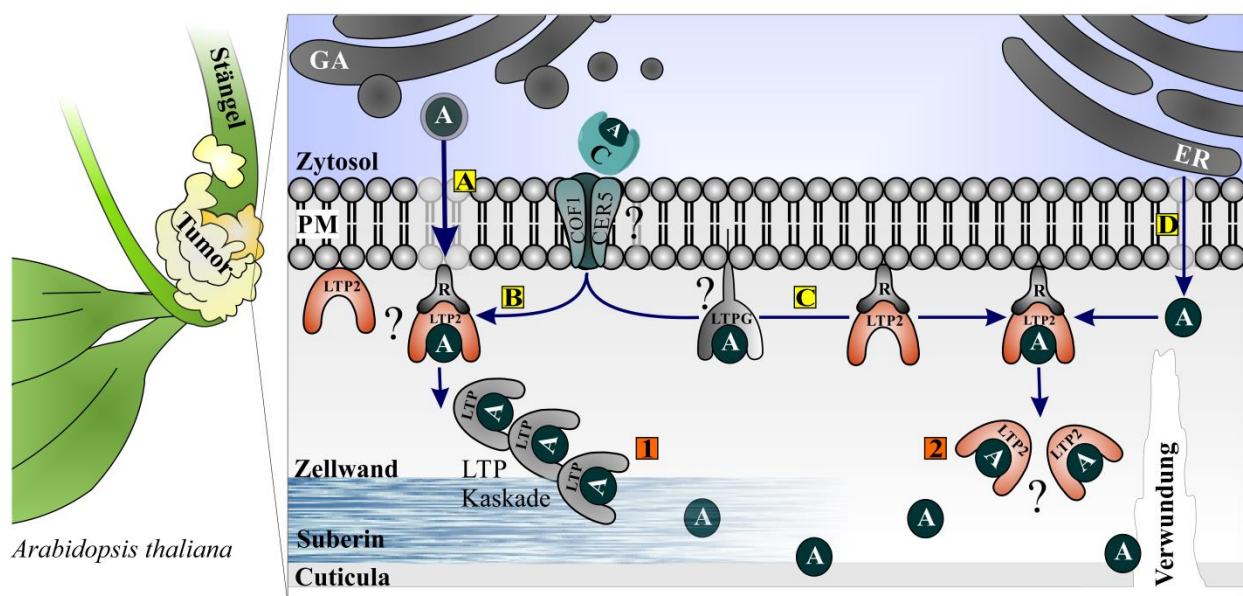
### **4.3. Resümee: LTP2 ist ein Transferprotein von unverzweigten, langkettigen Aliphaten, welche zur Zellwandversiegelung benötigt werden**

Für die Beteiligung von LTP2 am Transfer von unverzweigten, langkettigen Aliphaten lässt sich auf Grundlage der vorliegenden Arbeit folgendes Modell vorschlagen:

Das LTP2-Protein besitzt weder einen Glykosylphosphatidyl-Anker (GPI-Anker) noch Transmembrandomänen. Eine Assoziation mit der Plasmamembran als peripheres Protein wäre theoretisch über eine Kombination aus elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen möglich. Solch eine Anlagerung wäre allerdings hoch-dynamisch. Für andere Spezies, wie z.B. Reis konnte eine Anlagerung eines LTPs (nsLTP110) an die Plasmamembran mittels eines Rezeptors gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe stellt in ihrer Veröffentlichung die Hypothese auf, dass ein LTP-Lipid-Komplex über das Lipidtransferprotein an Rezeptoren der Plasmamembran assoziiert ist. Nach einem Stimulus, wie z.B. Pathogenbefall konkurrieren exogene Liganden mit dem Rezeptor und bewirken das Ablösen des LTP-Lipid-Komplexes von dem Rezeptor. In der Folge könnten Abwehrreaktionen durch das Neubesetzen des Rezeptors ausgelöst werden (Wang et al., 2009).

Wenn allerdings LTP2 mit seiner Fracht, dem Aliphaten, beladen ist und von der Plasmamembran in welcher Form auch immer abgespalten wird, könnte das Protein Aliphaten zum aufbauenden Biopolymer an der Verwundungsstelle wie z.B. Cutin oder auch Suberin entlassen. Allerdings hätte dann ein signifikanter Anteil des LTP2-Proteins in der Zellwand lokalisiert sein müssen, wie es z.B. für das GPI-Anker Protein COBRA (At5g60920) beschrieben ist, das eine essentielle Funktion bei der Cellulose Produktion und Deposition einnimmt (Schindelman et al., 2001; Roudier et al., 2005). Allerdings ist es auch möglich, dass erst als Reaktion auf einen Stimulus das frei gewordene LTP2-Protein in der Zellwand detektiert werden kann. In Anlehnung an die Ergebnisse von Wang et al., 2009 und Buhot et al., 2001, die beide zeigten, dass ein LTP an einen Elicitin-Rezeptor auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran bindet, wird auch in diesem Modell von der Bindung an einem extrazellulären Rezeptor ausgegangen (**Abbildung 41**).

LTP2 kann auf unterschiedliche Weise mit langkettigen, unverzweigten Aliphaten beladen werden. Möglich ist eine Beladung über Vesikel ausgehend vom Golgi-Apparat. Diese verschmelzen mit der Plasmamembran und entlassen Lipide auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran, wo sie von LTP2 aufgenommen werden (**Abbildung 41 A**). Eine Beladung ist auch durch einen Carrier-vermittelten Transfer der langkettigen, unverzweigten Aliphaten zur Plasmamembran möglich. Die Aliphaten, welche über einen ABC-Transporter (engl.: „*ATP binding cassette*“; ABC) durch die Plasmamembran geschleust werden, könnten auf der apoplastischen Seite entweder direkt von LTP2 aufgenommen (**Abbildung 41 B**), oder auf ein an der Plasmamembran mittels dem GPI-Anker assoziiertes Lipidtransferprotein (LTPG) übertragen werden (**Abbildung 41 C**). Das LTPG könnte dann die Aliphaten weiter zu dem an einem Rezeptor gebundenen LTP2 übertragen (**Abbildung 41 C**). Nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch Kontaktstellen mit dem Endoplasmatischen Retikulum Lipide in den Apoplasten gelangen, die dann von LTP2 aufgenommen werden könnten (**Abbildung 41 D**).



**Abbildung 41** Modell für die Beladung von LTP2 (A-D) und dem Transport von langkettigen, unverzweigten Aliphaten (1-2) durch die Zellwand. (A) Beladung über Golgi-Vesikel; (B) Beladung über Carrier und ABC-Transporter (aus COF1 und CER5); (C) Beladung über LTPGs, (D) Beladung über Kontaktstellen zwischen ER und PM. (1) Transport über LTP Kaskade; (2) Transport über lösliches, freies LTP. A: langkettiger, unverzweigter Aliphater; ABC: **A**BC-Transporter; C: **C**arrier; ER: **E**ndoplasmatisches **R**etikulum; GA: **G**olgi-Apparat; LTP: **L**ipidtransferprotein; LTP2: **L**ipidtransferprotein **2**; LTPG: **L**ipidtransferprotein mit **G**PI-Anker; PM: **P**lasmamembran; R: **R**ezeptor.

Für den weiteren Transfer der Lipide innerhalb des Apoplasten, zu den Biopolymeren (Suberin, Cutin etc.) gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Zum einen könnte LTP2 durch einen bestimmten Stimulus wie z.B. Verwundung oder durch Agrobakterium ausgelöste Pathogensignale vom Rezeptor verdrängt werden (in Anlehnung an Wang et al., 2009 und Buhot et al., 2001). Die Lipid-Bindung selbst könnte ebenso das Signal der Freilassung von LTP2 sein. Dadurch wäre das ungebundene LTP2 selbst am Transfer der Aliphaten durch den Apoplasten beteiligt (**Abbildung 41; 1**). Des Weiteren könnten die Polymer-Monomere über eine LTP-Kaskade, miteinander verbundener LTPs, zu dem sich aufbauenden Polymer an der Verwundungsstelle transferiert werden (**Abbildung 41; 2**).

## 5. Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte im Groben das Lipidtransferprotein 2 aus *Arabidopsis thaliana* funktionell charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass LTP2 in der Plasmamembran lokalisiert, im Vergleich zu LTP1, dass als Zellwand-Protein charakterisiert wurde (Thoma et al., 1993). Um Hinweise für eventuelle Bindepartner, die LTP2 an der Plasmamembran assoziieren könnten oder auch für die postulierte „Lipidtransferproteinkette“ zu finden, bieten sich Protein-Protein-Interaktionsstudien an. Dafür sollte ein umfassender Interaktions-Screen von LTP2 mit allen bisher bekannten Lipidtransferproteinen durchgeführt werden. In der Praxis bietet sich für die Durchführung von Protein-Protein-Interaktionsstudien das Yeast-Two-Hybrid-System an. Eine alternative oder auch zusätzliche Strategie ist die sogenannte FRET-Methode (engl.: „*fluorescence resonance energy transfer*“). Im Anschluss könnte eine detaillierte Charakterisierung der Interaktion über die Surface Plasmon Resonanz Technik erfolgen. Ob LTP2 eventuell an einen membrangebundenen Rezeptor assoziiert ist und erst als Antwort auf einen bestimmten Stimulus in den Apoplasten entlassen wird ließe sich *in planta* durch eine Kombination von Stress-Applikation und anschließender subzellulärer Immunodetektion eines LTP2-Marker-Epitops klären. Im Rahmen des vorliegenden Projektes ist es nicht gelungen LTP2 mit einer C-terminalen V5-Fusion unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Blumenkohlmosaikvirus *in planta* zu exprimieren. Bei der Verwendung des endogenen Promotors zur Expression von LTP2 mit C-terminaler AcV5-Fusion konnten zwar Transkripte gemessen werden, das LTP2-AcV5-Fusionsprotein wurde jedoch nicht detektiert. Es bietet sich nun die Verwendung eines zwar starken aber induzierbaren Promotors an, um einen LTP2-Marker-Epitop zu exprimieren und Rückschlüsse auf eine eventuelle Mobilität des Proteins als Antwort auf einen Umweltstimulus zu finden.

Weiterhin ungeklärt sind zudem die Mechanismen der Beladung des Lipidtransferproteins. Erfolgt diese bereits am Ort der Synthese, oder wird LTP2 *de novo* im Apoplasten beladen – vielleicht sogar von einem LTPG? Die tatsächliche Struktur von LTP2 könnte Informationen über die Plastizität und Stabilität des hydrophoben Tunnels des Proteins bieten. Vielleicht könnte dann bereits eine Beladung im Apoplasten ausgeschlossen werden. Dafür müsste LTP2 jedoch erst kristallisiert werden.

Eine komplett neue Fragestellung die sich im Rahmen dieses Projektes ergeben hat ist, welcher Zusammenhang zwischen LTP2 und Sphingolipiden besteht. Ist es wirklich nur ein indirekter Effekt der Reduktion der *LTP2*-Transkripte, der sich derart gravierend auf den Sphingolipid-Pool auswirkt, oder besteht doch eine direkte Verknüpfung? Hier bietet sich eine umfassende

Untersuchung von Mutanten definierter Enzyme des Sphingolipidmetabolismus an. Ein erster Schritt könnten Transkriptanalysen von *LTP2* innerhalb dieser Mutanten sein.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aerts M., Jacobs M., Hernalsteens J.P., Van Montague M., Schell J.** (1979). Induction and *in vitro* culture of *Arabidopsis thaliana* crown gall tumors. Plant Sci. Let. **17**: 43-50.
- Agullo C., Collar C., Seoane E.** (1984). Free and bound hydroxyl and carboxyl groups in the cutin of *Quercus suber* leaves. Phytochemistry **23**: 2059–2060.
- Alderson N.L., Walla M.D., Hama H.** (2005) A novel method for the measurement of *in vitro* fatty acid 2-hydroxylase activity by gas chromatography-mass spectrometry. J. Lipid Res. **46**: 1569–1575.
- Aloni R., Pradel K.S., Ullrich C.I.** (1995). The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. Planta **196**: 597-605.
- Altschul S.F.** (1997). Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments. *In* Theoretical and Computational Methods in Genome Research. (S. Suhai, ed.), 1-14, Plenum, New York.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature **14**: 796-815.
- Aronel V., Vergnolle C., Cantre C., Kader J.-C.** (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. **157**: 1–12.
- Beaudoin F., Wu X., Li F., Haslam R.P., Markham J.E., Zheng H., Napier J.A., Kunst L.** (2009). Functional Characterization of the *Arabidopsis*  $\beta$ -Ketoacyl-Coenzyme A Reductase Candidates of the Fatty Acid Elongase. Plant Physiol. **150(3)**: 1174-1191.
- Beisson F., Koo A.J., Ruuska S., Schwender J., Pollard M., Thelen J.J., Paddock T., Salas J.J., Savage L., Milcamps A.** (2003). *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. Plant Physiol. **132**: 681– 697.
- Beisson F., Li-Beisson Y., Pollard M.** (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol. **15**: 329–37.
- Benjamins R. & Scheres B.** (2008). Auxin: The looping star in plant development. Annu. Rev. Plant Biol. **59**: 443–465.
- Berkey R., Bendigeri D., Xiao S.** (2012). Sphingolipids and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. Front. Plant Sci. **3**: 68.
- Bernard A. & Joubès J.** (2013). *Arabidopsis* cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. Progr. In Lipid Res. **52(1)**: 110-29.
- Bernards M. A.** (2002). Demystifying suberin. Can. J. Bot. **80**: 227–240.
- Bernhard W., Thoma S., Botella J., Somerville C.R.** (1991). Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. Plant Physiol. **95**: 164–70.

- Bird D., Beisson F., Brigham A., Shin J., Greer S., Jetter R.** (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. Plant J. **52**: 485–98.
- Birkenmeier G.F., Ryan C.A.** (1998). Wound signaling in tomato plants. Evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. Plant Physiol. **117**: 687–693.
- Birnboim H.C. & Doly J.A.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. **7**: 1513-1523.
- Blume B., Grierson D.** (1997). Expression of ACC oxidase promoter–GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. The Plant Journal **12**: 731–746.
- Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D., Satiat-Jeunemaitre B.** (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. Journal of Microscopy **214**: 159–173.
- Bonaventure G., Beisson F., Ohlogge J., Pollard M.** (2004). Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with Arabidopsis epidermis: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component. Plant J. **40**: 920–930.
- Boutrot F., Chantret N., Gautier M.F.** (2008). Genome-wide analysis of the rice and Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLTP) gene families and identification of wheat nsLTP genes by EST data mining. BMC Genomics **9**: 86.
- Brodersen P., Petersen M., Pike H.M., Olszak B., Skov S., Odum N., Jorgensen L.B., Brown R.E., Mundy J.** (2002). Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. Genes Dev. **16**: 490–50210.
- Buhot N., Gome`s E., Milat M.-L., Ponchet M., Marion D., Lequeu J.** (2004). Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. Mol. Biol. Cell **15**: 5047–52.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. BioTechniques **5**: 376-378.
- Carrasco S., Meyer T.** (2011). STIM proteins and the endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions. Ann. Rev. Biochem. **80**: 973–1000.
- Chae K., Kieslich C., Morikis D., Kim S., Lord E.M.** (2009). A gain-of-function mutation of Arabidopsis lipid transfer protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization. The Plant Cell **21**: 3902–3914.
- Charvolin D., Douliez J.P., Marion D., Cohen-Addad C., Pebay-Peyroula E.** (1999). The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. Eur. J. Biochem. **264**: 562–568.
- Chen M., Cahoon E.B., Saucedo-Garcia M., Plasencia J., Gavilanes-Ruiz M.** (2009). Plant sphingolipids: structure, synthesis, function. Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions, H. Wada and N. Murata,eds. (New York: Springer Science), 77–115.

- Chen M., Markham J.E., Cahoon E.B.** (2012). Sphingolipid  $\Delta 8$  unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. Plant J. **69**(5): 769-81.
- Clough S.J. & Bent A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **16**: 735-43.
- Da Silva V.A., Landon C., Industri B., Marais A., Marion D., Ponchet M., Vovelle F.** (2005) Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features. Proteins **59**: 356-367.
- DeBono A., Yeats T.H., Rose J.K.C., Bird D., Jetter R., Kunst L.** (2009). *Arabidopsis* LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of Kolattukudy lipids to the plant surface. Plant Cell **21**: 1230–8.
- Deeken R., Engelmann J.C., Efetova M., Czirjak T., Müller T., Kaiser W.M., Tietz O., Krischke M., Mueller M.J., Palme K., Dandekar T., Hedrich R.** (2006). An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: A genome-wide approach. Plant Cell **18**: 3617-3634.
- Désormeaux A., Blochet J.E., Pézolet M., Marion D.** (1992). Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy: role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the  $\alpha$ -helix structure. Biochim. Biophys. Acta **1121**: 137–52.
- Dong H.S., Lee J.Y., Hwang K.Y., Kim K.K., Suh W.S** (1995). High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. Structure **2**: 189-199.
- Dowler S., Kular G., Alessi D.R.** (2002). Protein Lipid Overlay Assay. Sci. STKE **129**:14.
- Dunkley T.P.J., Hester S., Shadforth I.P., Runions J., Weimar T., Hanton S.L., Griffin J.L., Bessant C., Brandizzi F., Hawes C., Watson R.B., Dupree P., Lilley K.S.** (2006). Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. PNAS **103**(17): 6518–6523.
- Dunn T.M., Lynch D.V., Michaelson L.V., Napier J.A.** (2004). Apost-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Ann. Bot. **93**: 483–497.
- Edstam M.M., Viitanen L., Salminen T.A., Edqvist J.** (2011). Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. Mol. Plant. **4**(6): 947-64.
- Efetova M., Zeier J., Riederer M., Stingl N., Müller M., Hartung W., Hedrich R., Deeken R.** (2007). Central role of ABA in drought stress protection of *Agrobacterium*- induced tumours on *Arabidopsis*. Plant Physiol. **145**(3): 853-62.
- Espelie K.E., Davis R.W., and Kolattukudy P.E.** (1980). Composition, ultrastructure and function of the cutin-containing and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit. Planta **149**: 498–511.
- Fang X., Qiu F., Yan B., Wang H., Mort A.J., Stark R.E.** (2001). NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. Phytochemistry **57**: 1035–1042.
- Fischer U., Men S., Grebe M.** (2004). Lipid function in plant cell polarity. Curr. Opin. Plant Biol. **7**: 670–676.



- Franke R., Briesen I., Wojciechowski T., Faust A., Yephremov A., Nawrath C., Schreiber L.** (2005). Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues—a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **66**: 2643–2658.
- Franke R., Hofer R., Briesen I., Emsermann M., Efremova N., Yephremov A. Schreiber L.** (2009). The DAISY gene from Arabidopsis encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalazamicrophyte region of seeds. *Plant J.* **57**: 80–95.
- Gorjanović S., Sužnjević D., Beljanski M., Hranisavljević J.** (2004). Barley lipid-transfer protein as heavy metal scavenger. *Environm. Chem. Letters* **2**: 113–116.
- Graça J., Schreiber L., Rodrigues J., Pereira H.** (2002). Glycerol and glyceryl esters of  $\omega$ -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* **61**: 205–215.
- Graça J. & Santos S.** (2007). Suberin: A biopolyester of plants' skin. *Macromol. Biosci.* **7**: 128–135.
- Grefen C., Donald N., Hashimoto K., Kudla J., Schumacher K., Blatt M.R.** (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* **64**(2): 355–65.
- Hamilton R.H. & Fall M.Z.** (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia.* **27**: 229–230.
- Han G.W., Lee J.Y., Song H.K., Chang C., Min K., Moon J.** (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipidtransfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **308**: 263–78.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**(4): 557–580.
- Hauke V., Schreiber L.** (1998). Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* **207**: 67–75.
- Heredia A.** (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* **1620**: 1–7.
- Holloway P.J.** (1983). Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry* **22**: 495–502.
- Imai H., Morimoto Y., Tamura, K.** (2000). Sphingoid base composition of monoglucosylceramide in Brassicaceae. *J. Plant Physiol.* **157**: 453–456.
- Irshad M., Canut H., Borderies G., Pont-Lezica R., Jamet E.** (2008). A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: Confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biology* **8**: 94.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W.** (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901 – 3907.
- Jeffree C.E.** (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G, ed. Plant cuticles: an integrated functional approach. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers Ltd, 33–82.

- Jenks M.A., Tuttle H.A., Rashotte A.M., Feldmann K.A.** (1996). Mutants in *Arabidopsis* altered in epicuticular waxes and leaf morphology. Plant Physiol. **110**(1):377–385.
- Jenks M.A., Eigenbrode S.D., Lemieux B.** (2002). Cuticular waxes of *Arabidopsis*. Journal Cell Biology **17**: 208-212.
- Jetter R. & Schäffer S.** (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. Plant Physiol. **126**: 1725-1737.
- Jetter R., Kunst L., Samuels A.L.** (2006). Composition of plant cuticular waxes. Müller C., Riederer M., eds. *Biology of the plant cuticle*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 145-181.
- Johnson H.B.** (1975). Plants pubescence: an ecological perspective. Botanical Review **41**: 233-253.
- Jung H.W., Tschaplinski T.J., Wang L., Glazebrook J., Greenberg J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. Science **324**: 89-91.
- Kader J.-C.** (1996). Lipid-transfer proteins in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**: 627-654.
- Karlin S. & Altschul S.F.** (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc. Natl. Acad. Sci. **87**: 2264-2268.
- Karlin S. & Altschul S.F.** (1993). Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. **90**: 5873-5877.
- Kasahara A., Morisaki H., Hattori T.** (1993). Hydrophobicity of the cells of fast- and slow-growing bacteria isolated from a grassland soil. J. Gen. Appl. Microbiol. **39**: 381–388.
- Kim H., Lee S.B., Kim H.J., Min M.K., Hwang I., Suh M.C.** (2012). Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 (LTPG2) and overlapping function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in cuticular wax export or accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **53**(8): 1391-403.
- King E. O., Ward M. K., Raney D. E.** (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. **44**: 301–307.
- Klee H., Montoya A., Horodyski F., Lichtenstein C., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Peschon J., Nester E., Gordon M.** (1984). Nucleotide sequence of the *tms* genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: two gene products involved in plant tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 1728-1732.
- Kolattukudy P.E., Kronman K., Poulouse A.J.** (1975). Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Plant Physiol **55**: 567-573.
- Kolattukudy P.E.** (1996). Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. Kerstiens G ed; *Plant cuticle: an integrated functional approach*. BIOS scientific publishers, Oxford: 83-108.
- Kolattukudy P.E.** (2001). Suberin from plants. *Biopolymers vol 3. Polyesters 1. Biological Systems and Biotechnological Production*. Wiley: 41–68.

- Koncz C., & Schell J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. **204**: 383-396.
- Koornneef M., Hanhart C.J., Thiel F.** (1989). A genetic and phenotypic description of eceriferum (*cer*) mutants in *Arabidopsis thaliana*. J. Hered. **80**: 118–122.
- Kotula L., Ranathunge K., Steudle E.** (2009). Apoplastic barriers effectively block oxygen permeability across outer cell layers of rice roots under deoxygenated conditions: roles of apoplastic pores and of respiration. New Phytol. **184**: 909–917.
- Krishnamurthy P., Ranathunge K., Franke R., Prakash H.S., Schreiber L., Mathew M.K.** (2009). The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). Planta **230**: 119–134.
- Kryvych S., Nikiforova V., Herzog M., Perazza D., Fisahn J.** (2008). Gene expression profiling of the different stages of *Arabidopsis thaliana* trichome development on the single cell level. Plant Physiol. Bioch. **46**: 160-173.
- Kunst L. & Samuels A.L.** (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Prog. Lipid. Res. **42**: 51–80.
- Kurdyukov S., Faust A., Nawrath C., Bär S., Voisin D., Efremova N., Franke R., Schreiber L., Saedler H., Métraux J.-P.** (2006). The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. Plant Cell **18**: 321–339.
- Lee J.Y. , Colinas J. , Wang J.Y., Mace D., Ohler U., Benfey P.N.** ( 2006 ). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in *Arabidopsis* roots Proc. Natl. Acad. Sci. **103**: 6055 - 6060.
- Lee S.B., Go Y.S., Bae H.-J., Park J.H., Cho S.H., Cho H.J.** (2009). Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. Plant Physiol. **150**: 42–54.
- Li F., Wu X., Lam P., Bird D., Zheng H., Samuels L.** (2008). Identification of the wax 1439 ester synthase/acyl-CoenzymeA: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **148**: 97–107.
- Lichtenstein C., Klee H., Montoya A., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Nester E., Gordon M.** (1984). Nucleotide sequence and transcript mapping of the *tmr* gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. J. Mol. Appl. Genet. **2**: 354-362.
- Liu Y., Schiff M., Dinesh Kumar S.** (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. Plant J. **31**: 777-786.
- Lynch D.V.** (2000). Enzymes of sphingolipid metabolism in plants. Methods in Enzymology **311**: 130–149.
- Lynch D.V. & T.M. Dunn** (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. New Phytologist **161**: 677-702.
- Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J., Cameron R.K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. Nature **419**: 399–403.

- Malinina L., Malakhova M.L., Teplov A., Brown R.E., Patel D.J.** (2004). Structural basis for glycosphingolipid transfer specificity. *Nature* **430**: 1048.
- Markham J.E., Li J., Cahoon E.B., Jaworski J.G.** (2006). Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J. Biol. Chem.* **281**: 22684–22694.
- Markham J.E., Molino D., Gissot L., Bellec Y., Hematy K., Marion J., Belcram K., Palauqui J.C., Satiat-Jeunemaitre B., Faure J.D.** (2011). Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 2362-2378.
- Markham J.E.** (2013). Sphingolipid synthesis. *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists. Vol. **11**: 11-13.
- Markham J.E., Lynch D. V., Napier J. A., Dunn T. M., Cahoon E. B.** (2013). Plant sphingolipids: function follows form. *Cur. Opin. in Plant Biol.*
- Meijer E.A., De Vries S.C., Sterk P., Gadella Jr. D.W.J., Wirtz K.W.A., Hendriks T.** (1993). Characterization of the non-specific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.). *Mol. Cell Biochem.* **123**: 159-166.
- Miguel M., Block M., Joyard J., Dorne A.J., Dubacq J.P., Kader J.-C., Douce R.** (1987) Protein-mediated transfer of phosphatidylcholine from liposomes to spinach chloroplast envelope membranes. *Biochim Biophys Acta* **937**: 219-228.
- Mitchell, P.J., & Tjian, R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371–378.
- Molina A. & Garcia-Olmedo F.** (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J.* **12**: 669–675.
- Molina I., Ohlrogge J.B., Pollard M.** (2008). Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **53**: 437–449.
- Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.** (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**: 1–30.
- Nakajima K., Sena G., Nawy T., Benfey P.N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413(6853)**: 307-11.
- Narbors W.** (2007). Botanik. Pearson Deutschland GmbH
- Nieuwland J., Feron R., Huisman B., Fasolino A., Hilbers C., Derksen J., Mariani** (2005). Lipid Transfer Proteins Enhance Cell Wall Extension in Tobacco. *Plant Cell* **17**: 2009-2019.
- Nour-Eldin H.H., Hansen B.G., Norholm M.H., Jensen J.K., Halkier B.A.** (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* **34**: 122.
- Ogata K., Sato, K., Tahirov, T.H.** (2003). Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 262.
- Park S.Y., Jauh G.Y., Mollet J.C., Eckard K.J., Nothnagel E.A., Walling L.L., Lord E.M.** (2000). A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* **12**: 151–164.
- Pata M.O., Hannun Y.A., Ng C.K.-Y.** (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* **185**: 611–630.
- Petersen M., Brown R.E., Mundy J.** (2008). Human GLTP and mutantforms of ACD11 suppress cell death in the Arabidopsis acd11 mutant. *FEBS J.* **275**: 4378–4388.

- Peterson C. A. & Cholewa E.** (1998). Structural modifications of the apoplast and their potential impact on ion uptake. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **161**: 521–531.
- Peterson C.A.** (2003). Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. Can. J. Bot. **81**: 405-421.
- Pighin J.A., Zheng H., Balakshin L.J., Goodman I.P., Western T.L., Jetter R., Kunst L., Samuels A.L.** (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. Science **306**: 702–704.
- Pyee J. & Kolattukudy P.E.** (1995). The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. Plant J. **7**: 49–59
- Rahmat A.** (2002). Somatische Embryogenese und Gentransfer bei ausgewählten Tannenarten (Gattung *Abies* Mill.), Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Ranathunge K., Schreiber L., Franke, R.** (2011). Suberin research in the genomics era-new interest for an old polymer. Plant Sci. **180**: 399-413.
- Rashotte A., Jenks M., Ross A., Feldmann K.** (2004). Novel eceriferum mutants in *Arabidopsis thaliana*. Planta **219**: 5–13.
- Rickers J., Spener F., Kader J.-C.** (1985). A Phospholipid transfer protein that binds long-chain fatty acids. FEBS Letters **180**: 2942.
- Romeis T., Ludwig A.A., Martin R., Jones J.D.** (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. EMBO J. **20**: 5556-5567.
- Roudier F., Fernandez A.G., Fujita M., Himmelspach R., Borner G.H.H., Schindelman G., Song S., Baskin T.I., Dupree P., Wasteneys G.O.** (2005). COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. Plant Cell **17**: 1749–1763.
- Rowland O., Zheng H., Hepworth S.R., Lam P., Jetter R., Kunst L.** (2006). CER4 encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme a reductase involved in cuticular wax production in Arabidopsis. Plant Physiol. **142**: 866–77.
- Saitou N., Nei M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-25.
- Samuel D., Liu Y.-J., Cheng C.-S., Lyu P.-C.** (2002). Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). J. Biol. Chem. **277**: 35267-73.
- Samuels L., Kunst L., Jetter R.** (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. Annu. Rev. Plant Biol. **59**: 683–707.
- Sanchez-Monge R., Lombardero M., Garcia-Selles F.J., Barber D., Salcedo G.** (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. J. Allergy Clin. Immunol. **103**: 514-519.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. **74**: 5463-5467.
- Santos S., Graça J.** (2006). Glycerol- $\omega$ -hydroxyacid-ferulic acid oligomers in cork suberin structure. Holzforschung **60**: 171-177.
- Sasaki T.** (1985). Glycolipid-binding proteins. Chem. Phys. Lipids **38**: 63–7710.
- Schägger H.** (2006). Tricine SDS-PAGE. Nature Protocols **1**: 16-22.

- Schindelman G., Morikami A., Jung J., Baskin T.I., Carpita N.C., Derbyshire P., McCann M.C., Benfey P.N.** (2001). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis. *Genes Dev.* **15**: 1115–1127.
- Schmeil O., Fitchen J., Seibold S.** (2006). Flora von Deutschland und angrenzender Länder. Quelle & Meyer; Auflage: 93.; **ISBN-10**: 3494014132.
- Schönherr J. & Riederer M.** (1986). Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant, Cell and Environm.* **9**: 459–466.
- Schreiber L., Hartmann K., Skabs M., Zeier J.** (1999). Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* **50**: 1267–1280
- Schreiber L., Franke R., Hartmann K.** (2005). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* **220**: 520–530.
- Segura A., Moreno M., Garça-Olmedo F.** (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of Arabidopsis and spinach. *FEBS* **332**: 243–6.
- Serra O., Soler M., Hohn C., Sauveplane V., Pinot F., Franke R., Schreiber L., Prat S., Molinas M., Figueras M.** (2009). CYP86A33-targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function. *Plant Physiol.* **149**: 1050–1060.
- Sheen J.** (2002). A transient expression assay using Arabidopsis mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/protocols/AtprotoRL04.pdf>.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G.** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**: 539.
- Simanshu D.K., Brown R.E, Patel D.J** (2014). Arabidopsis accelerated cell death 11, ACD11 is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. *Cell Rep.* **6**: 388-399.
- Sperling P. & Heinz, E.** (2003). Plant sphingolipids: Structural diversity, biochemistry, first genes and functions – Review. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**: 1-15.
- Sperling P., Warnecke D., Heinz E.** (2004). Plant sphingolipids. M Hohmann, ed, Topics in Current Genetics, Vol 6. Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis. Springer Verlag, Berlin, 337–380.
- Sterk P., Schellekens G.A., Van Kammen A., De Vries** (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**: 907-921.
- Steudle E. & Peterson C. A.** (1998). How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* **49**: 775-788.
- Swanson R., Edlund A.F., Preuss D.** (2004). Species specificity in pollen–pistil interactions. *Annual Review of Genetics* **38**: 793–818.
- Szyroki A., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsma M., Ache P., Reintanz B., Deeken R., Godde M., Felle H., Steinmeyer R.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2917-2921.

- Thoma S., Kaneko Y., Somerville C.** (1993). A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. The Plant Journal **3(3)**: 427-436.
- Thoma S., Hecht U., Kippers A., Botella J., De Vries S., Somerville C.** (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. Plant Physiol. **105**: 35–45.
- Tsegaye Y., Richardson C.G., Bravo J.E., Mulcahy B.J., Lynch D.V., Markham J.E., Jaworski J.G., Chen M., Cahoon E.B., Dunn T.M.** (2007). *Arabidopsis* mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin-sensitive and accumulate trihydroxy-18:1 long chain base phosphate. J. Biol. Chem. **282**: 28195–28206.
- Tzfira T., Tian G.-W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y., Krichevsky A., Taylor T., Vainstein A., Citovsky V.** (2005). pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. Plant Mol. Biol. **57**: 503–516.
- Ukitsu H., Kuromori T, Toyooka K., Goto Y., Matsuoka K., Sakuradani E., Shimizu S., Kamiya A., Imura Y., Yuguchi M., Wada T., Hirayama T., Shinozaki K.** (2007). Cytological and biochemical analysis of COF1, an *Arabidopsis* mutant of an ABC transporter gene. Plant Cell Physiol. **48**: 1524-1533.
- Ullrich C.I. & Aloni R.** (2000). Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. J. Exp. Bot. **51**: 1951-1960.
- Uphof J.C.T.** (1962). Plant hairs. Encyc. of Plant Anat. IV. **5**: 1-206.
- Vanneste S. & Friml J.** (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. Cell **136**: 1005–1016
- Wang S., Wu J., Ng T., Ye X., Rao P.** (2004). A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. Peptides **25**: 1235–42.
- Wang X., Wang H., Li Y.** (2009). A rice lipid transfer protein binds to plasma membrane proteinaceous sites. Mol. Biol. Rep. **36(4)**:745-50.
- West M.A., Van Leeuwen H., Kozik A., Kliebenstein D.J., Doerge R.W., St Clair D.A., Michelmore R.W.** (2006). High-density haplotyping with microarray-based expression and single feature polymorphism markers in *Arabidopsis*. Genome Res. **16**: 787–795.
- Wirtz K.W.** (1991). Phospholipid transfer proteins. Annu. Rev. Biochem. **60**: 73-99.
- Xia Y., Gao Q.M., Yu K., Lapchyk L., Navarre D., Hildebrand D., Kachroo A., Kachroo P.** (2009). An intact cuticle in distal tissues is essential for the induction of systemic acquired resistance in plants. Cell Host Microbe **5**: 151–165.
- Xiao F.M., Goodwin S.M., Xiao Y.M., Sun Z.Y., Baker D., Tang X.Y., Jenks M.A., Zhou J.M.** (2004). *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. EMBO J. **23**: 2903–2913.
- Yeats T.H., Rose, J.K.C.** (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs) Protein Sci. **17**:191–198.
- Zachowski A., Guerbet F., Grosbois M., Jolliot-Croquin A., Kader J.-C.** (1998). Characterization of acyl binding by a plant lipidtransfer protein. Eur. J. Biochem. **257**: 443–8.
- Zhao J., Mollet J.C., Lord E.M.** (2003). Lily (*Lilium longiflorum*) pollen protoplast adhesion is increased in the presence of the peptide SCA. Sexual Plant Reproduction **16**: 1432-2145.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

A	Abscissionsschicht
ABA	Abscisinsäure (engl.: „ <i>abscisic acid</i> “)
ABC-Transporter	ABC-Transporter-Familie (engl.: „ <i>ATP-binding cassette</i> “)
AB-Minimalmedium	AB-Minimalmedium (engl.: „ <i>autoinducer bioassay medium</i> “)
Acetyl-CoA	<b>Acetyl-Coenzyme A</b>
ACT	Aktin (engl.: „ <i>actin</i> “)
ACP	<b>Acyl-Carrier-Protein</b>
AGI	Bezeichnung von Genloki (engl.: „ <i>Arabidopsis Genome Initiative</i> “)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bp	<b>Basenpaar</b>
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: „ <i>bovine serum albumine</i> “)
BY-2	Tabak Zellkultur-Linie („ <i>Bright Yellow-2</i> “)
°C	Grad Celsius
C	<b>Carrier</b>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: „ <i>complementary DNA</i> “)
CDS	kodierende Sequenz (engl.: „ <i>coding sequence</i> “)
Cer	Ceramide
CER	ohne Wachs (lat.: „ <i>eceriferum</i> “)
CL	Schicht der Cuticula (engl.: „ <i>cuticular layer</i> “)
Col-0	<b>Columbia</b>
Co	<b>Cortex</b>
CP	Haut der Cuticula (engl.: „ <i>cuticle proper</i> “)
CS	<b>Ceramid-Synthase</b>
Cys	<b>Cystein</b>
DNA	Desoxyribonuklein Säure (engl.: „ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
dNTP	Nukleosidtriphosphat (engl.: „ <i>desoxynucleoside triphosphate</i> “)



---

dpi	Tage nach der Infektion (engl.: „ <i>days post infection</i> “)
DTT	<b>D</b> ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: „ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> “)
En	<b>E</b> ndodermis
Ep	<b>E</b> pidermis
ER	Endoplasmatisches <b>R</b> etikulum
EWf	epicuticulären Wachsfilm
EWK	epicuticulärer Wachskristall
Exon	translationierter Genabschnitt (engl.: „ <i>expressed region</i> “)
FS	Fettsäure
fg	<b>F</b> emtogram
g	<b>G</b> ramm
GA	<b>G</b> olgi Apparat
GCG	<b>G</b> lcCer- <b>G</b> lucuronidase
GCS	<b>G</b> lucosyl- <b>C</b> eramid- <b>S</b> ynthase
gDNA	<b>g</b> enomische <b>DNA</b>
GIPC	<b>G</b> lycosyl- <b>I</b> nositol- <b>P</b> ospho- <b>C</b> eramid
GlcCer	<b>G</b> lycosyl <b>c</b> eramide
GPI-Anker	<b>G</b> lycosyl <b>p</b> hosphatidyl <b>i</b> nositol- <b>A</b> nker
GUS	$\beta$ - <b>G</b> lucuronidase
HCD	<b>H</b> ydroxy- <b>A</b> cyl- <b>C</b> oA- <b>D</b> ehydrase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: „ <i>high performance liquid chromatography</i> “)
Hy	<b>H</b> ypokotyl
HyCer	<b>H</b> ydroxy <b>c</b> eramide
Hz	<b>H</b> ertz
IPCS	<b>I</b> nositol- <b>P</b> hosphoryl- <b>C</b> eramid- <b>S</b> ynthase
Intron	nicht translationierter Genabschnitt (engl.: „ <i>intervening region</i> “)
K	Kilo

---

Ka	<b>K</b> ambium
KCR	<b>K</b> eto-Acyl-CoA- <b>R</b> eduktase
KCS	$\beta$ - <b>K</b> eto-Acyl-CoA- <b>S</b> ynthase
Kd	<b>K</b> otyledonen
kDa	<b>K</b> ilodalton
KO	T-DNA-Insertionslinien, schalten ein Gen aus (engl.: „ <i>knock out</i> “)
l	Liter
L	Lipid
LB	linker Grenzbereich der T-DNA-Insertion (engl.: „ <i>left border</i> “)
LTP	Lipidtransferprotein (engl.: „ <i>lipid transfer protein</i> “)
$\mu$	mikro-
m	milli-
M	Molar
min	Minute
miRNA	microRNA
mRNA	Boten-RNA (engl.: „ <i>messenger RNA</i> “)
MS	<b>M</b> urashige und <b>S</b> koog oder <b>M</b> assen <b>S</b> pektrometrie
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht (engl.: „ <i>molecular weight</i> “)
m/z-Verhältnis	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	<b>n</b> ano
NASC	Samenbank (hier engl.: „ <i>Nottingham Arabidopsis thaliana Stock Center</i> “)
NMR	Kernspinresonanz (engl.: „ <i>nuclear magnetic resonance</i> “)
ns	nicht spezifisch (engl.: „ <i>non specific</i> “)
OD	optische <b>D</b> ichte
ÖT	<b>Ö</b> ltröpfchen
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: „ <i>polymerase chain reaction</i> “)
Pd	<b>P</b> eriderm

---

Ph	<b>Phloem</b>
pI	isoelektrischer Punkt (engl.: „ <i>isoelectric point</i> “)
PM	<b>Plasmamembran</b>
PR-Proteine	Abwehrstoffe der Pflanze (engl.: „ <i>pathogenesis related</i> “)
Prom	<b>Promoter</b>
p (value)	Wahrscheinlichkeit (engl.: „ <i>probability value</i> “)
Pz	<b>Perizykel</b>
RB	rechter Grenzbereich der T-DNA-Insertion (engl.: „ <i>right border</i> “)
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung (engl.: „ <i>relative centrifugal force</i> “)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: „ <i>ribonucleic acid</i> “)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: „ <i>rounds per minute</i> “)
s	<b>Sekunde</b>
SA	<b>Standardabweichung</b>
SAR	systemische Abwehr der Pflanze (engl.: „ <i>systemic acquired resistance</i> “)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: „ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “)
SP	<b>Sekundäres Phloem</b>
St	<b>Stele</b>
SW	<b>Seitenwurzel</b>
SX	<b>Sekundäres Xylem</b>
T	<b>Tumor</b>
TAIR	<i>Arabidopsis thaliana</i> Datenbank (engl.: „ <i>The Arabidopsis Information Resource</i> “)
T-DNA	<b>Transfer-DNA</b>
Ti Plasmid	<b>Tumor induzierendes Plasmid</b> (engl.: „ <i>tumor inducing plasmid</i> “)
UTR	<b>Untranslationierte Region</b>
UV	<b>Ultraviolett</b>
V	<b>Volt</b>
vir	<b>Virulenz</b>
VK	<b>Vaskuläres Kambium</b>

VLCFA	langkettige Fettsäure mit C>20 (engl.: „ <i>very long chain fatty acid</i> “)
WH	<b>W</b> urzel <b>h</b> aar
Ws-2	Wassilewskija
Wt	<b>W</b> ild <b>t</b> yp
w/v	Mengenangabe (engl.: „ <i>weight/volume</i> “)
xg	Zentrifugalbeschleunigung
XE	<b>X</b> ylem <b>E</b> lement
Xy	<b>X</b> ylem
z.B.	zum <b>B</b> eispiel
ZW	<b>Z</b> ell <b>w</b> and

### **Zur Verwendung von Abkürzungen und Fachbegriffen**

Englische Fachbegriffe werden dann verwendet, wenn keine entsprechenden deutschen Bezeichnungen existieren oder üblich sind.

### **Konvention zur Bezeichnung von Genen und Proteinen**

<i>LTP2</i> :	Bezeichnung für ein Gen
<i>ltp2</i> :	Bezeichnung einer Mutante
LTP2:	Bezeichnung des codierten Proteins

## 8. Anhang

### 8.1. Sequenzen und Vektoren

#### 8.1.1. DNA-Sequenzen

##### At2g38540 (LTP1) cDNA

Start  
**at**ggctggagtgatgaagttggcatgcttgccttggcctgcatgattgtggccggtccaatcacatcgaacgctgcgctaagctgtggctcagttaacagc  
aacttggcagcgtgattggctactgtctccaaggtggtgctcattccccagcgtgttgcctccggcgttaaaaacctcaacagcatagccaagacgacccc  
agaccgtcagcaagcttgaattgattcaaggtgccgctagagccttaggctctggtctcaacgctggccgtgcagctggaattcctaaggcatgtggag  
tcaatattccttaca<sup>Stopp</sup>aaatcagcaccagcaccaactgcaaaaccgtgaggt**ga**

##### At2g38540 (LTP1):mCherry Fusionsprodukt

Start LTP1  
**at**ggctggagtgatgaagttggcatgcttgccttggcctgcatgattgtggccggtccaatcacatcgaacgctgcgctaagctgtggctcagttaacagc  
aacttggcagcgtgattggctactgtctccaaggtggtgctcattccccagcgtgttgcctccggcgttaaaaacctcaacagcatagccaagacgacccc  
agaccgtcagcaagcttgaattgattcaaggtgccgctagagccttaggctctggtctcaacgctggccgtgcagctggaattcctaaggcatgtggag  
tcaatattccttaca<sup>mCherry</sup>aaatcagcaccagcaccaactgcaaaaccgtgaggggattaaacctcagcatggtgagcaagggcgaggaggataaacatggcca  
tcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggtccctgaacggccacgagttcagatcgagggcgagggcgagggcccccctacga  
gggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggccta  
cgtgaagcaccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggttcaagtgggagcgcgctgatgaactcagggacggcggcgtggt  
gaccgtgaccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccactccctccgacggccccgtaatgcaga  
agaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgacccgaggacggcgcctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggac  
ggcggccactacgacgctgaggtcaagaccactacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatca  
cctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagctacgaacgcgccgaggggccactccaccggcggcatggacgagctgtacaag<sup>Stopp</sup>**tag**

##### At2g38530 (LTP2) cDNA

Start  
**at**ggctggagtgatgaagttggcatgcatggtcttggcttgcattgtggccggtccaatcacagcgaacgcgcttatgagttgtggcaccgtcaacgg  
caacctggcaggggtgattgcctacttgaccgaggtgctccacttaccgaaggtgctgcaacggcgtfactaaccttaaaacatggccagtacaacc  
ccagaccgtcagcaagcttcccgttgccttcaatctgccgctaaagccttggctcccggctcaacactgcccgtgcagctggacttctagcgcagca  
agtcaatattccttaca<sup>Stopp</sup>aaatcagcggcagcaccaactgcaaacaccgtgaggt**ga**

**At2g38530 (LTP2):mCherry Fusionsprodukt**

Start LTP2

**at**ggctggagtgatgaagttggcatgcatggtcttgcttgcatgattgtggccggccaatcacagcgaacgcgcttatgagttgtggcaccgtcaacgg  
caacctggcaggggtgcattgacctgacccgaggtgctccactaccaagggtgctgcaacggcgctfactaaccttaaaacatggccagtacaacc  
ccagaccgtcagcaagcttgccttcaatctgccgctaaagccgttggtcccggtctcaacactgcccgtcagctggacttctagcgcagca  
agtcaatattcctfacaacatcagcggcagcaccactgcaacaccgtgaggg<sup>mCherry</sup>gattaaacctcagcatggtgagcaagggcgaggaggataacatggc  
catcatcaaggagttcatgcttcaaggtgcatgagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgaggggcgaggggcccccctac  
gagggcaccagaccgcaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggc  
ctacgtgaagcaccggcgcacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgaggagcgcgtgatgaactcggagacggcggcgt  
ggtgaccgtgaccagactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcgacccaactccccctccgacggccccgtaatgc  
agaagaagaccatgggctgggagcctcctccgagcggatgtacccgagggacggcgcctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaag  
gacggcggccactacgacgtgaggtcaagaccactacaaggccaagaagcccgtcagctgccccggcctacaacgtcaacatcaagttggaca  
tcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcggcaggggccgactccaccggcggcatggacgagctgtacaag<sup>Stopp</sup>**tag**

**At2g38530 (LTP2) Promotor**

gcaagaggagatgtgatggatgatgaagagtgttaggggagtgagagtttatatagagtaggaaagtacatcttatgtaatgtgatcaatacctaaatac  
tactatgaggggaaggagtagttgctgctgactcattaatgtagaccatacgaatftaaatggaatgtcactaaaatcgtcaatftaactaaaaag  
gctgttttagataataacgagtgtagacaataatcttggattcfaaattcaagaagaataagctatctgtgacgtctggaaatccaatccgacgggtg  
tgaatctttaaagcctgaaacccaacgtgactttatgtggactactactagcttgaacaaacattggagatgttaaaaaattcgaagtagagttat  
cgtttatgaatatcttaattgtaagatgaaacaacgtgtataagtttttatcactaatactagtagtacttatcattgtattgTTTTTtaataataatcagtgga  
tatacacaatattatgctggtttgctcctgccctccacaggccacgccatagattgtatgtagatggttcgctattatgtaaaattgactgatacacaataaat  
actgaatgcatgacacatgggtaggatggggtcattgtcggttccggcctgaaatgtacaattattggctttgcttgcataaacatcactccatcgtccata  
actactatagtagtattctagcttatttggtaaaactaggtgtgtgtgtttttattggatgatgagtagtagtacttagcttcttggtaaaatttactttatctgtagt  
tggagatcgagagtagtcaatggtgagatgatcgtcaacaatataaaaaatcataaagattgtagaagattaaatattaacatataatgatttttagaataat  
atatattttacattttttatttttagtaggaaatcctataatataatataatataatataagagagaatatacttataaagttatttttagaataat  
attctttatctcatcaacttatcaagttatgtagtaaaaggtgtttataagaactaaaaagtgcaagaacacataaataacatggaacgatcgaccatattttct  
tgaataacagactttfacaatacatttttttttcaactgggtgtttccggctccgggtgatgtgtttaaagtgccttattggctaaagaacacgctgca  
aataagcttttaaaagttcattcatgttaacattttctgttaagaagaacagaaaaatcgtattfactgttaaaattttgctggtgctgaaaggctacatgatt  
atatactttccctattttcggtaaaaactgataaftaggcaccgaaatgccacatgcaacatattatgtacaccgaacacgtgtgagcataaagtacattg  
gtataaatacattacgatagctactcactatftaaggacctctatagctgtaagaaftgcagtagtatttctgaaacatggtgaaaaatgaatgcctca  
agtctgaaatgaaatgacagtgatgtgacgtggaaggtatgaagagtgattttttatcaatfaactttgattcacaacattatgattaagttcaaacgtaa  
atgtaaaatgtaaatgctacacaatttatgatggatgaagaacagttgcaaaagactcaaaagtagcttattaaactactaaaaccacatagattaatgg  
ggtgggttgggccgaatcgggcttgttctgtctata

**(At1g51500) CER5<sub>Prom</sub>::LTP2 Fusionsprodukt**

CER5-Promotor

cacctctttagttgcttgagttcctatggaagtggaagtaaacctttgctttttttgataagggatatgctttgatagaatatgagaagaaggaag  
aagcacagagcgtattcagcaatgaatggtgctgagcttcaacagaaatgttagcgttgactgggccttcagcagcggccccagtggtggtgaa  
tcttacaggagaagaactcaggtttgtatcctaactcttttctgtccgctacgactgtctgatcttggccgatagaagtaagagtgcaaaaag  
tatcaattaagatatagactagaagtttaacagttgacaaggtatattgtactaagcactaccaaaccttactgtctttatgctaataatcgaag  
tcactgtgactgtcaagtagttatacctttcttaaatcatcatccattgatcattggggtttacaggtatgggaggtcgaacgttcaagaagtccgag  
aagacgttactgattgatgatttgggtgagagttctccccatctctctgtattagggtccctctcttctgttaaggtactgatgcaagacgctgagt

gttgaacaaatTTTTctggggTTTTgtagggttggctgctttgcattggtttatctctttatgcattgcatgggattgttgcgtttaaaccatgagatct  
 gtttaaatgctttgattggtaaaagaagagaacattggatgaggaagaatgtttaaatttcattctctattgattcatatfttaggtcagacagaatttga  
 aatcaaaagacctccattacactagaaaacaaatatgattatatagaaaaaatcaaaagaattttcaaccaatggcattatttcacactggttattatt  
 ctaggcgttaactattggtaacctaaatatgtaacagaatcatcaaatgactattaaatftttggctgaaattttccaatcaatggcaatattcacatcg  
 tttgttttataaggcgttaactattcgtatcctaaatatgttaaaagaatcatcaaagggttgatgatttgatagatagagcatgactttcttctactcacagg  
 ttgcatgatttcattgtacgaatcaatcatctatactttgtgcattgagccagteccacattatgtttatgatccatctattttaaagggtctcatataact  
 tacagctgaaaagtataaatatgaaacagttggaacagttatataagttctgctttgtgtcaccacaaaaaaaatgatatgctttacatgattccaa  
 caaaaaaaaacagttttgattctgttaatgatgggtccaaaggcttataagaccataccttagattctgtgaatttagaatctgggttctatctctttc  
 tggaaatctgtttcttttctttttataccaaaactttgtgaaatcttaggtactttgtttatgatcagtttactcgtttaaaaagaaccaataaacctact  
 agatataaatagtaagaagctataacttaggggtgtgtaataactaaacaatgcttaaaaaatgtggttagacatagcgtataactaaagctaaaaag  
 ctaaaagataaccataaaatcatgaagataataatggacggatagacaaaaagaataatgaagcataatacaaaaaaaaaactatatcggtt  
 ccaactaccacacatttaattcctttccctttcatttaacacctgtgaagactcgttgcagggttctctacctttatgtcattcaaacctatcaattatcaa  
 gtctctgattttacatgttcaacaaacacgatttttcaactaattttatatacttcttcttataatcgaatatacattctcttctgttatagttaaaaaa  
 taatacaatgataattatataattctatgtgtgaacaaaacgataaatttgcaaaagtatcactatcaatcccttggaaattagtagacaaccaaataatgg  
 atcctttaaattgatttgtatgtttctattcatttgaactaaatgaaaacatctcatcgtaaataatcacactgttaaaatttcatttcacaaaaatatacatttga  
 tttctgtgtggacgaaatttctgttagttggcaagaaccgacataaaaaatataatttcatacgtataatagatgtcaataagtaggtgggttctactagt  
 tactactacacatggacgattgtataaatattagacctcattcacacaactctcactctcttacttataatgtgcaagaaaataaaaaaactatataacta  
 tagacgtgtatctatatatggttatgatattaaagccatccattaatgtaattagttgtttgttgattgttctcaagtctcacctaaagaaaaccttagg  
 cctacaaaaattaatcactatctttataattccatctccaaccaatataataaaaaataaacctagacgaagaacaaacaaaactctctcttctctctctc  
 tctaataagtaagggtttgatcttttcaagatcaacaaaaacaatggctggagtgtatgaagtggcatgcatggtcttggcttgcattgttggccggt  
 ccaatcacagcgaacgcgcttatgagttgtggcaccgtcaacggcaacctggcaggggtgcattgcctacttgaccgaggtgctccacttaccacagggt  
 gctgcaacggcgttactaaccttaaaaacatggccagtacaaccccagaccgtcagcaagcttgccttccatctgccgttaaagccggttggctcc  
 ggtctcaacactgcccgtgcagctggacttctagcgcgatgcaaaagtcaatattccttacaaaatcagcggcagcaccacactgcaaacaccgtgaggtga<sup>Stopp</sup>

### At2g38530 (*LTP2-ES*) CDS:V5:6xHis

<sup>LTP2</sup>  
 cttatgagttgtggcaccgtcaacggcaacctggcaggggtgcattgctacttgaccgaggtgctccacttaccacagggtgctgcaacggcgttactaa  
 cctaaaaacatggccagtacaaccccagaccgtcagcaagcttgccttcaatctgccgttaaagccggttggctccggtctcaaacctgcccgtg  
 cagctggacttctagcgcgatgcaaaagtcaatattccttacaaaatcagcggcagcaccacactgcaaacaccgtgaggaagggtcaagacaattctgcaga  
 tatccagcacagtggcggccgctcagctctagagggccccgggttcgaaggtaagcctatccctaaccctctcctcggctctcagctcagctgcagaag  
 cttgcccgcactcgaaccaccaccaccactga<sup>6xHis-Epitop</sup> <sup>V5-Epitop</sup> <sup>Stopp</sup>

**At2g38530 (LTP2+ES) CDS:V5:6xHis**

Start LTP2

**atg**ctggagtgatgaagttggcatgcatggtcttgcttgcatgattgtggccgggtccaatcacagcgaacgcgcttatgagttgtggcaccgtcaacgg  
caacctggcaggggtgattgctacttgacceggaggtgctccacttaccgaaggggtgcaacggcggtfactaaccttaaaaacatggccagtacaacc  
ccagaccgtcagcaagcttccggttgccttcaatctgccgctaaagccgttggccccgtctcaacactgcccgctcagctggacttctagcgcagca  
agtcaatattccttataaaaatcagcggcagcaccactgcaacaccgtgaggaaggggtcaagacaattctgcagatatccagcacagtggcgccgctc  
gagcttagagggcccggttc<sup>V5-Epitop</sup>gaaggtaagcctatccctctcctcggtctcgattctacggctgacaagcttgcggccgactc<sup>6xHis-Epitop</sup>gagcaccac  
caccaccactga<sup>Stopp</sup>

**qRT-Produkt (LTP1; At2g38540)**

ttaggctctggctcaacgctggccgtgcagctggaattcctaaggcatgtggagtcaatattccttataaaaatcagcaccagcaccactgcaaaaccgtg  
aggtgatgagctagcaacgggtgagatgatgctactaccggaagttcgaatccttattatataatggatgagattaatattaataagatgttcgaatgtttgttt  
tagatgttttaatttctgtcttttctattgtggtgttctgttatatgggtttgtctgtactatgttcgaggaac

**qRT-Produkt (LTP2; At2g38530)**

ctccacttaccgaaggggtgcaacggcggtfactaaccttaaaaacatggccagtacaacccagaccgtcagcaagcttccggttgccttcaatctgcc  
gctaaagccgttggccccgtctcaacactgcccgctcagctggacttctagcgcagcaaaatccttataaaaatcagcggcagcaccactg  
caacaccgtgaggtgatgagcgaaggtcaaatgaagctactagcggatgttcgaatattatataatcgatgagataatattaataaagatgttcgaatggc  
tgtactctt

**qRT-Produkt (LTP3; At5g59320)**

tttctggctcaacccaagctctagcctctggccttctggaaagtgcgggttagcattccatccaatctccatgagcactaactgcaacaacatcaagtga  
aatggaagcttacgtcgtcttttggcgttaagagtatggtttaccagaagtactagaataaaaatcggctatatacttagctgatattaccatgtattgttttg  
tccaatgctttgtctattttcatatcatatgttgattgatgtgctaaaactatga

**qRT-Produkt (LTP4; At5g59310)**

ggftaatccaagcttagcctctggccttctggaaagtgcgggttagcatccccatccccatccacgagcaccactgcgccaccatcaagtgaagtgg  
ggaataacgacatcattgcctgaagagtatggttcgtatcgtaaaataagacggctatctaagctgatattacctgtctttgtttgtcttgatggcctttgtaa  
tctttgctttgttatgttgatacttgtgtcttaacatg

**qRT-Produkt (LTP6; At3g08770)**

aaagtaacatgagatctcttattagccgtgctgcttcttcttactgcgggtgaagcagcgtcttgaacacgggtgattgcggatctttaccctt  
gcttatcctacgtgactcagggcggaccgggtccaacctctgctgcaacggctcacaacactcaagagtccaggtcctaaacttctgtggaccgtcaggg  
ggtctgctggtgcatcaaatctgctattggaggactcactctctctctagaaccatccaaaatgctttggaattgccttctaaatgtggtgctgatctcccttac  
aagttcagcccttccactgactgcgacagatccagtgaacaagcagaaa

**qRT-Produkt (LTP12; At3g51590)**



---

aatggcgfttactccgaagatcatcacatgcctcattgtccttacgatctacatggcatcccaacagagtcaacctccagtgtgggacagtgacgagcac  
actggcacagtgcctgacctacttgaccaacagtggcattgccatcacaatgctgcgtgggagtcaagtcattgtaccaattggctcagaccacaccgg  
accgtaaacaagtatgtgagtgacctaaactagcgggtaaagaaatcaaggcctcaacaccgacctgtggccgaccttctaccacttgggtgttcaa  
ttccctacccatcagtttagcaccaattgcgacagtatatcgactgccgtgtgaaagaggctagtga

**qRT-Produkt (LTPG2; At3g43720)**

agattgataaggcaaggctctcaaactcccggagtttgcggcgtgatcactcccgatccttcactttgttctcttttggaaattcctgttgagcacctgtagc  
tatgggagacgaggagcctcccagcctatgctccaggttcgatgacaggtgcagaat

### 8.1.2. Aminosäuresequenzen von LTP2-Verwandten in *Arabidopsis thaliana*

<b>A</b>	Ala	Alanin
<b>B</b>	Asx	Aspartat oder Asparagin
<b>C</b>	Cys	Cystein
<b>D</b>	Asp	Aspartat
<b>E</b>	Glu	Glutamat
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin
<b>G</b>	Gly	Glycin
<b>H</b>	His	Histidin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin
<b>K</b>	Lys	Lysin
<b>L</b>	Leu	Leucin
<b>M</b>	Met	Methionin
<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>S</b>	Ser	Serin
<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>V</b>	Val	Valin
<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>X</b>		beliebige Aminosäure
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin
<b>Z</b>	Glx	Glutamat oder Glutamin

**Anhang Tabelle 1** Aminosäure-Sequenzen von LTP2-Verwandten der Typ I nsLTP-Familie (Boutrot et al., 2008) aus *Arabidopsis thaliana* auf Basis von ClustalW2. Zusätzlich angegeben sind der AGI-Code, sowie eine genauere Bezeichnung/Name (falls vorhanden).

AGI-Code	Bezeichnung	Aminosäure-Sequenz
At2g38540	<b><i>LTP1</i></b>	MAGVMKLACLLLACMIVAGPITSNAALSCGSVNSNLAACIGYVLQG GVIPPACCSGVKNLNSIAKTTTPDRQQACNCIQGAARALGSGLNAGR AAGIPKACGVNIPYKISTSTNCKTVR
At2g38530	<b><i>LTP2</i></b>	MAGVMKLACMVLACMIVAGPITANALMSCGTVNGNLAGCIAYLTR GAPLTQGCCNGVTNLKNMASTTPDRQQACRCLQSAAKAVGPGLNT ARAAGLPSACKVNIPYKISASTNCNTVR
At5g59320	<b><i>LTP3</i></b>	MAFALRFFFTCLVLTVCIVASVDAAISCGTVAGSLAPCATYLSKGGGLV PPSCCAGVKTLNSMAKTTTPDRQQACRCIQSTAKSISGLNPSLASGLP GKCGVSIPYPISMSTNCNNIK
At5g59310	<b><i>LTP4</i></b>	MAFALRFFFTCFVLTVFIVASVDAAITCGTVASSLSPCLGYLSKGGVV PPPCCAGVKKLNGMAQTTPDRQQACRCLQSAAKGVNPSLASGLPG KCGVSIPYPISTSTNCATIK
At3g51600	<b><i>LTP5</i></b>	MEGLLKLSTLVIVCMLVTAPMASEAAISCGAVTGS LGQCYNYLTRG GFIPRGCCSGVQRLNSLARTTRDRQQACRCIQGAARALGSRLNAGR AARLPGACRVRISYPISARTNCNTVR

AGI-Code	Bezeichnung	Aminosäure-Sequenz
At3g08770	<b><i>LTP6</i></b>	MRSLLLAVCLVLALHCGEAAVSCNTVIADLYPCLSYVTQGGPVPTL CCNGLTTLKSQAQTSVDRQGVCRICKSAIGGLTSPRTIQNALELPSK CGVDLPYKFSPSTDCDSIQ
At2g15050	<b><i>LTP7</i></b>	MAGLMKLGCLVFVFVIAAGPITAKAALSCGEVNSNLKPCTGYLTNG GITSPGPQCCNGVRKLNGMVLTTLDRRQACRCIKNAARNVGPGLNA DRAAGIPRRCGIKIPYSTQIRFNTKCNTYIC
At3g51590	<b><i>LTP12</i></b>	MAFTPKIITCLIVLTIYMASPTESTIQCGTVTSTLAQCLTYLTNSGPLPS QCCVGVKSLYQLAQTTPDRKQVCECLKLAGKEIKGLNTDLVAALPT TCGVSIPIYPISTNCDSTAV
At5g01870	-	MMRVVLPLCLLLASIFAWGSEAAISCNAVQANLYPCVVYVVQGGAI PYSCCNGIRMLSKQATSASDKQGVCRICKSVVGRVSYSSIYLKAAA LPGKCGVKLPYKIDPSTNCNSIK
At4g33355	-	MRNITTTTRKMLLLVITILLGIA YHGEAIACPQVNMYLAQCLPYLKA GGNPSPMCENGLNSLKA APEKADRQVACNCLKSVANTIPGINDDF AKQLPAKCGVNIGVPFSKTVDNCNSIN
At2g18370	-	MNVLKCLAIISVLGIFIPRYSESAISCSVVLQDLQPCVSYLTSGSGNP PETCCDGVKSLAAATTTADKKAACQCIKSVANSVTVKPELAQALA SNCGASLPVDASPTVDCTTVG
At2g15325	-	MRKSISIAFVIAITIFMSHLNVFTVYSLTPCEEATNLLTPCLRYLWAPP EAKPSPECCSGLDKVNKG VKTYDDRHDMCICLSSEAAITSADQYKF DNLPKLCNVALFAPVGPKFDCSTIKV

## 8.2. PCR-Primer

### 8.2.1. Echtzeit-PCR-Primer

**Anhang Tabelle 2** Primer für die quantitative Echtzeit-PCR. Angegeben sind: Nukleotid-Sequenzen, Länge der amplifizierten Fragmente in Bp, sowie die optimalen Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) der Primerpaare (Primer von TIB Molbiol OligoShop; <http://www.tib-molbiol.com>).

Genlokus	Primer Name	Sequenz 5`-3`	Fragment-Länge [Bp]	T <sub>m</sub> [°C]
At3g18780 ( <b>ACT2</b> ); At1g49240 ( <b>ACT8</b> )	ACT2/8 LC s	ACTGAGCACAATGTTAC	435	50-60
	ACT2/8 LC as	GGTGATGGTGTGTCT		
At2g38540 ( <b>LTP1</b> )	LTP1 LC s	TTAGGCTCTGGTCTCA	288	55
	LTP1 LC as	GTTGCCTGCGAACATA		
At2g38530 ( <b>LTP2</b> )	LTP2 LC s	CTCCACTTACCCAAG G	315	55
	LTP2 LC as	AAAGAGTACAGCCATT		
At5g59320 ( <b>LTP3</b> )	LTP3 LC s	TTTCTGGTCTCAACCC	270	55
	LTP3 LC as	TCATAGTTTTAGCACATCA		
At5g59310 ( <b>LTP4</b> )	LTP4 LC s	GGTTAATCCAAGTCTAGC	250	55
	LTP4 LC as	CATGTTAAGACACAAGT		
At3g08770 ( <b>LTP6</b> )	LTP6 LC s	AAAGTAACATGAGATCTCTC	362	55
	LTP6 LC as	TTTCTGCTTGTCTCACTG		
At3g51590 ( <b>LTP12</b> )	LTP12 LC s	AATGGCGTTTACTCCGAAG	374	62
	LTP12 LC as	TCACTAGCCTCTTTCACAC		
AT3g43720 ( <b>LTPG2</b> )	LTPG2 LC s	AGATTGATAAGGCAAAGGCTCTC	165	62
	LTPG2 LC as	ATTCTGCACCTGACATCGAACC		

### 8.2.2. Allgemeine Klonierungsprimer

**Anhang Tabelle 3** Allgemeine Klonierungsprimer. Angegeben sind: der Klonierungsschritt, die Nukleotid-Sequenzen, die Länge der amplifizierten Fragmente in Bp, die optimalen Schmelztemperaturen (Tm) sowie die Bezeichnung der generierten Vektoren (Primer von TIB Molbiol OligoShop; <http://www.tib-molbiol.com>). Tiefgestellte Großbuchstaben dokumentieren die entsprechenden Primerüberhänge.

Klonierungsschritt	Primer Name	Sequenz 5`-3`	Fragment-Länge [Bp]	Tm [°C]	Vektor
<b>Schritt 1: Generierung von LTP1:mCherry</b> LTP1 CDS aus Arabidopsis (WS-2) in pUBQ10 mCherry C-term	USERLTP2CDS_s	GGCTTAAUATGGC TGGAGTGATG AAG	372	55	pSATUBQ10-UBQ10 <sub>Prom</sub> ::LTP1:mCherry (Anhang Abbildung 5)
	ULTP1CDS_asoSr	GGTTTAAUCCCTC ACGGTTTTGCA GT			
<b>Schritt 2: Generierung von 35S::LTP1:mCherry</b> LTP1:mCherry in pCambia330	USERLTP2CDS_s	GGCTTAAUATGGC TGGAGTGATG AAG	1.084	55	pCambia 3300-35S <sub>Prom</sub> ::LTP1:mCherry (Anhang Abbildung 7)
	mCherry-CT-C-term	GGTTTAAUCTACTT GTACAGCTCG TCCATGCC			
<b>Schritt 1: Generierung von LTP2:mCherry</b> LTP2 CDS aus Arabidopsis (WS-2) in pUBQ10 mCherry C-term	USERLTP2CDS_s	GGCTTAAUATGGC TGGAGTGATG AAG	371	55	pSATUBQ10-UBQ10 <sub>Prom</sub> ::LTP2:mCherry (Anhang Abbildung 6)
	ULTP2CDS_asoSr	GGTTTAAUCCCTC ACGGTGTTC AG			
<b>Schritt 2: Generierung von 35S::LTP2:mCherry</b> LTP2:mCherry in pCambia330	USERLTP2CDS_s	GGCTTAAUATGGC TGGAGTGATG AAG	1.081	55	pCambia 3300-35S <sub>Prom</sub> ::LTP2:mCherry (Anhang Abbildung 8)
	mCherry-CT-C-term	GGTTTAAUCTACTT GTACAGCTCGTC CATGCC			
<b>Generierung von 35S<sub>Prom</sub>::LTP2:V5:6xHis</b> LTP CDS ohne ES mit V5-Epitop aus pCambia2300-35S <sub>Prom</sub> ::LTP2:V5 in pET28b	LTP2-NcoI ks	TTTCCATGGCTT ATGAGTTGTG GCACC	405	55	pET28b-T7 <sub>Prom</sub> ::LTP2:6xHis/V5 (Anhang Abbildung 1)
	V5-SalI as	TTTGTGCGACTCACC TCACGGTGTG CA			

### 8.2.3. Spezielle Klonierungsprimer

**Anhang Tabelle 4** Klonierungsprimer für die Generierung von CER5<sub>Prom</sub>::LTP2. Angegeben sind: der Klonierungsschritt, die Nukleotid-Sequenzen, die Länge der amplifizierten Fragmente in Bp, die optimalen Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) sowie die Bezeichnung der generierten Vektoren (Primer von TIB Molbiol OligoShop; <http://www.tib-molbiol.com>). Tiefgestellte Großbuchstaben heben die entsprechenden Überhänge hervor.

Klonierungsschritt	Primer Name	Sequenz 5`-3`	Fragment-Länge [Bp]	T <sub>m</sub> [°C]	Vektor
<b>Fragment 1</b> At1G51500; CER5 <sub>Prom</sub> aus Arabidopsis (WS-2) mit 3`-überlappender LTP2-CDS	CER5Pro_sA	CACC TTCTTTAG TTTGCTTGAGT TCTC	2.634	55	-
	CER5Pro_asB	TCATCACTCCAGCCAT T GTTTTTGT			
<b>Fragment 2</b> At2g38530; LTP2-CDS aus Arabidopsis (WS-2) mit 5`-überlappenden CER5 <sub>Prom</sub> -Fragment	cLP2-CDS sC	CTAACTAAGAGATCAAT ATGGCTGGAG TGATGA	368	55	-
	LTP2_CDS asSto	TCACCTCACGG TGTTG			
<b>Überlappendes Fragment</b> Ligation von Fragment 1 und Fragment 2 als Insertions-Addukt in pCambia 3300	USERCER5_Pro s	GGCTTAAU TTCTTT AGTTTGCTTGA GTTCTC	2.990	55	pCambia3300- CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2 (Anhang Abbildung 3)
	USERLTP2_CDS as	GGTTTAAU TCACCT CACGGTGTTG			

### 8.2.4. Sequenzierungsprimer

**Anhang Tabelle 5** Sequenzierungsprimer. Angegeben sind: die Nukleotid-Sequenzen sowie die optimale Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der entsprechenden Primer (Primer von TIB Molbiol OligoShop, <http://www.tib-molbiol.com>).

Konstrukt	Primer Name	Sequenz 5´-3´	T <sub>m</sub> [°C]
pUBQ10-UBQ10 <sub>Prom</sub> ::LTP1:mCherry/ pUBQ10-UBQ10 <sub>Prom</sub> ::LTP2:mCherry	M13 s	GTAAAACGACGGCCAG	55
	M13 as	CAGGAAACAGCTATGAC	55
pCambia 3300-35S <sub>Prom</sub> ::LTP1:mCherry	LTP2fl_fw	ATGGCTGGAGTGATGAAGTTG	55
	mCherry-rev	CTACTTGACAGCTCGTCCATGCC	55
pCambia 3300-35S <sub>Prom</sub> ::LTP2:mCherry	LTP2fl_fw	ATGGCTGGAGTGATGAAGTTG	55
	LTP2CDS asD	CCTCACGGTGTGTCAGTTGGT	55
	mCherry-rev	CTACTTGACAGCTCGTCCATGCC	55
pET28b-T7 <sub>Prom</sub> ::LTP2:6xHisV5	T7 sense	TAATACGACTCACTATAGGG	55
	T7 antisense	CTAGTTATTGCTCAGCGGTG	55
pCambia2300-35S <sub>Prom</sub> ::LTPi	AmiRNA A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTA AC	55
	AmiRNA B	GCGGATAACAATTTACACAGGA AACAG	55
pCambia3300-CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2 (Vektor ohne Promotor)	CER5_CDS_s1	ATCTGTAAGGTACTGGATGCABA GA	55
	CER5_CDS_s2	GCCAGTCCCACATTATGTBTTAT	55
	CER5_CDS_s2	TTAACACCTGTGAAGACTCGTTG	55
	CER5_CDS_as1	CAAACGATGTGAATATTGCCA	55
	CER5_CDS_as2	AGAAGCTCAGCACCATTCATTGC T	55
	cLP2-CDS sC	CTAACTAAGAGATCAATATGGCT GGAGTGATGA	55

### 8.2.5. Genotypisierungsprimer

**Anhang Tabelle 6** Primer zur Genotypisierung der *LTP2*-T-DNA-Insertionsmutante (*ltp2*KO; GK-639E08; NASC Stock-Nummer: N736747). Angegeben sind die Spezifikation, die Sequenz, die Fragmentlänge sowie die optimale Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primerpaare (Primer von TIB Molbiol OligoShop, <http://www.tib-molbiol.com>).

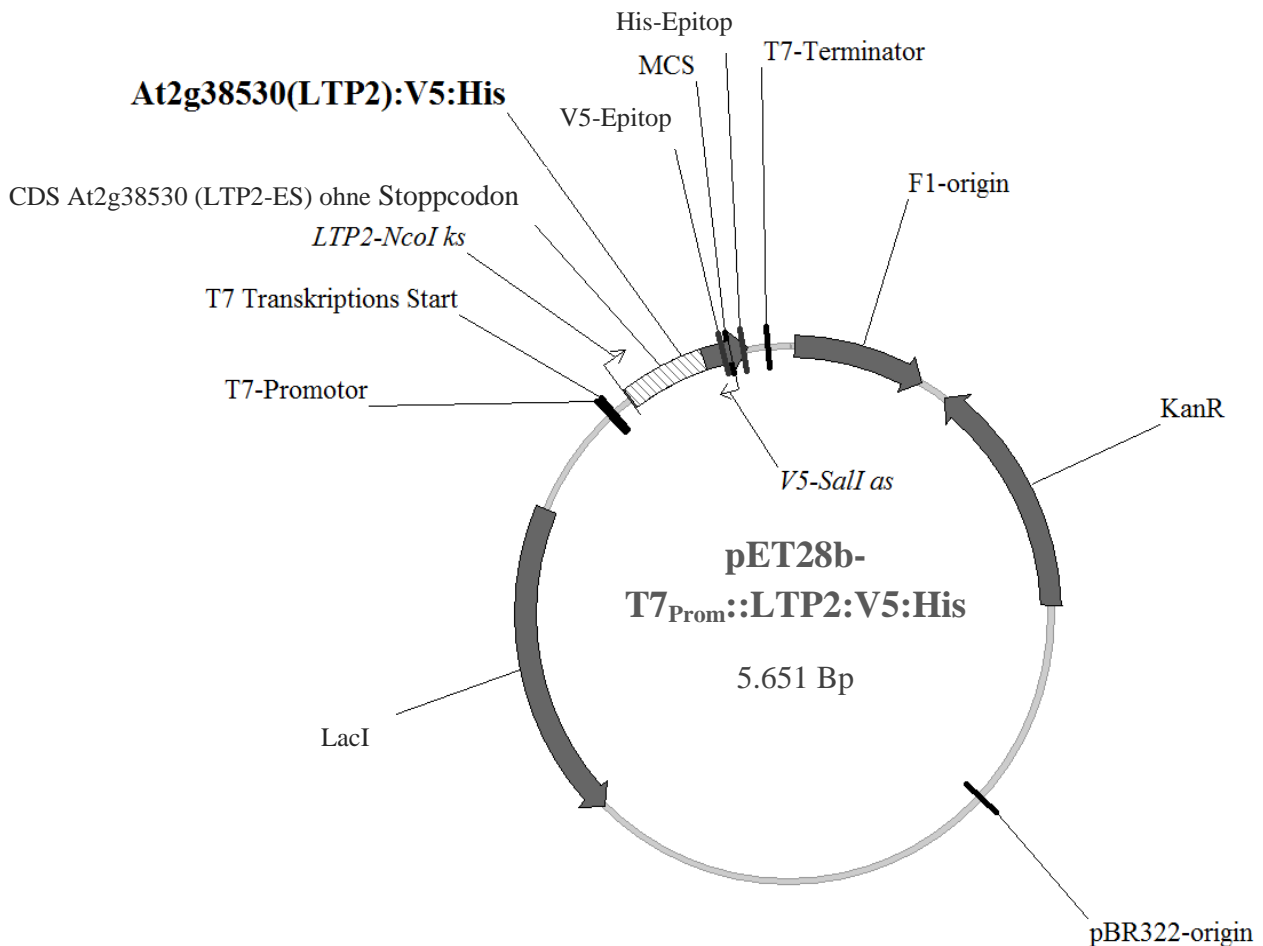
Spezifikation	Primer Name	Sequenz 5`-3`	Fragment-Länge [Bp]	$T_m$ [°C]
gDNA Primerpaar	LTP2-LP	CGATTAAACTAAAGTAAG	846	52
	LTP2-RP	GTATTTAGGTATTGCAT		
Primerpaar für T-DNA Insertion	LTP2-RP	GTATTTAGGTATTGCAT	560	47
	BP	ATATTGACCATCATACTCATTG		

**Anhang Tabelle 7** Primer zur Genotypisierung der generierten transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzenlinien bzw. der BY-2 Zellkultur. Angegeben sind die Spezifikation, die Sequenz, die Fragmentlänge sowie die optimale Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primerpaare (Primer von TIB Molbiol OligoShop, <http://www.tib-molbiol.com>).

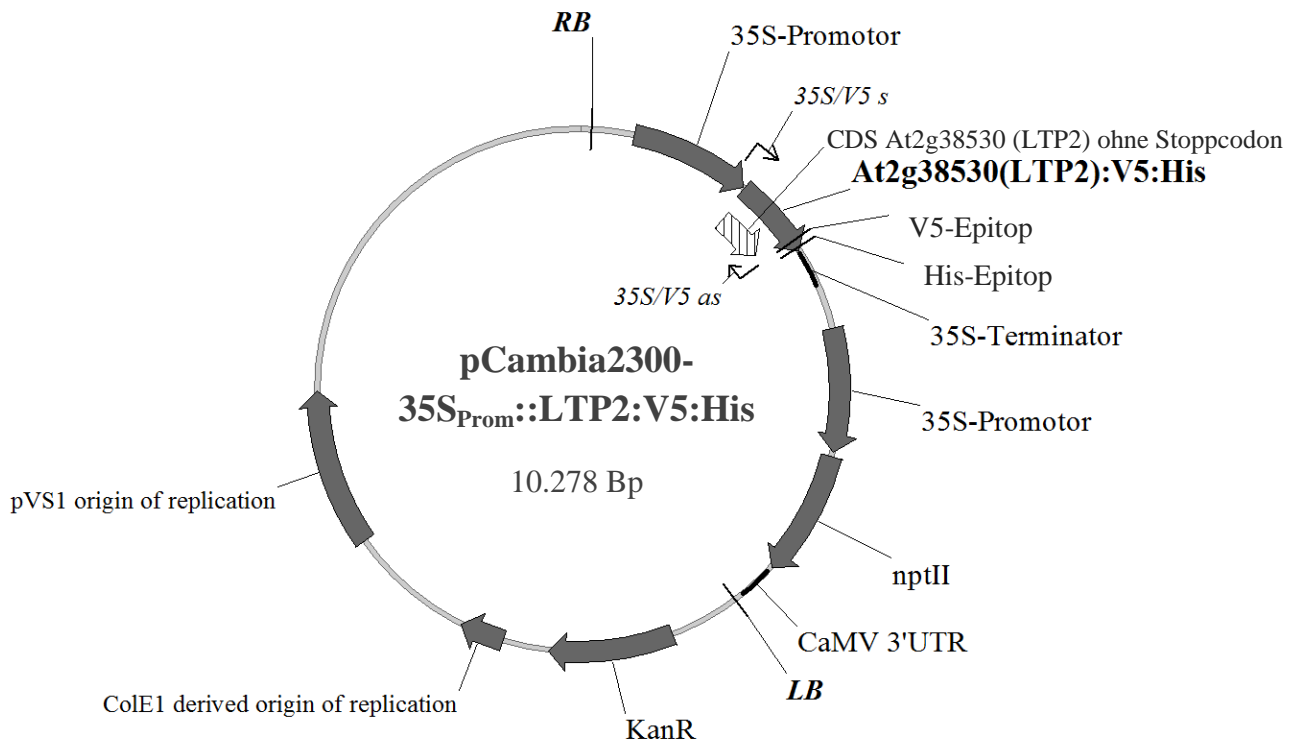
Gen-ID (AGI-Code)	Bezeichnung (Pflanze)	Primer Name	Sequenz 5`-3`	Fragment-Länge [Bp]	$T_m$ [°C]
At1G51500 (CER5) At2g38530 (LTP2)	CER5 <sub>Prom</sub> ::LTP2 <i>A.thaliana</i> (Anhang Abbildung 3)	USERCER5_ Pro s	GGCTTAAUTT CTTTAGTTTG CTTGAGTTCT C	2.990	55
		USERLTP2_ CDS as	GGTTTAAUTC ACCTCACGGT GTTG		
At2g38530 (LTP2)	LTP2 <sub>Prom</sub> ::GUS <i>A.thaliana</i> (Anhang Abbildung 4)	LTP2GUS-s	GAAACGCAG CACGATACGC T	679	55
		LTP2GUS-as	GATTCACACC GTCGGATTGG		
At2g38530 (LTP2)	LTP2:V5:His BY-2 Zellkultur (Anhang Abbildung 2)	35S/V5 s	TGACGTAAGG GATGACGCA	570	55
		35S/V5 as	GGAGAGGGT TAGGGATAGG		



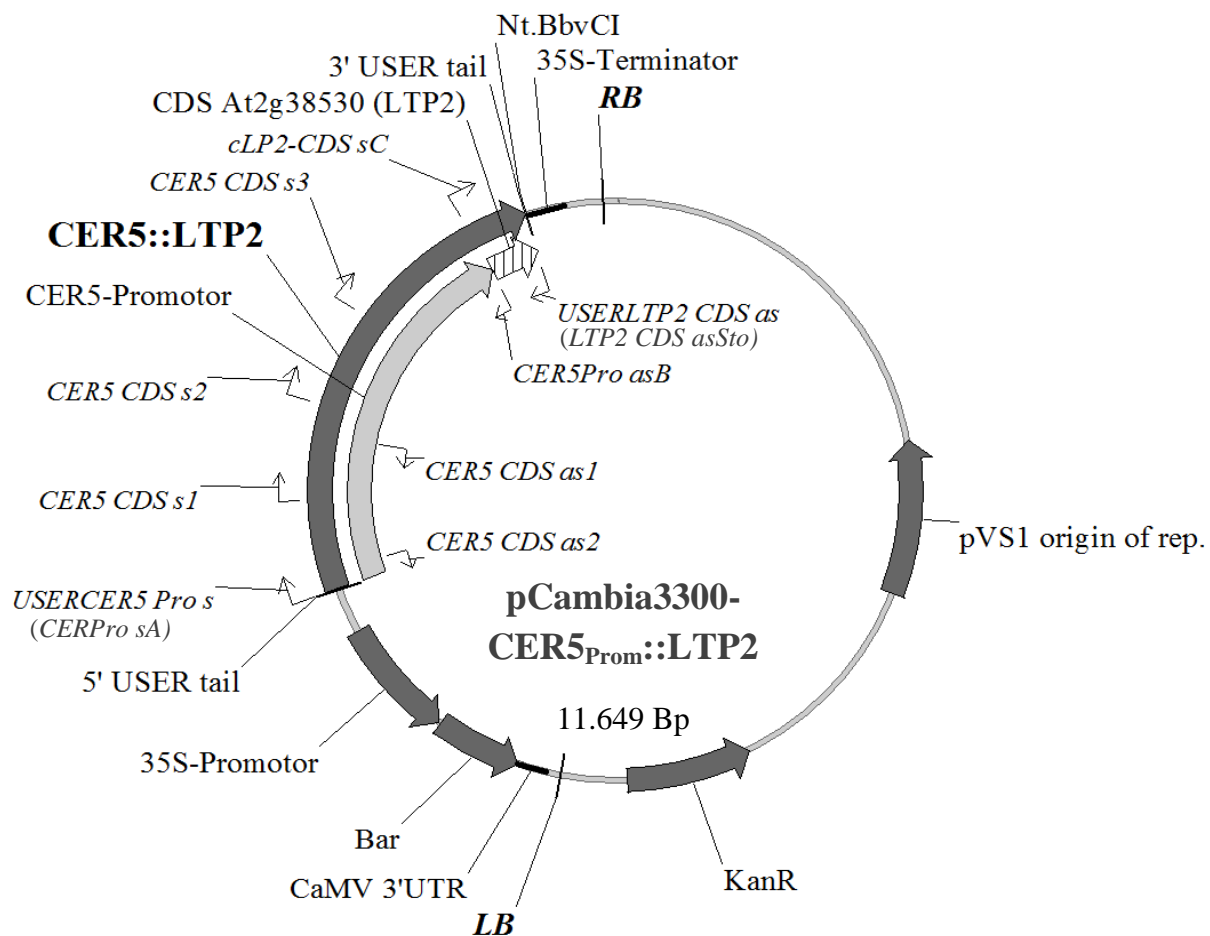
### 8.3. Vektoren



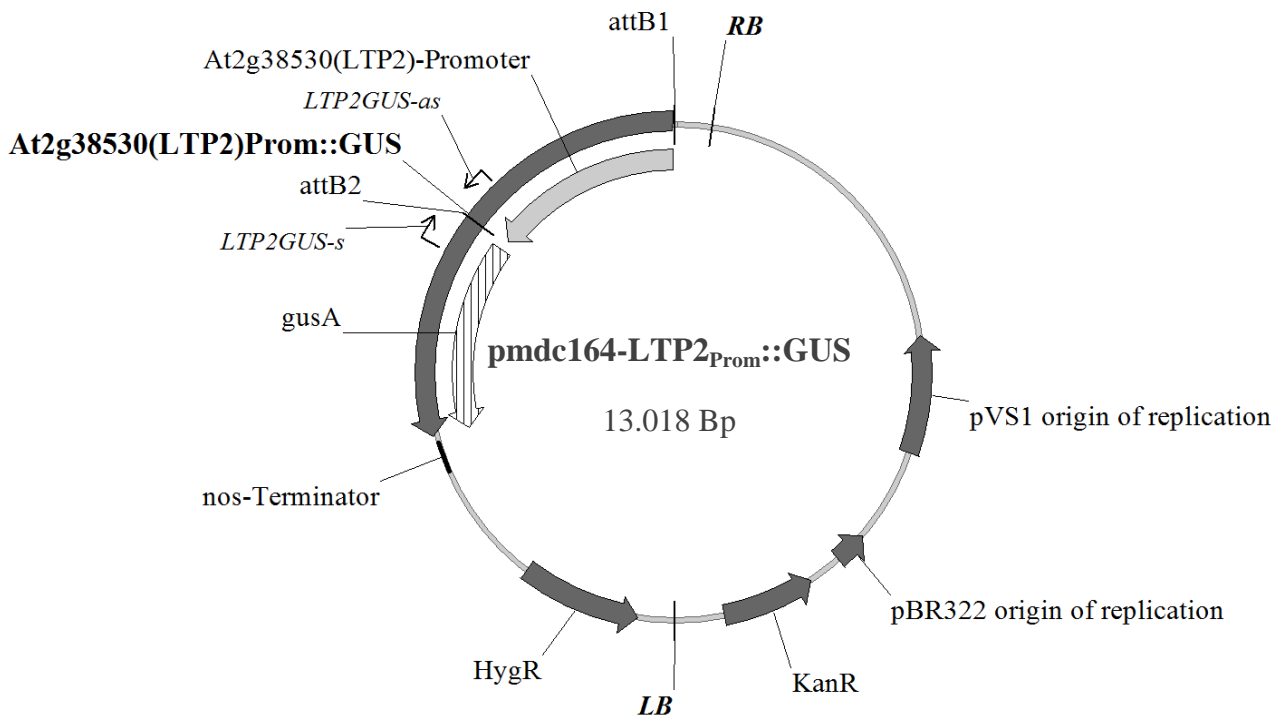
**Anhang Abbildung 1** Expressionsvektor pET28b mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38530 (*LTP2*) ohne Exportsignal und ohne Stoppcodon fusioniert mit dem V5/6xHis Epitop (pET28b-T7<sub>Prom</sub>::LTP2:V5:His; **2.7.1.1.**). Der Vektor wurde zur heterologen Expression von dem LTP2:His/V5 Fusionsprotein im *E.coli* Kultur-System verwendet. KanR: Kanamycin-Resistenz-Gen; LacI: Lac-Repressor Protein; LTP2-*NcoI* ks & V5-*SalI* as: Klonierungs- sowie Sequenzierungsprimer (**Anhang Tabelle 3**); T7-Promotor: Promotor spezifisch für die T7-RNA-Polymerase.



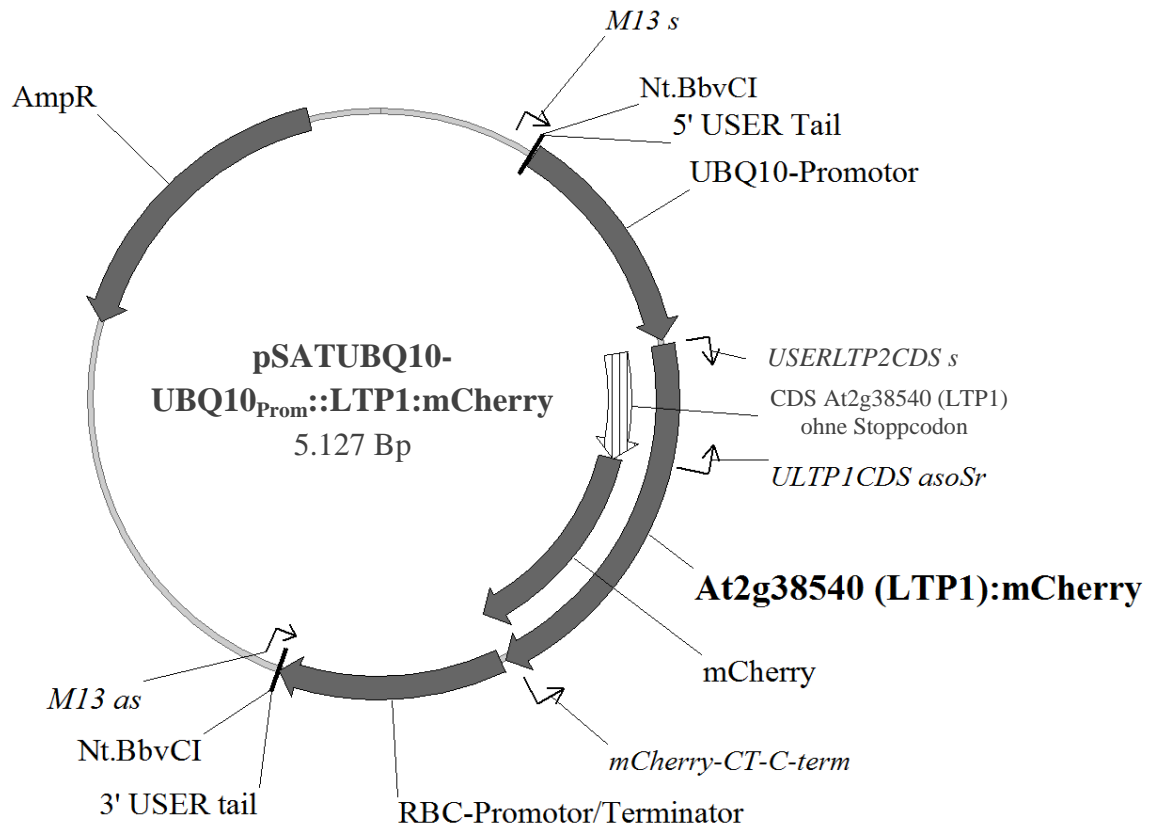
**Anhang Abbildung 2** Binärer Vektor pCambia2300 mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38530 (*LTP2*) ohne Stoppcodon fusioniert mit dem V5/6xHis-Epitop (pCambia2300-35S<sub>Prom</sub>::LTP2:V5:His; 2.7.1.1.). Der Vektor wurde für die Generierung von transgenen Zellkulturen verwendet. KanR: Kanamycin-Resistenz-Gen; LB: „left border“ der T-DNA-Insertion; *NptII*: Neomycin Phosphotransferase; RB: „right border“ der T-DNA-Insertion; 35S/V5 s und 35S/V5 as Primer zur Genotypisierung von transgenen *BY-2* Zellkulturen (**Anhang Tabelle 7**). Vektor erhalten von Dr. Jörn Klinkenberg, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie; Halle.



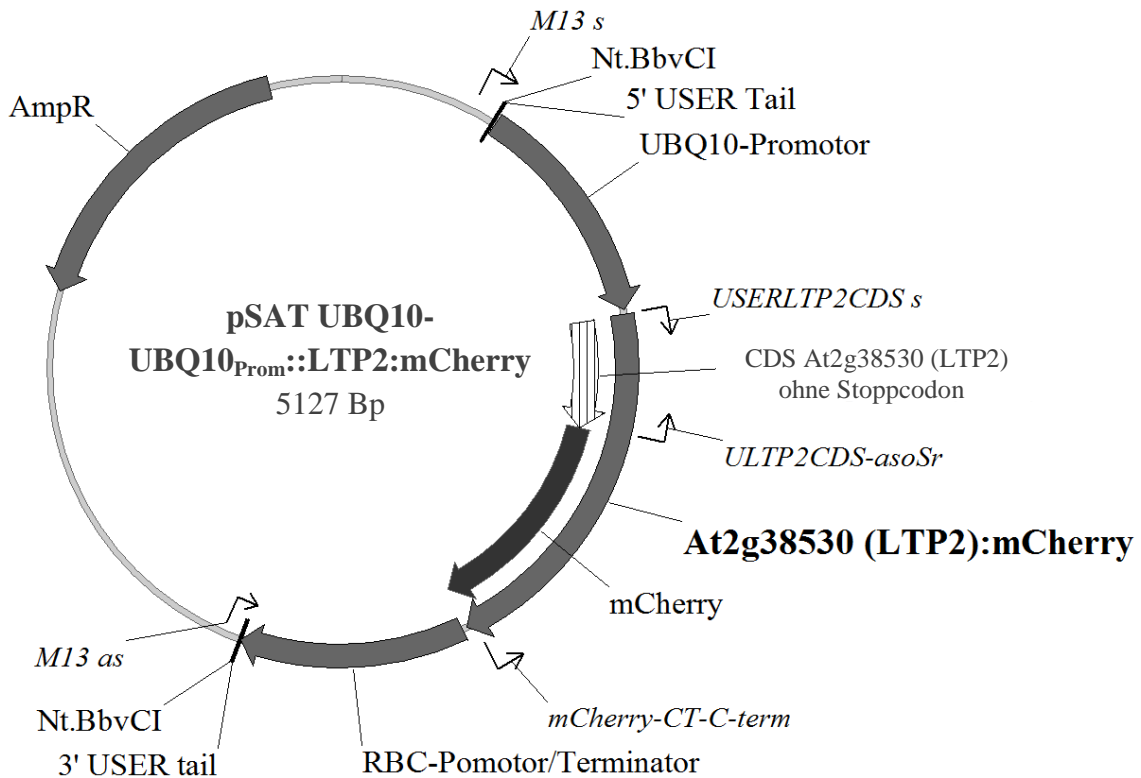
**Anhang Abbildung 3** Binärer Vektor pCambia3300 mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38530 (*LTP2*) unter der Kontrolle des von Pighim et al. (2004) definierten putativen At1G51500 (*CER5*) Promotors (pCambia3300-*CER5*<sub>prom</sub>::*LTP2*). Der Vektor wurde zur ektopischen Expression von *LTP2* in epidermalen Zellen von *Arabidopsis thaliana* verwendet (2.7.1.1). Bar: Resistenz-Gen gegen Glufosinat (Basta); KanR: Kanamycin-Resistenz-Gen; LB: „left border“ der T-DNA-Insertion; RB: „right border“ der T-DNA-Insertion; *CER5* CDS s1, *CER5* CDS s2, *CER5* CDS s3, *CER5* CDS as1, *CER5* CDS as2 & *cLP2*-CDS sC: Sequenzierungsprimer (Anhang Tabelle 5); *CER5*Pro sA, *CER5*Pro sB, *cLP2*-CDS sC, *LTP2*CDS asSto, *USERCER5* Pro s & *USERLTP2* CDS as: Klonierungsprimer (Anhang Tabelle 4); *USERCER5* Pro s & *USERLTP2* CDS as: Genotypisierungsprimer (Anhang Tabelle 7).



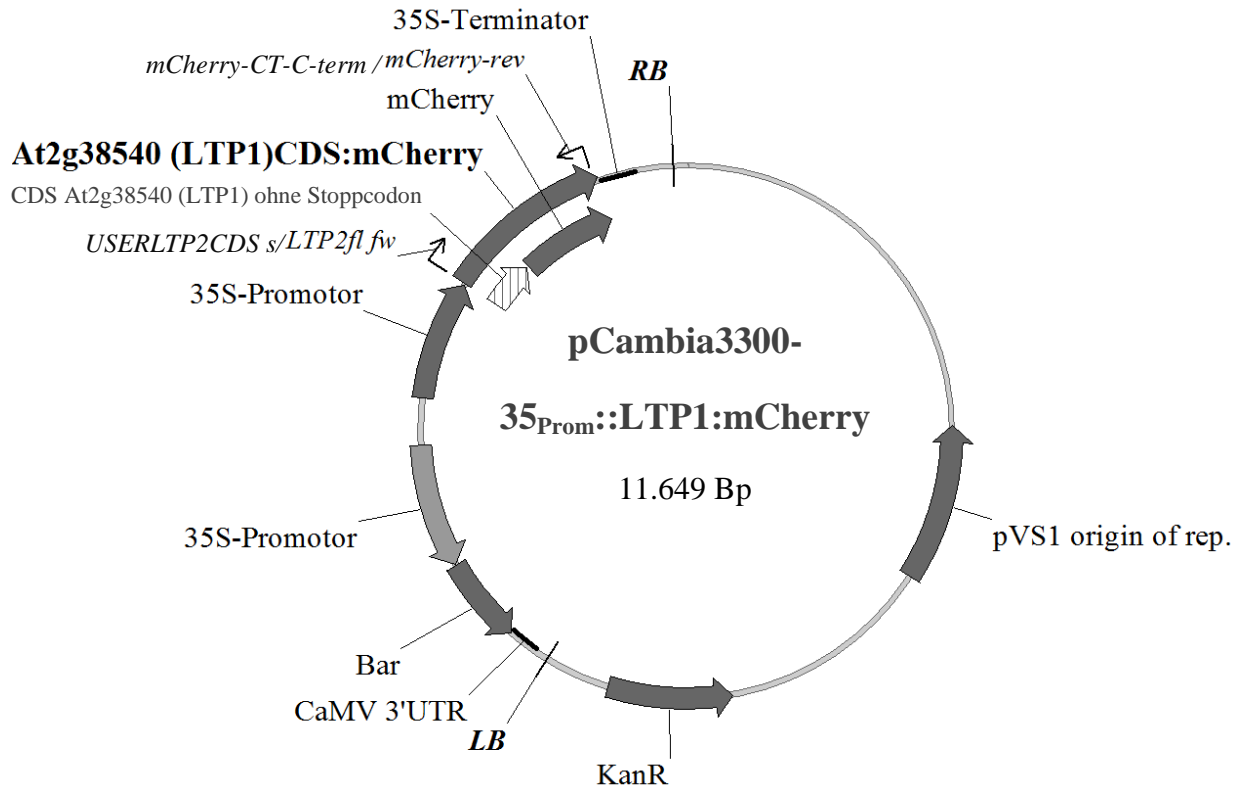
**Anhang Abbildung 4** Rekombinanter Vektor pmdc164 inklusive der At2g38530 (*LTP2*) Promotor-Insertion *stromaufwärts* des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens. Der Vektor wurde verwendet um *LTP2* organ- sowie gewebsspezifisch zu lokalisieren. AttB1 & AttB2: Rekombinationsseiten; HygR: Hygromycin-Resistenz-Gen; KanR: Kanamycin-Resistenz-Gen; LB: „left border“ der T-DNA-Insertion; RB: „right border“ der T-DNA-Insertion; LTP2GUS-s und LTP2GUS-as Primer als Genotypisierungsprimer der transgenen Pflanzenlinien (**Anhang Tabelle 7**). Transgene Pflanzen in der T1-Generation erhalten von Dr. Jörn Klinkenberg, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie; Halle.



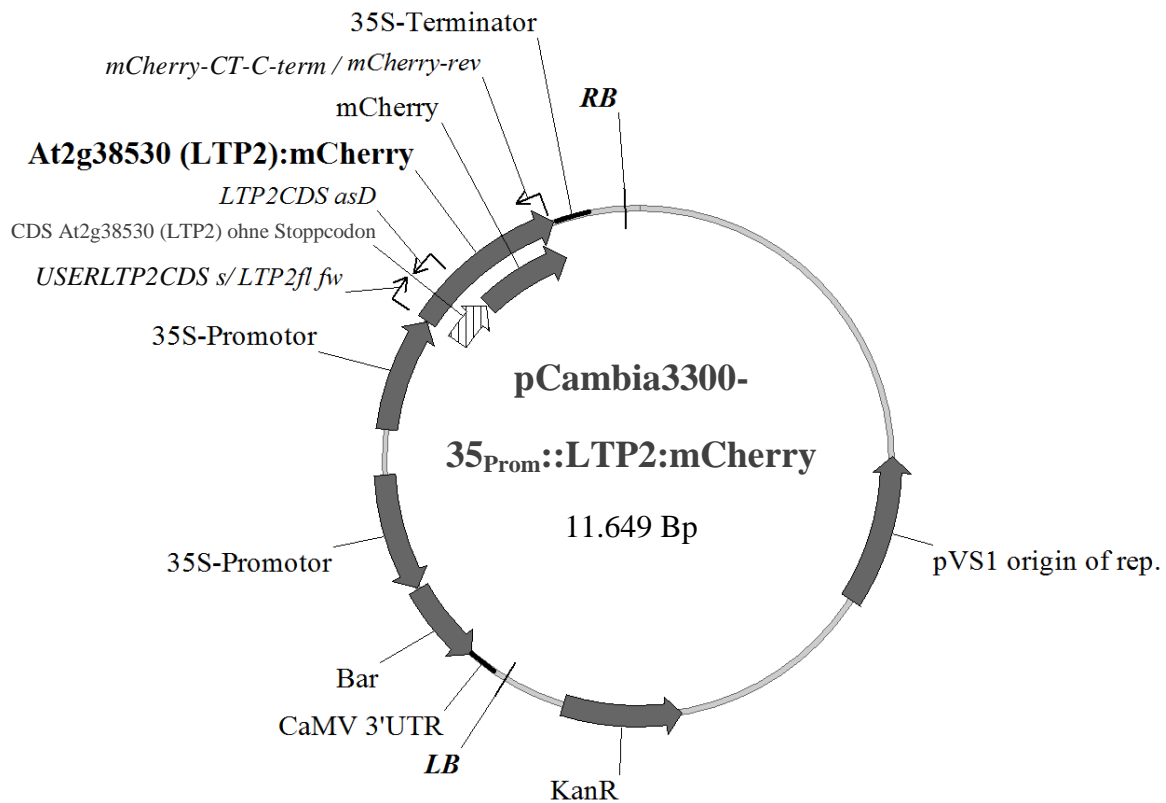
**Anhang Abbildung 5** Vektor pSATUBQ10 mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38540 (LTP1) und mCherry-Fusion am C-Terminus (pSATUBQ10-UBQ10Prom::LTP1:mCherry). Der Vektor wurde zur Fusion von mCherry an die *LTP1*-CDS benötigt. AmpR: Ampicillin-Resistenz-Gen; M13 s & M13 as: Sequenzierungsprimer (**Anhang Tabelle 5**); USERLTP2CDS s, ULTP1CDS asoSr & mCherry-CT-C-term: Klonierungsprimer (**Anhang Tabelle 3**).



**Anhang Abbildung 6** Vektor pSATUBQ10 mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38530 (LTP2) und mCherry-Fusion am C-Terminus (pSATUBQ10-UBQ10Prom::LTP2:mCherry). Der Vektor wurde zur Fusion von mCherry an die LTP2-CDS benötigt. AmpR: Ampicillin-Resistenz-Gen; M13 s & M13 as: Sequenzierungsprimer (**Anhang Tabelle 5**); USERLTP2CDS s, ULTP2CDS-asoSr & mCherry-CT-C-term: Klonierungsprimer (**Anhang Tabelle 3**).



**Anhang Abbildung 7** Binärer Vektor pCambia3300 mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38540 (LTP1) und der C-terminalen mCherry-Fusion (pCambia3300-35<sub>Prom</sub>::LTP1:mCherry; 2.7.1.2.). Der Vektor wurde zur transienten Expression des LTP1:mCherry-Fusionsproteins in *Nicotiana benthamina* Blättern verwendet, um LTP1 subzellulär zu lokalisieren. Bar: Resistenz-Gen gegen Glufosinat (Basta); KanR: Kanamycin-Resistenz-Gen; LB: „left border“ der T-DNA-Insertion; RB: „right border“ der T-DNA-Insertion; LTP2fl\_fw & mCherry-rev: Sequenzierungsprimer (Anhang Tabelle 5); USERLTP2CDS s & mCherry-CT-C-term: Klonierungsprimer (Anhang Tabelle 3).



**Anhang Abbildung 8** Binärer Vektor pCambia3300 mit der kodierenden Sequenz (engl.: „coding sequence“; CDS) von At2g38530 (LTP2) und der C-terminalen mCherry-Fusion (pCambia3300-35S<sub>Prom</sub>::LTP1:mCherry; 2.7.1.2.). Der Vektor wurde zur transienten Expression des LTP2:mCherry-Fusionsproteins in *Nicotiana benthamina* Blättern verwendet, um LTP2 subzellulär zu lokalisieren. Bar: Resistenz-Gen gegen Glufosinat (Basta); KanR: Kanamycin-Resistenz-Gen; LB: „left border“ der T-DNA-Insertion; RB: „right border“ der T-DNA-Insertion; LTP2fl\_fw, mCherry-rev & LTP2CDS asD: Sequenzierungsprimer (**Anhang Tabelle 5**); USERLTP2CDS s & mCherry-CT-C-term: Klonierungsprimer (**Anhang Tabelle 3**).



## 8.4. Ceramide

**Anhang Tabelle 8** Ceramide bzw. Ceramid-Addukte mit den entsprechenden Elementarkompositionen, Molekulargewichten, sowie der zuerst gemessenen Retentionszeit. Die Detektion erfolgte durch die direkte Kopplung der UPLC mittels ESI an das im Massenspektrometer, welches im negativen Ionisationsmodus betrieben wurde. +AC entspricht dem Acetat-Addukt.

Spezies/Name	Elementar-Komposition	Molekular Gewicht	Retentionszeit
Cer_d18:0_C20:1+AC	C40H79O5N1	652,588	8,16
Cer_d18:0_C22:1+AC	C42H83O5N1	680,619	8,46
Cer_d18:0_C24:1+AC	C44H87O5N1	708,651	8,74
Cer_d18:0_C26:1+AC	C46H91O5N1	736,682	9
Cer_d18:1_C20:0+AC	C40H79O5N1	652,588	8,16
Cer_d18:1_C22:0+AC	C42H83O5N1	680,619	8,46
Cer_d18:1_C22:1+AC	C42H81O5N1	678,604	8,14
Cer_d18:1_C24:0+AC	C44H87O5N1	708,651	8,74
Cer_d18:1_C24:1+AC	C44H85O5N1	706,635	8,44
Cer_d18:1_C26:0+AC	C46H91O5N1	736,682	9
Cer_t18:0_C16:0	C34H69O4N1	554,515	7,54
Cer_t18:0_C16:1	C34H67O4N1	552,499	7,3
Cer_t18:0_C22:0	C40H81O4N1	638,609	8,44
Cer_t18:0_C22:1	C40H79O4N1	636,593	8,28
Cer_t18:0_C24:0	C42H85O4N1	666,640	8,72
Cer_t18:0_C24:1	C42H83O4N1	664,624	8,58
Cer_t18:0_C26:1	C44H87O4N1	692,656	8,86
Cer_t18:1_C16:0	C34H67O4N1	552,499	7,3
Cer_t18:1_C22:0	C40H79O4N1	636,593	8,28
Cer_t18:1_C24:0	C42H83O4N1	664,624	8,58
Cer_t18:1_C24:1	C42H81O4N1	662,609	8,26
Cer_t18:1_C26:0	C44H87O4N1	652,588	8,86
Cer_t18:1_C26:1	C44H85O4N1	680,619	8,57
HyCer_d18:0_h24:1	C42H83N1O4	708,651	8,58
HyCer_d18:1_h16:0	C34H67N1O4	736,682	7,3
HyCer_d18:1_h24:1	C42H81N1O4	652,588	8,26
HyCer_t18:0_h16:1	C34H67N1O5	680,619	6,91
HyCer_t18:0_h22:1	C40H79N1O5	678,604	8,16
HyCer_t18:0_h24:1	C42H83N1O5	708,651	8,46
HyCer_t18:0_h26:1	C44H87N1O5	706,635	8,74
HyCer_t18:1_h16:0	C34H67N1O5	736,682	6,91
HyCer_t18:1_h22:0	C40H79N1O5	554,515	8,16
HyCer_t18:1_h24:0	C42H83N1O5	552,499	8,46
HyCer_t18:1_h26:0	C44H87N1O5	638,609	8,74
HyCer_t18:1_h24:1	C42H81N1O5	636,593	8,14
HyCer_t18:1_h26:1	C44H85N1O5	666,640	8,44

## **9. Publikationen und Präsentationen**

### **9.1. Publikationen:**

### **9.2. Präsentationen:**

## **10. Lebenslauf**





## 11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Funktion des Lipidtransferproteins 2 (LTP2) und dessen Rolle bei der Bildung von durch *Agrobacterium tumefaciens* induzierten Wurzelhalsgallen an *Arabidopsis thaliana***

eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Zudem versichere ich an Eides statt, dass die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt wurde und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet wurde, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertation sucht.

Ich erkläre, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass die Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Ferner erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich nicht bereits früher akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

.....

Ort, Datum

Stefanie Saupe