



Identifikation apoplastischer Proteine mit Hilfe des Transposon Assisted Signal Trapping (TAST)



Anja M. Kuschinski¹, Shamim Rahman¹, Garston H. Mansingh¹, Nik M. Schnorr² and Markus Pauly¹

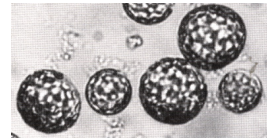
¹Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Am Mühlenberg 1, Golm
²Novozymes, Novo Allé 1B, 2880 Bagsvaerd, Dänemark (* aktuelle Adresse von CHH)

Einleitung

Apoplastische Proteine spielen eine Rolle bei der pflanzlichen Entwicklung, dem Wachstum, sowie der Wechselwirkung zwischen Pflanze und Umwelt. Diese Proteine können zur Abwehr von Pathogenen oder zur Bewältigung von Kältestress dienen. Auch der Zusammenbau der Zellwand findet im Apoplasten statt.

Das Transposon Assisted Signal Trapping (TAST) wurde entwickelt, um mögliche Kandidatengene zu finden, deren entsprechende Proteine im Apoplasten lokalisiert sind. TAST beruht auf der Erkennung und Verwendung der N-terminalen Signalsequenz sekretorischer Proteine. Diese werden mit einem Selektionsmarker im richtigen Leserahmen verbunden.

Da unser Interesse den apoplastischen Proteinen gilt, die am Zusammenbau der Zellwand beteiligt sind, wurde die TAST-Methode verwendet, um mögliche Kandidatengene zu identifizieren. Als Modellsystem dienen uns regenerierende Protoplasten einer *Arabidopsis* Zellsuspension.

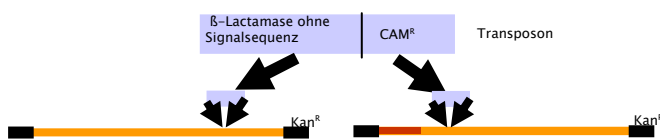


TAST-Methode

1.) cDNA Bibliothek



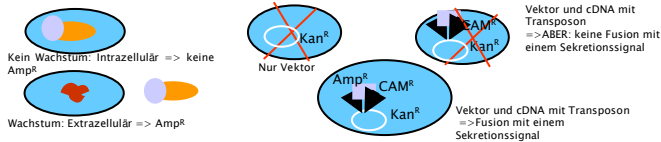
2.) Transposon Reaktion



3.) Transkription and Translation in *E. coli*



4.) Sekretion and Selektion



1) Herstellung einer cDNA Bibliothek aus mRNA regenerierter Protoplasten (0-58h nach der Protoplastierung). Die cDNA wurde in einen *E. coli* Expressionsvektor ligiert, der eine Kanamycinresistenz (Kan^R) trägt.

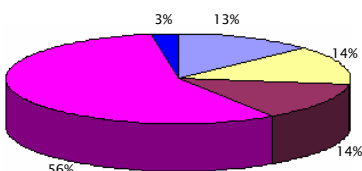
2) Die In-vitro Transposon-Reaktion wurde mit cDNA, Transposon und Transposase durchgeführt. Das Transposon trägt eine β-Lactamase ohne Signalsequenz und eine Chloramphenicolresistenz.

3) Expression in *E. coli*.

4) Die β-Lactamase verleiht der Zelle nur dann die Ampicillinresistenz (Amp^R), wenn sie nach außen transportiert wurde. Eine *E. coli* Zelle kann also nur dann wachsen, wenn eine Fusion zwischen einem Gen mit Sekretionssignalpeptid und der β-Lactamase im Leserahmen erfolgt. Die Sekretion kann anhand einer Dreifachselektion (Kan^R, Amp^R, CAM^R) ermittelt werden.

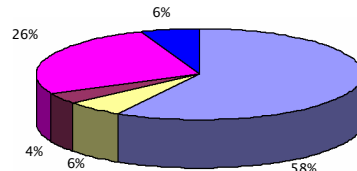
Ergebnisse

5) 600 nicht-getaggte Kolonien wurden mit Kan^R selektiert und anschließend sequenziert. 360 Contigs ergaben sich aus der Sequenzierung. Die N-terminalen Sequenzen wurden mit Hilfe von SignalP/TargetP zugeordnet.



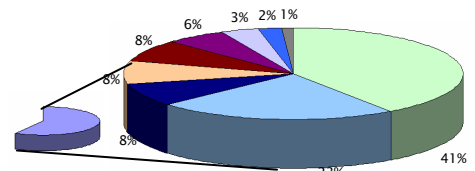
➔ 56% der untersuchten Proteine haben keine Signalsequenz
 ➔ 13% haben ein Sekretionssignalpeptid

6) 600 getaggte Kolonien wurden durch Dreifachselektion (Kan^R, Amp^R, CAM^R) selektiert und sequenziert. 154 Contigs ergaben sich aus der Sequenzierung. Die N-terminalen Sequenzen wurden mit Hilfe von SignalP/TargetP zugeordnet.



➔ 58% der untersuchten Proteine haben ein Sekretionssignalpeptid
 ➔ Mit TAST können die sekretorischen Proteine einer cDNA Population angereichert werden (58% vs 13%)

7) Funktionale Analyse der sekretorischen Proteine



➔ 41% der untersuchten Proteine haben eine unbekannte Funktion
 ➔ Proteine, die an der Zellwandzusammensetzung beteiligt sind konnten mit TAST identifiziert werden (z.B. Hydrolasen, Transglykosylasen, Peroxidasen)

Fazit

- TAST kann in *E. coli* als schnelle Methode verwendet werden, um sekretorische Proteine aus Pflanzen zu identifizieren.
- Der Vergleich mit bereits veröffentlichten apoplastischen Proteinen zeigte, dass Übereinstimmungen mit der Literatur vorhanden sind.
- Durch eine Expressionsanalyse anhand eines Macroarrays konnte die erhöhte Expression der gefundenen Proteine mit Sekretionssignalpeptid während der Zellwandsynthese verifiziert werden.

Ausblick

- Bestätigung der apoplastischen Lokalisation der gewählten Kandidatengene anhand von GFP-Fusionen.
- Funktionale Analyse der Kandidatengene durch Knock-out Mutanten.
- Entwicklung des TAST-Systems in dem Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* durch Verwenden einer Invertase ohne Signalsequenz.