

Mechanismus und Regulation der subzellulären Lokalisation von Saccharose-Synthase



Daniela L. Holtgräwe

Mechanismus und Regulation der subzellulären Lokalisation von Saccharose-Synthase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie/Chemie an der Universität Osnabrück

vorgelegt von
Daniela L. Holtgräwe
aus Osnabrück

Osnabrück, Februar 2005

Danksagung

Für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, stets gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. R. Scheibe herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Wieczorek und Herrn Prof. K. Altendorf möchte ich ganz besonders für ihre nachhaltige Unterstützung bei Problemen und Fragestellungen danken.

Prof. Steven C. Huber, Dr. Heike Sederoff-Winter, Dr. Shane Hardin und Kathery Ducan haben mir einen erfahrungsreichen Forschungsaufenthalt in den USA ermöglicht und sind zu sehr guten Freunden geworden. Thank you!

Ein weiteres Dankeschön gilt Herrn Dr. Hans Merzendorfer, der mir nicht nur bei Problemen und Fragestellungen wissenschaftlich und kollegial zur Seite stand, sondern darüber hinaus für andauernde Motivation für das Themenfeld sorgte.

Über die äußerst nette Gesellschaft sowie die freundschaftliche und wissenschaftliche Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie habe ich mich sehr gefreut, und möchte besonders Dr. Vera Emmerlich, Dr. Jan Backhausen, Bianca Altmann, Sabine Heuer, Sabrina Jung, Heike Schwiderski und Susanne Klocke danken.

Für ihr großes wissenschaftliches und menschliches Engagement, auch nach ihrer Bachelorarbeit, möchte ich Kerstin Schipper danken.

Den Arbeitsgruppen Tierphysiologie, Mikrobiologie und Neurophysiologie sei gedankt für die hervorragende Zusammenarbeit und die freundliche Bereitstellung technischer Geräte.

Janina Jördens, Steffi Hackmann, Janine Glatzer, Jessica Bertram und Andrea Noel danke ich für die schöne Zeit und ihr offenes Ohr außerhalb des Labors.

Besonders herzlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich in jeder Situation unterstützt haben.

Last not least möchte ich ganz, ganz herzlich Kai Christoffer für seine zuverlässige Hilfe und sein Verständnis in allen Lebenslagen danken. Seine aufmunternden Worte, die Übernahme vieler kleiner Aufgaben im Hintergrund und seine Geduld waren mir eine große Hilfe.

Inhaltsverzeichnis**Verzeichnis der Abbildungen****vii****Verzeichnis der Tabellen****x****1 Einleitung****1**

1.1 Saccharose-Stoffwechsel im „Sink“-Gewebe	1
1.2 Die Saccharose-Synthase (SUS)	3
1.2.1 Die Isoenzyme der Saccharose-Synthase	4
1.2.2 Gewebespezifische Transkription von <i>sus</i> -Genen in Mais	4
1.2.3 Zuckervermittelte Regulation der Transkription	5
1.2.4 Regulation der Transkription durch Sauerstoffmangel (Anoxia)	6
1.2.5 Subzelluläre Lokalisation und Funktionen von SUS	6
1.2.6 Regulation der Saccharose-Synthase durch posttranslationale Modifikation	8
1.2.6.1 Regulation durch Phosphorylierung	8
1.2.6.2 Posttranslationale Redox-Modifikation von SH-Gruppen	12
1.2.7 Proteolytischer Abbau der Saccharose-Synthase	13
1.3 Das pflanzliche Cytoskelett	14
1.3.1 Das pflanzliche Aktin-Cytoskelett	15
1.3.2 Das Mikrotubuli-basierende Cytoskelett	18
1.3.3 Interaktionen von SUS mit dem Cytoskelett und der Cellulose-Synthase	19
1.4 Fragestellung	21

2 Material und Methoden**23**

2.1 Chemikalien und Materialien	23
2.2 Pflanzenanzucht von <i>Zea mays</i>	23
2.3 Molekularbiologische Methoden	24
2.3.1 Bakterien- und Hefestämme	24
2.3.2 Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	25
2.3.3 Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> -Kulturen	25
2.3.4 Plasmide	26
2.3.5 Hefe-2-Hybrid cDNA-Bibliothek	27
2.3.6 Oligonukleotide	28
2.4 Molekularbiologische Standardmethoden	29
2.4.1 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
2.4.1.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen	29
2.4.1.2 Herstellung und Transformation elektrokompeter Zellen	29
2.4.2 Herstellung und Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	30
2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	31

2.4.5 Prinzipielle Verfahren zur DNA-Analyse	32
2.4.5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	32
2.4.5.2 Ethanolpräzipitation und Quantifizierung von Nukleinsäuren	32
2.4.5.3 Agarosegelelektrophorese	32
2.4.5.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.4.5.5 Restriktion und Modifikation von DNA	33
2.4.5.6 Dephosphorylierung der kohäsiven Enden von Plasmiden	33
2.4.5.7 Ligation von doppelsträngiger DNA	33
2.4.6 Amplifikation, Klonierung und Mutagenese von cDNA-Konstrukten	33
2.4.6.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	34
2.4.6.2 Einzelstrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	34
2.4.6.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.4.6.4 Ortsspezifische Mutagenese	35
2.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA	36
2.5.1 Kommerzielle Sequenzanalyse	37
2.5.2 DNA-und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung	38
2.6 Das Hefe-2-Hybrid-System (Two-Hybrid-System)	38
2.6.1 Klonierung der Fusionsproteinkonstrukte	41
2.6.1.1 Konstruktion der <i>Bait</i> -Proteine	41
2.6.1.2 Konstruktion der <i>Prey</i> -Proteine	41
2.6.2 Test auf Autoaktivierung des Fusionsproteinkonstruktes	42
2.6.3 Test des Fusionsproteinkonstruktes auf Toxizität	42
2.6.4 Verschmelzen der cDNA-Bank mit Fusionsproteinkonstrukten	43
2.6.5 Selektion diploider Hefezellen	44
2.6.6 α -Galaktosidase Assay	44
2.6.7 Verschmelzungseffizienz und Anzahl der entstandenen Zygoten	45
2.6.8 Validierung von Interaktoren im Hefe-2-Hybrid-System	45
2.7 Arbeiten mit RNA	46
2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	46
2.7.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach US-Patent 5.973.137	46
2.7.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit	47
2.7.2 Isolierung von mRNA aus <i>Zea mays</i>	47
2.7.3 DNase-Verdau der RNA-Proben	47
2.7.4 Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden	48
2.7.5 RNA-Gel-Blot-Analyse („Northern-Blot“)	48
2.7.5.1 Auftrennung von RNA in Agarose-Formaldehydgelen	48
2.7.5.2 Kapillartransfer von RNA	48
2.7.5.3 Hybridisierung mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden	49
2.8 Biochemische Methoden	50

2.8.1 Proteinbestimmung	50
2.8.1.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD	50
2.8.1.2 Proteinbestimmung durch UV-Absorption	50
2.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	50
2.8.2.1 Molekulargewichtsbestimmung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.8.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970)	50
2.8.2.3. Densitometrische Analyse der Konzentrationen von Proteinen	51
2.8.2.4 Harnstoff-Gelelektrophorese	51
2.8.3 Immunologische Methoden	52
2.8.3.1 Western-Blot-Analyse	52
2.8.3.2 Immunchemische Detektion durch Chemilumineszenz (ECL)	53
2.8.3.3 Immunologischer Proteinnachweis durch Farbreaktionen	53
2.8.3.4 „Strippen“ von Blotmembranen	54
2.8.3.5 Gewinnung polyklonaler Antikörper	54
2.8.3.6 Adsorption unspezifischer Bindungsstellen polyklonaler Antiseren	55
2.8.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	55
2.8.3.8 Untersuchung von Co-Pelletierungsfraktionen	58
2.8.3.9 Sandwich-ELISA	59
2.8.4 Extraktion und Reinigung nativer und rekombinanter Proteine	60
2.8.4.1 Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	60
2.8.4.2 Herstellung von Rohextrakt aus <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	60
2.8.4.3 Proteinreinigung über IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography)	60
2.8.4.4 Entfernen des His-tags von Fusionsproteinen durch Enterokinase	61
2.8.4.5 Herstellung von Rohextrakt aus <i>Z. mays</i>	62
2.8.4.6 Reinigung nativer Saccharose-Synthase aus <i>Zea mays</i>	62
2.8.4.7 Gelpermeationschromatographie über Sephadex G25	63
2.8.4.8 Extraktion und Isolierung von Tubulin	63
2.9 Bestimmung von Enzymaktivitäten	65
2.9.1 Enzymaktivitäten der Saccharose-Synthase (SUS)	65
2.9.1.1 Messung der Saccharose-Syntheseaktivität	65
2.9.1.2 Messung der Saccharose-Spaltungsaktivität	66
2.9.2 Bestimmung der GAPDH-Aktivität	68
2.9.3 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität	69
2.9.4 Bestimmung der Enolase-Aktivität	70
2.10 <i>In vitro</i> -Polymerisation von Aktin und Tubulin	70
2.10.1 <i>In vitro</i> -Polymerisation von Aktin	70
2.10.2 Co-Polymerisation von Saccharose-Synthase mit Aktin	70
2.10.3 Co-Polymerisation und Bestimmung der katalytischen Aktivität	71
2.10.4 Co-Polymerisation synthetischer Peptide mit Aktin	72

2.10.5 Aktinbindeversuche mit präpolymerisiertem Aktin	73
2.10.6 Kompetitionsversuche zur Aktinbindung	73
2.10.7 Assemblierung von Mikrotubuli	74
2.10.8 Co-Assemblierung von Mikrotubuli und cytosolischen Proteinen	74
2.11 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung mit radioaktivem ATP	75
2.11.1 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von syntethischen Peptiden	75
2.11.2 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von SUS-Protein	76
2.12 Dephosphorylierung von Proteinen mit Alkalischer Phosphatase	77
2.13 Quantifizierung des Glutathiongehaltes durch „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC)	77
2.13.1 Apparativer Aufbau	78
2.13.2 Kalibrierung der HPLC	78
2.13.3 Vorbereitung der Gewebeproben	78
2.13.4 Bestimmung von proteingebundenem GSH	79
2.13.5 Injektion und Elution der Analyte	79
2.14 Affinitätschromatographie interagierender Proteine	80
2.14.1 SUS-GPx-Bindeversuch	80
2.14.2 Affinitätschromatographie mit Rohextrakt	81
2.15 Protoplastenisolierung	82
2.16 Transformation etiolierter Protoplasten	83
2.17 <i>In vitro</i> und <i>in situ</i> -Glutathionylierung	83
2.18 Alkylierung von Sulfhydryl-Gruppen	84
2.19 Fluoreszenz-Spektroskopie	85
3 Ergebnisse	86
3.1 Klonierung und Expression von Saccharose-Synthase-Isoformen	87
3.1.1 Isolierung von SUS-cDNAs mittels RT-PCR	87
3.1.2 Herstellung der <i>E. coli</i> - und <i>S. cerevisiae</i> -Expressionskonstrukte	88
3.1.3 Heterologe Expression und Reinigung der Saccharose-Synthase-Isoformen	89
3.2 Biochemische Charakterisierung rekombinanter SUS-Isoformen	90
3.2.1 Katalytische Eigenschaften der Isoenzyme	90
3.2.2 Nachweis der Proteinphosphorylierung	96
3.2.3 Immunologischer Nachweis des SuS3-Proteins	100
3.3. Die subzelluläre Lokalisation der Saccharose-Synthase	102
3.3.1 Die Saccharose-Synthase als Aktin-Bindeprotein	103
3.3.1.1. Induktion der SUS-Aktinbindung durch Zucker	103
3.3.1.2 Aktin-Assoziation und Phosphorylierung der Saccharose-Synthase	105
3.3.1.4 Einfluss der Aktinbindung auf die Enzymaktivität von SUS	107
3.3.1.5 Untersuchungen zur Aktinbindestelle in der Saccharose-Synthase	110

3.3.2 Saccharose-Synthase als Tubulin-Bindeprotein	118
3.3.2.1 Isolierung von Tubulin	118
3.3.2.2 <i>In vitro</i> -Bindung von Saccharose-Synthase an Mikrotubuli	119
3.3.2.3 Konkurrenz von SUS und Aldolase um die Bindung an Mikrotubuli	120
3.3.2.4 Bindung von SUS und GAPDH an Mikrotubuli	121
3.3.3. Assoziation der Saccharose-Synthase mit Membranen	125
3.3.3.1 Assoziation von Saccharose-Synthase mit der Cellulose-Synthase	126
3.3.5 Lokalisation der Saccharose-Synthase <i>in situ</i>	129
3.4. Posttranslationale Modifikation von SUS-Protein durch Redox-Regulation	131
3.4.1 Einfluss auf die Spaltungsreaktion	131
3.4.2 Untersuchungen zur Redox-Modifikation der Syntheseaktivität	139
3.4.3 Ortsspezifische Mutagenese an Cysteinen	141
3.4.4 Alkylierung von Sulfhydryl-Gruppen	144
3.4.5 Nachweis der Konformationsänderung durch Fluoreszenzspektroskopie	147
3.4.6 Quantifizierung von freiem und proteingebundenem Glutathion	148
3.4.7 Glutathionylierung durch BioGEE	150
3.4.7.1 Glutathionylierung von Proteinen etiolierter Protoplasten durch BioGEE	150
3.4.7.2 Glutathionylierung von rekombinantem SUS-Protein durch BioGEE	152
3.5 Das Hefe-2-Hybrid-System	154
3.5.1 Durchmusterung der cDNA-Bank	154
3.5.2 Transkriptionale Aktivität und Toxizität	166
3.5.3 Die Saccharose-Synthase als <i>Bait</i> -Protein	157
3.5.3.1 SH1-spezifische Interaktionspartner	157
3.5.3.2 SuSy-spezifische Interaktionspartner	159
3.5.3.3 SuS3 als <i>Bait</i> -Protein	161
3.5.4 Die SNF1-related Proteinkinase (SnRK1) als <i>Bait</i> -Protein	163
3.5.5. Aktin als <i>Bait</i> -Protein	166
3.5.6 Verifizierung von Interaktionen mit dem Hefe-2-Hybrid-System	170
3.6 Verifizierung von Hefe-2-Hybrid-Interaktionen	171
3.6.1 Bindung glykolytischer Enzyme an Aktinfilamente	171
3.6.1.1 Assoziation von GAPDH an Aktinfilamente	172
3.6.1.2 Assoziation von Aldolase an Aktinfilamente	174
3.6.1.3 Assoziation von Enolase an Aktinfilamente	174
3.6.2 Glutathion-Peroxidase als möglicher Bindepartner von SUS	175
3.6.2.1 Klonierung und Expression der cGPx aus <i>Z. mays</i>	175
3.6.2.2 Nachweis der cGPx-Aktivität von rekombinanter cGPx (<i>Z. mays</i>)	176
3.6.2.3 „Northern-Blot“-Analyse zur Transkription von cGPx	177
3.6.2.4 Nachweis einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen SUS und cGPx	174
3.6.2.5 Affinitätschromatographie mit Mais-Rohextrakt	179

3.6.2.6 Sandwich-ELISA und Co-Sedimentationsversuch	180
3.7 Die SNF1-Proteinkinase 1 aus <i>Z. mays</i> (SnRK1)	181
3.7.1 Amplifikation der SnRK1-cDNA	183
3.7.2 Analyse der Transkriptgehalte für SnRK1 in <i>Z. mays</i>	183
3.7.3 Untersuchungen zur Phosphorylierung der GAPDH	184
3.7.3.1 Vorhersage von Phosphorylierungsstellen der GAPDH	185
3.7.3.2 Immunologische Detektion der Phosphorylierung	185
4 Diskussion	187
4.1 Vergleichende biochemische Charakterisierung von SUS-Isoformen	188
4.1.1. Kinetische Eigenschaften der SUS-Isoenzyme	189
4.1.2. Immunologischer Nachweis von SuS3-Fragmenten in <i>Zea mays</i>	190
4.1.3 Untersuchungen zur N-terminalen Phosphorylierung von SuS3	191
4.2 Posttranslationale Redox-Modifikation von SUS-Isoformen	193
4.2.1 Einfluss auf die Spaltungsreaktion	194
4.2.2 Thioredoxine als mögliche Mediatoren der Redoxmodulation	195
4.2.3 Die Syntheseaktivität	195
4.2.4 Untersuchungen zur Identifizierung inter- oder intramolekularer Disulfidbindungen	196
4.3 Einfluss von Phosphorylierung auf katalytische und assoziative Aktivität der SUS-Isoformen	200
4.4 Metabolische Regulation der Aktinbindung	202
4.5 Identifizierung der potentiellen Aktinbindestelle der Saccharose-Synthase	204
4.6 Die mögliche Assoziation von SUS mit Membranproteinen	206
4.7 Identifizierung proteinogener Bindepartner mit dem 2-Hybrid-System	209
4.7.1 Identifizierung proteinogener Bindepartner der Saccharose-Synthase	209
4.7.2 Identifizierung proteinogener Bindepartner von Mais-Aktin	213
4.7.3 Identifizierung proteinogener Bindepartner der SnRK1	216
4.8 Biochemischer Nachweis ausgewählter Hefe-2-Hybrid-Interaktionen	217
4.8.1 Nachweis einer direkten Protein:Protein-Interaktion zwischen SUS und cGPx	217
4.8.2 Enzyme der pflanzlichen Glykolyse binden direkt an Aktinfilamente <i>in vitro</i>	219
4.8.3 Die Saccharose-Synthase assoziiert mit Mikrotubuli <i>in vitro</i>	220
5 Zusammenfassung	223
6 Literatur	226
Anhang	

Verzeichnis der Abbildungen

1 Einleitung

Abb. 1.1: Stoffwechselweg von der Saccharose zur Stärke.	3
Abb. 1.2: Modell zur subzellulären Lokalisationen der Saccharose-Synthase (SUS).	7
Abb. 1.3: SnRK1 reguliert Enzymaktivitäten, indem der Aktivierungsstatus wichtiger Enzyme oder die Expression ihrer Gene beeinflusst werden.	11
Abb. 1.4: Modell zur Regulation von SUS durch proteolytischen Abbau.	14

2 Material und Methoden

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Hefe-2-Hybrid-Systems.	40
Abb. 2.2: Schachbrett-Verdünnung in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte.	56
Abb. 2.3: Belegung der Mikrotiterplatte mit Positiv- und Negativproben des Sandwich-ELISAs.	59
Abb. 2.4: Schematische Darstellung eines Chromatogramms.	80

3 Ergebnisse

Abb. 3.1.1: Agarosegelelektrophorese zur Analyse des RT-PCR-Produktes von SUS1.	87
Abb. 3.1.2: Agarosegelelektrophorese zur Analyse des RT-PCR-Produktes von SH1.	88
Abb. 3.1.3: Agarosegelelektrophorese zur Analyse des RT-PCR-Produktes von SuS3.	88
Abb. 3.1.4: Expression und Reinigung der heterolog exprimierten SUS-Proteine.	90
Abb. 3.2.1: Kinetik der Saccharose-Spaltreaktion von SUS-Isoenzymen.	91
Abb. 3.2.2: pH-Optima der Saccharose-Spaltreaktion von SUS-Isoformen.	92
Abb. 3.2.3: Substratspezifität der SUS-Isoformen zur Synthese von UDP-Glucose.	93
Abb. 3.2.4: Kinetik der Saccharose-Synthesereaktion von SUS-Isoformem.	95
Abb. 3.2.5: Sequenzalignment vom N-Terminus der SUS-Isoformen SUS1 und SuS3 aus Mais.	96
Abb. 3.2.6: FPLC-Elutionsprofil der Maiskinasen.	98
Abb. 3.2.7: SDS-Gelelektrophorese des FPLC-Elutionsprofils zur Anreicherung von Kinasen.	98
Abb. 3.2.8: Calciumabhängige Phosphorylierung N-terminaler Peptide divergenter Saccharose-Synthase-Isoformen.	98
Abb. 3.2.9: Phosphorylierung synthetischer Peptide durch Mais-Kinaseaktivität in Abhängigkeit von Calcium.	100
Abb. 3.2.10: Reaktion der Anti-SuS3- und Anti-SuS-ct-Antikörper im Immunblot von Mais-, Kartoffel- und SUS-exprimierenden <i>E. coli</i> -Extrakten.	101
Abb. 3.2.11: Immunreaktion der Anti-SuS-ct und Anti-SuS3-Antikörper in verschiedenen Geweben von <i>Z. mays</i> .	102
Abb. 3.3.1: Induktion der SUS-Aktinbindung durch verschiedene Zucker.	103
Abb. 3.3.2: Co-Polymerisation nativer Saccharose-Synthase (SUS) mit Aktin in Gegenwart verschiedener Zuckerkonzentrationen.	104
Abb. 3.3.3: Co-Polymerisation rekombinanter Saccharose-Synthase mit Aktin in molaren Verhältnissen oberhalb der Assoziationssättigung.	106
Abb. 3.3.4: Einfluss der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von SUS-Protein auf die Aktinbindung.	107

Abb. 3.3.5: Metabolische Regulation der Aktin-Assoziation von rekombinanter SUS.	108
Abb. 3.3.6: Katalytische Aktivität von nativem SUS-Protein in An- und Abwesenheit von Aktin.	109
Abb. 3.3.7: Katalytische Aktivität von SuSy-wt in An- und Abwesenheit von Aktin.	110
Abb. 3.3.8: Sequenzbereiche von SUS1 mit Homologien zu bekannten Aktinbindedomänen.	111
Abb.: 3.3.10: Co-Polymerisation synthetischer Peptide mit Aktin.	113
Abb. 3.3.11: Ähnlichkeiten der synthetischen Peptide und Bündelaktivität in Co- und Postpolymerisationsversuchen.	114
Abb. 3.3.12: Konkurrenz von SUS-homologen, synthetischen Peptiden und nativem SUS-Protein um die Bindung an Aktinfilamente.	115
Abb. 3.3.13: Immunblot der Pelletfraktionen eines Assoziationsversuches mit synthetischen Peptiden, nativem SUS-Protein und Aktin.	116
Abb. 3.3.1.14: Immunblot von Fraktionen eines Assoziationsversuches mit synthetischen Peptiden, nativem SUS-Protein und Aktin.	117
Abb. 3.3.1.15: Sequenzvergleich synthetischer Peptide und SUS1 zur Identifizierung konservierter Aminosäuren.	117
Abb. 3.3.1.16: Aktinbindeversuch mit mutagenisiertem SUS-Protein.	118
Abb. 3.3.2.1: SDS-PAGE verschiedener Fraktionen der Tubulinreinigung (links) und Proteingehalte der Tubulineluate nach der PC-Säulenchromatographie (rechts).	119
Abb. 3.3.2.2: Konzentrationsabhängige Assoziation von SUS an Mikrotubuli.	120
Abb. 3.3.2.3: SDS-PAGE der zeitabhängigen Co-Assemblierung von SuSy-wt und Mikrotubuli-Protein.	120
Abb. 3.3.2.4: SDS-PAGE eines exemplarischen Wettbewerbsversuches zwischen SuSy-wt und Aldolase um Mikrotubuli-Assoziation.	121
Abb. 3.3.2.5: Assemblierung und Disassemblierung von MTs in An- und Abwesenheit der Enzyme GAPDH und Saccharose-Synthase.	122
Abb. 3.3.3.1: Hypothetisches Modell zur Assoziation von Saccharose-Synthase mit dem membranständigen Rosetten-Komplex der Cellulose-Synthase.	126
Abb. 3.3.3.2: Affinitätschromatographie von rek. HVR und Rohextrakt aus Mais.	128
Abb. 3.3.5.1: Lokalisation von SuSy-GFP in transformierten Mais-Protoplasten nach 20 h Inkubation.	130
Abb. 3.4.1: Netto-Spaltungsaktivität von SuS3 und SuSy-wt.	132
Abb. 3.4.2: Spaltungsaktivität unter Einfluss von DTT _{red} nach Vorinkubation.	133
Abb. 3.4.3: Spaltungsaktivität unter Einfluss von DTT _{red} und DTT _{ox} .	134
Abb. 3.4.4: Wirkung von GSH und GSSG auf die Spaltungsaktivität von SUS-Isoformen.	135
Abb. 3.4.5: SDS-PAGE mit verschiedenen rekombinanten Thioredoxinen.	136
Abb. 3.4.6: Effekte verschiedener Td auf die Saccharose-Spaltungsaktivität von SuSy-wt.	137
Abb. 3.4.7: Effekt von Td auf die Spaltungsaktivität von SuSy-wt bei hohen DTT _{red} -Konzentrationen.	138
Abb. 3.4.8: Effekt von verschiedenen Td auf die Spaltungsaktivität von SuS3.	138
Abb. 3.4.9: Saccharose-Eichgerade für die Untersuchung der Syntheserichtung.	139
Abb. 3.4.10: Syntheseaktivität von SuSy-wt mit DTT _{ox} und DTT _{red} .	140
Abb. 3.4.11: Syntheseaktivität von SuS3 mit DTT _{ox} und DTT _{red} .	141
Abb. 3.4.12 Netto-Spaltungsaktivität von SuSy-wt und C352S in Abhängigkeit von der DTT _{red} -	143

Konzentration.	
Abb. 3.4.13: Syntheseaktivität des Wildtyps und der Cysteinmutante mit GSH und GSSG.	143
Abb. 3.4.14: Einfluss von Thioreagenzien auf die Aktin-Assoziation von SUS	144
Abb. 3.4.15: BN-SDS vom rekombinanten Saccharose-Synthase-Wildtyp.	145
Abb.3.4.16: Ein-Schritt-Alkylierung von SuSy-wt in Gegenwart in IAA/IAM.	145
Abb. 3.4.17: (A) Elektrophoretische Auftrennung der C352S-Mutante (B) Ein-Schritt-Alkylierung von C352S.	146
Abb. 3.4.18: Alkylierung von SH-Gruppen vor und nach Reduktion.	147
Abb. 3.4.19: Fluoreszenzemissionsspektrum von SUS-Protein bei 280 nm Anregung.	148
Abb. 3.4.20: Quantifizierung von freiem und proteingebundenem Glutathion.	149
Abb. 3.4.21: Immundetektion von SUS-Protein in Gewebeproben der HPLC-Analyse.	149
Abb. 3.4.22: Etiolierte Mais-Protoplasten nach Inkubation mit Diamide und BioGEE.	150
Abb. 3.4.23: Immunologischer Nachweis der Bindung von BioGEE an Proteine etiolierter Mais-Protoplasten.	151
Abb. 3.4.24: Immunologischer Nachweis von SUS-Protein in etiolierten Protoplasten.	152
Abb. 3.4.25: Vergleich der Enzymaktivitäten von BioGEE-behandelter und unbehandelten SUS-Proben.	152
Abb. 3.4.26: Immunologische Analyse BioGEE-behandelter und unbehandelter SuSy-wt-Proben.	153
Abb. 3.5.1.: <i>Bait</i> -Konstrukte für die Durchmusterung einer cDNA-Bank aus anaerob kultiviertem Maisgewebe.	155
Abb. 3.5.2: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Paarungskultur von <i>S. cerevisiae</i> .	155
Abb. 3.5.3: Restriktionsanalyse positiver AD-Plasmide aus der cDNA-Durchmusterung mit Aktin.	167
Abb. 3.5.4: Test auf positive Hefe-2-Hybrid-Interaktion zwischen SUS1 und Aktin.	171
Abb 3.6.1: Lösliche und Aktin-gebundene GAPDH im Co-Sedimentationsversuch.	172
Abb. 3.6.2: Kompetitionsversuch zur Bindung von GAPDH und SUS an Aktinfilamente.	173
Abb. 3.6.3: ELISA-Quantifizierung Aktin-gebundener Enzyme.	173
Abb. 3.6.4: Co-Sedimentation von Alodase und SUS in An- und Abwesenheit von Aktin.	174
Abb. 3.6.6: Induktion der Enolase-Aktin-Bindung durch MgCl ₂ und GTP.	175
Abb. 3.6.7: Heterologe Expression und Anreicherung von cGPx.	176
Abb. 3.6.8: „Northern-Blot“-Analyse der Transkription von cGPx in Mais-Geweben.	177
Abb. 3.6.9: Affinitätschromatographie zur Bindung von SuSy-wt an cGPx.	178
Abb. 3.6.10: Identifikation von cGPx durch Strep- <i>tag</i> -Antikörper.	179
Abb. 3.6.11: Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie mit Mais-Rohextrakt.	180
Abb. 3.6.12: Absorption der SUS/cGPx-Bindeproben im Sandwich-ELISA.	181
Abb. 3.7.1: Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch SnRK1.	182
Abb. 3.7.2: RT-PCR zur Amplifikation der SnRK1-cDNA.	183
Abb. 3.7.3: „Northern-Blot“-Analyse der Transkription von SnRK1 in verschiedenen Mais-Geweben.	184
Abb. 3.7.4: Immunologischer Nachweis der Serin-Phosphorylierung von GAPDH.	186
Abb. 3.7.5: Immunblot der Phosphorylierung von rekombinanter und nativer GAPDH.	186

4 Diskussion

Abb. 4.1: Modell zur Regulation der subzellulären Lokalisation der Saccharose-Synthase aus Mais durch Proteinphosphorylierung.	201
Abb. 4.2: „Aminosäure-Alignment“ von homologen Sequenzabschnitten der Saccharose-Synthase aus <i>Zea mays</i> L. mit Aktinen und Arp2-Proteinen.	205
Abb. 4.3: 3D-Struktur des Aktin-DnaseI-Komplexes (Cn3d, NCBI) (Lorenz et al., 1993).	206
Abb. 4.4: Hypothetisches Modell der Interaktion und Lokalisation von Saccharose-Synthase mit Aktinfilamenten, Mikrotubuli, Cellulose-Synthase und anderen Proteinen.	222

Verzeichnis der Tabellen

1 Einleitung

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.	24
Tabelle 2.2: Konzentration der verwendeten Antibiotika.	25
Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Dropout-Lösungen für das 2-Hybrid-System.	26
Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren und Plasmide.	26
Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Oligonukleotide.	28
Tabelle 2.6: SDS-Gel-Ansätze mit verschiedenen Acryl/Bisacrylamidanteilen.	51
Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Antikörper.	53
Tabelle 2.8: Zu Co-Polymerisationsversuchen eingesetzte, synthetischen Peptide.	72
Tabelle 2.9: Auflistung der zur <i>in vitro</i> -Phosphorylierung eingesetzten Peptide.	76
Tabelle 2.10: Inkubationsansätze für die GSH- bzw. GSSG-Bestimmung.	79

3 Ergebnisse

Tabelle 3.1: Synonyme der Saccharose-Synthase Isoformen.	87
Tabelle 3.2: NDP-Spezifität der SUS-Isoformen bei der Saccharose-Spaltreaktion.	94
Tabelle 3.3: Kinetische Charakteristika der Synthesereaktion von SuS3 und SuSy-wt.	96
Tabelle 3.4: Vergleich der umgebenden Aminosäuren relativ zum phosphorylierbaren Serin der CDPK-Konsensussequenz und der synthetischen Peptide.	97
Tabelle 3.5: Einfluss von Metaboliten auf die Bindung von nativer SUS an Aktin sowie auf die katalytische Aktivität.	104
Tabelle 3.6: Kinetische Konstanten der Saccharose-Spaltungsaktivität und Saccharose-Syntheseaktivität von nativer SUS im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp und mutagenisierten SUS-Proteinen.	105
Tabelle 3.7: Nukleotidspezifität der Aktinassoziation.	108
Tabelle 3.8: Sequenzen synthetischer Peptide, die hinsichtlich ihrer Aktin-Assoziation untersucht wurden.	111
Tabelle 3.9: Konkurrenz zwischen SuSy-wt und Aldolase um Mikrotubuli-Assoziation.	121
Tabelle 3.10: Verteilung der Enzymaktivitäten und -Mengen im Assemblierungsansatz.	123

Tabelle 3.11: Pelletierung kältebehandelter Mikrotubuli.	124
Tabelle 3.12: Enzymaktivitäten und Proteinmengen in Disassemblierungsfractionen.	125
Tabelle 3.13: Phänotypen diploider Hefezellen.	129
Tabelle 3.14: Kinetische Parameter der SUS-Isoformen in Abhängigkeit von DTT _{red} .	132
Tabelle 3.15: Amminosäure-Positionen von Cysteinresten in SUS1 und SuS3 und Darstellung des Konservierungsniveaus.	142
Tabelle 3.16: Verhältnis von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Maisgeweben.	149
Tabelle. 3.17: Eckdaten der Hefe-2-Hybrid-Analysen.	157
Tabelle 3.18: Primär-Sequenzanalyse der positiven SH1-Interaktionspartner.	158
Tabelle 3.19: Primär-Sequenzanalyse der positiven SUS1-Interaktionspartner.	160
Tabelle 3.20: Primär-Sequenzanalyse der positiven SuS3-Interaktionspartner.	162
Tabelle 3.21: Primär-Sequenzanalyse der positiven SnrK1-Interaktionspartner.	164
Tabelle 3.22: Primär-Sequenzanalyse der positiven Aktin-Interaktionspartner.	168
Tabelle 3.23: Aktivitätsmessung rekombinanter cGPx.	176
Tabelle 3.24: Bindekonstanten von SuSy-wt und cGPx im Sandwich-ELISA.	181
Tabelle 3.25: Mögliche SnRK1-Kinase-Phosphorylierungsdomänen der SUS-Isoformen.	182
Tabelle 3.26: Vorhergesagte Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten.	185

1 Einleitung

Die verschiedenen Organe der Pflanzen haben diverse Aufgaben und biochemische Ansprüche. Für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen spielt die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus eine zentrale Rolle. Die häufigsten Kohlenhydrate in Pflanzen sind Saccharose, Stärke und Cellulose, die als Energieträger, Transportmetabolite und Gerüstsubstanzen aus Fructose und Glucose gebildet werden.

1.1 Saccharose-Stoffwechsel im „Sink“-Gewebe

Da Pflanzen ihr Wachstum sowie ihren gesamten Stoffwechsel der Verfügbarkeit und Form ihrer Kohlenstoffquelle anpassen müssen, fällt dem Export von Endprodukten der Photosynthese aus photoautotrophem „Source“-Gewebe zu den Verbrauchsorten der Pflanze, den so genannten „Sinks“, eine zentrale Bedeutung zu (ESCHERICH und ESCHERICH, 1987). Generell können die „Sink“-Gewebe in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die erste Kategorie umfasst die „Sink“-Gewebe, die die Assimilate hauptsächlich für Wachstum und Entwicklung benötigen und somit ihre metabolische Hauptaktivität durch Respiration gekennzeichnet ist (z.B. sich entwickelnde Früchte und Blätter). Die zweite Kategorie beinhaltet die „Sink“-Gewebe, die importierte Assimilate überwiegend in Form von Stärke, Saccharose und Fruktan akkumulieren (z.B. Knollen). Im englischen Sprachgebrauch spricht man von „utilization sinks“ bzw. „storage sinks“.

In den meisten Pflanzen repräsentiert Saccharose die Haupttransportform des photosynthetisch assimilierten Kohlenstoffs. Bei Landpflanzen wie *Zea mays* L., erfolgt der Transport der Saccharose über die Siebröhren, bei reifen Maisblättern wird das Disaccharid sogar als einziger Zucker in die Siebröhren geladen (WEINER, 1990). In den meisten „Sink“-Geweben findet ein Nettoabbau von Saccharose statt, so dass hier die Saccharosebiosynthese, katalysiert durch die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) in direkter Assoziation mit der Saccharose-6-Phosphat-Phosphatase (SPP), eine untergeordnete Rolle spielt. In den Zellen des „Sink“-Gewebes wird die importierte Saccharose in der Vakuole angereichert und gespeichert oder im Cytosol metabolisiert.

Für den Abbau von Saccharose bieten Pflanzen zwei divergente biochemische Stoffwechselwege. Das Disaccharid kann zum einen hydrolytisch durch Invertasen (INV), gefolgt von einer Phosphorylierung via Hexokinase und Fructokinase, in einer irreversiblen Reaktion umgesetzt werden und steht somit der Zellatmung zur Verfügung. Der alternative, ausschließlich den Pflanzen und Cyanobakterien (LUNN, 2002) vorbehaltene Weg beteiligt die Saccharose-Synthase (SUS). Unter Erhalt der Energie der glykosidischen Bindung katalysiert die Saccharose-Synthase die NDP-abhängige Spaltung von Saccharose in NDP-Glucose und Fructose (AP REES, 1984; BAROJA-FERNÁNDEZ et al., 2003; LI und ZHANG, 2003). Als vornehmliches Produkt *in vivo* wird UDP-Glucose gebildet (NAKAI et al., 1998). Obwohl die durch das Enzym katalysierte Reaktion prinzipiell reversibel ist, agiert die Saccharose-Synthase in „Sink“-Geweben vorwiegend in Richtung der Spaltung von Saccharose

(GEIGENBERGER und STITT, 1991; DÉJARDIN et al., 1997). Die Affinität des Enzyms zur Saccharose ist vergleichsweise gering und die enzymatische Aktivität wird durch die cytosolische Konzentration an Saccharose und UDP limitiert (LOEF et al., 1999). Für die Saccharose-Synthase wurden K_m -Werte zwischen 40-200 mM mit Saccharose als Substrat bestimmt; im Vergleich dazu liegen die K_m -Werte der Invertase bei 7-15 mM (AVIGAD, 1982). Die entstehende UDP-Glucose und Fructose werden für verschiedene Stoffwechselwege wie z.B. Stärkebiosynthese, Glykolyse, Synthese der Strukturglukane und für die Protein-Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum benötigt. Während bei der Synthese von Strukturglukanen wie Cellulose und Callose die UDP-Glucose direkt als Substrat fungieren kann, ist für die Stärkebiosynthese und die Glykolyse eine Konvertierung in Hexose-Phosphate essentiell (Abb. 1.1). Unter Verbrauch von Pyrophosphat (PP_i) wird durch die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase) Glucose-1-Phosphat und UTP gebildet. Die im UTP konservierte Energie kann wiederverwertet und für die Phosphorylierung der Fructose genutzt werden. Somit unterscheiden sich die beiden durch Invertase und Saccharose-Synthase vermittelten Stoffwechselwege zur Mobilisierung von Saccharose zu Hexosephosphaten in ihrem Energieaufwand. Der Abbau eines Moleküls Saccharose durch die Invertase erfordert zwei Moleküle ATP, während der SUS- und UGPase-vermittelte Weg lediglich ein Molekül PP_i benötigt (HUBER und AKAZAWA, 1986; STITT, 1998). Der Gesamtenergieaufwand erniedrigt sich weiter, wenn man einbezieht, dass PP_i , welches als Abfallprodukt in vielen biosynthetischen Reaktionen entsteht, wiederverwertet wird. Speicherkohlenhydrat akkumulierendes „Sink“-Gewebe zeigt häufig einen zyklischen Wechsel zwischen einer Wachstumsphase und einer Akkumulationsphase. Die wechselnde relative Beteiligung Saccharose-spaltender Enzyme während der Bildung, Entwicklung und Reifung von „Sink“-Organen ist aus verschiedenen Organismen, darunter Gerste (WESCHKE et al., 2003), Kartoffel (BOLOGA et al., 2003) und Ackerbohne (BORISJUK et al., 2002), bekannt. Gut untersucht sind Expression und Aktivität von Invertasen und Saccharose-Synthasen im Zusammenhang mit der Initiierung und Differenzierung von Kartoffelknollen. Während in frühen Entwicklungsphasen die Hexosen für Zellstreckung und Respiration hauptsächlich durch die Aktivität von Invertasen bereitgestellt werden, kommt es zeitgleich mit dem einsetzenden Dickenwachstum der Knollen und der Synthese von Stärke zu einer verminderten Invertaseaktivität zugunsten einer hohen SUS-Aktivität.

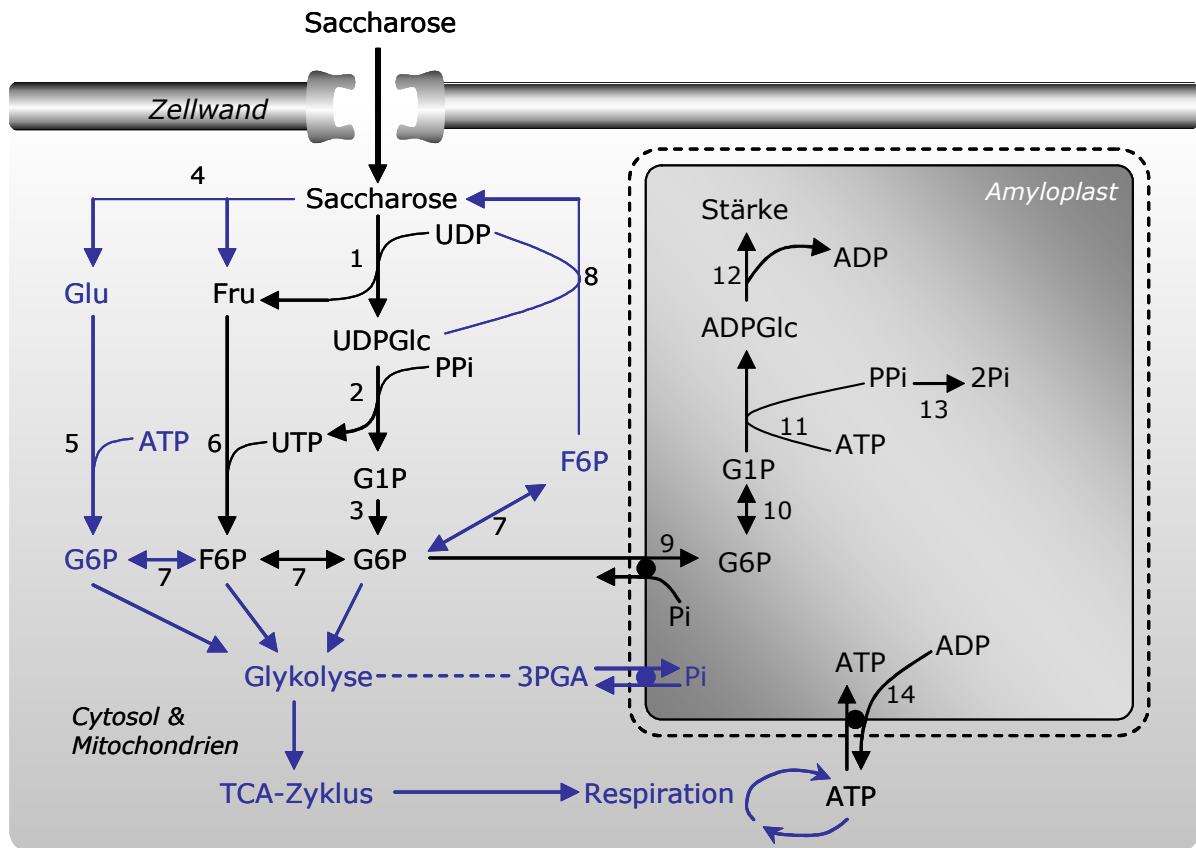


Abb. 1.1: Stoffwechselweg von der Saccharose zur Stärke.

1 Saccharose-Synthase (SUS), **2** UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase), **3** cytosolische Phosphoglucomutase, **4** Invertase (INV), **5** & **6** Hexokinase (HX), **7** Phosphoglukoisomerase (PGI), **8** Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und Saccharose-6-Phosphat-Phosphatase (SSP), **9** Hexosephosphat-Translokator, **10** plastidäre Phosphoglucomutase, **11** ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), **12** Stärke-Synthase (SS), **13** plastidäre Pyrophosphatase, **14** Adenylat-Translokator, **15** Triosephosphat-Translokator.

Im Mais-Endosperm wurde zusätzlich AGPase-Aktivität im Cytosol nachgewiesen und ein Adenylattranslokator (Brittle-1; BT1) für den Transport von ADP-Glucose in den Amyloplasten identifiziert (SHANNON et al., 1998). (Modell nach GEIGENBERGER et al., 2003)

1.2 Die Saccharose-Synthase (SUS)

Die Saccharose-Synthase wurde erstmals 1955 von CARDINI und Mitarbeitern (CARDINI et al., 1955) aus Weizenkeimlingen isoliert. Schon damals wurde beobachtet, dass das Enzym sowohl die Synthese von Saccharose als auch die Spaltung katalysiert. WOLOSUIK und PONTIS (1971) erbrachten erstmals den Beweis für die Existenz zweier SUS-Isoformen, die sich in ihrem kinetischen Verhalten unterschieden. Damals wurde das Vorkommen von zwei Isoenzymen mit der dualen Fähigkeit von SUS, sowohl die Spaltung als auch die Synthese zu katalysieren, in Verbindung gebracht. Obwohl mittlerweile aus zahlreichen pflanzlichen Spezies SUS isoliert und charakterisiert wurde, ist die Rolle der verschiedenen Isoenzyme bis heute unklar (BARRATT et al., 2001). Ebenso wie die kinetischen Eigenschaften von Isoformen einer Spezies *in vitro* sehr ähnlich, aber auch überaus verschieden sein können, ist die generell bevorzugte Enzymreaktion *in vivo* nicht eindeutig festgelegt. Für SUS aus Kartoffelknollen wurde die Spaltung von Saccharose *in vivo* als bevorzugte katalytische Reaktion nachgewiesen (GEIGENBERGER und STITT, 1993), während in der Birnenfrucht Nashi

(*Pyrus serotina*) die Synthesereaktion favorisiert wird (TANASE und YAMAKI, 2000). Die variierenden Massenwirkungsquotienten (Konzentration von Produkten/Konzentration von Substraten) scheinen *in vivo* die Gleichgewichtskonstante der SUS-Reaktion zu beeinflussen. Somit ist möglicherweise die Form des vornehmlich akkumulierten Speicherkohlenhydrats für die bevorzugte Enzymreaktion *in vivo* ausschlaggebend.

Arbeiten an Tomate, Kartoffel, Erbse, Mais und *Acetobater* zeigten die metabolische Kontrolle der Enzymaktivität. Die Aktivität der Saccharose-Synthase im „Sink“-Gewebe ist an der Aufnahmekapazität für Saccharose, dem sogenannten „sink strength“, beteiligt (SUN et al., 1992; ZRENNER et al., 1995). Ferner steht sie im Zusammenhang mit der Verteilung („partitioning“) des aus dem Phloem importierten Zuckers für Stärke-Synthese (DÉJARDIN et al., 1997) und Zellwand-Synthese (CHOUREY et al., 1998; NAKAI et al., 1999). Die Antisense-Hemmung der Saccharose-Synthase in Kartoffelknollen (*S. tuberosum*) führte zu einer verminderten Saccharoseaufnahme und einer dramatischen Reduktion des Stärkegehaltes (ZRENNER et al., 1995).

1.2.1 Die Isoenzyme der Saccharose-Synthase

Die Saccharose-Synthase ist ein tetrameres Enzym, dessen Untereinheiten je nach Spezies ein Molekulargewicht von 80-94 kDa aufweisen. Das Vorkommen von SUS als Homo- oder Heterotetramer scheint variabel und ist bislang nicht abschließend geklärt (SU und PREISS, 1978; CHOUREY et al., 1986). Bisher wurden in Pflanzen und Prokaryonten mindestens 30 verschiedene *sus*-Gene identifiziert. Die größte SUS-Familie mit sechs Mitgliedern wurde durch Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms identifiziert (BAUD et al., 2004).

In den meisten monokotylen Pflanzen werden 2-3 nicht-allelische SUS-Isogene (*sus1*, *sus2*, *sus3*) ausgeprägt. Die Benennung der Isogene und der zugehörigen Isoformen ist wenig einheitlich und verwirrend. Häufig werden die Isogene mit *sus1*, *sus2*, *sus3* und die Isoenzyme mit SS1, SS2, SS3 oder SUS1, SUS2 und SUS3 bezeichnet. In Mais wird die Isoform SS1 durch das *sh1*-Gen und die Isoform SS2 durch das *sus1*-Gen codiert. Deshalb werden die Isoformen in Mais wahlweise auch mit SH1 für SS1 und mit SUS1 für SS2 bezeichnet. Die weitaus später identifizierte dritte Isoform aus Mais, SuS3, wird durch das Gen *sus3* codiert (CARLSON et al., 2002; diese Arbeit).

1.2.2 Gewebespezifische Transkription von *sus*-Genen in Mais

Die Isogene werden auf transkriptionaler und translationaler Ebene sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedlich reguliert (CHEN und CHOUREY, 1989; WINTER und HUBER, 2000).

Während die Expression des *sus1*-Gens aus Mais in einer Vielzahl von „Sink“-Geweben nachgewiesen wurde, zeigt die Transkription des *sh1*-Gens eine deutliche Gewebe- und Zellspezifität (CHEN und CHOUREY, 1989; CHOUREY et al., 1998). Die höchsten Gehalte des SH1-Proteins wurden im Endosperm gefunden; allerdings wird das Gen in sehr geringeren Konzentrationen auch in Samen, Wurzel und im Spross exprimiert. Die Isoform SH1 ist für

über 90% der SUS-Aktivität im Endosperm verantwortlich. Samen der Maismutante Shrunken (*sh1*) haben einen reduzierten Stärkegehalt. Aufgrund reduzierter Cellulosesynthese zeigen diese Mutanten veränderte Zellwandstrukturen, was sich in einem Phänotyp mit kollabierten Samen manifestiert (CHOUREY et al., 1998). Im Gegensatz dazu zeigen die *sus1*-Mutanten keine phänotypische Veränderung. Die Defekte in diesen Mutanten führen aber zur ektopischen Expression des Gens *sh1*. Möglicherweise ist die Funktion des *sus1*-Gens unter ambienten Anzuchtbedingungen entbehrlich und kann durch einen „Überschuss“ des SH1-Proteins kompensiert werden. Die gewebespezifischen Unterschiede der Expression von *sh1* und *sus1* sind abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstand des Gewebes sowie vom Gewebetyp selbst. Die Expression korreliert mit der Verfügbarkeit von Zuckern und dem Auftreten von Sauerstoffmangel (anaerobe Bedingungen). Dies führte zu der These, dass die SH1-Isoform vornehmlich mit der Stärkesynthese in Verbindung steht, während SUS1 eine Rolle bei der Bereitstellung von Substraten für die Cellulosesynthese spielt (CHOUREY et al., 1998). Funktionale Unterschiede der Isoformen wurden bisher jedoch nicht eindeutig geklärt.

Für das *sus3*-Gen aus Mais liegen bislang kaum Ergebnisse vor, geringe Transkript- und Expressionsraten werden allerdings für viele Gewebe, einschließlich Wurzel, Spross und Endosperm, postuliert (CARLSON et al., 2002).

1.2.3 Zuckervermittelte Regulation der Transkription

Die Expression vieler Gene wird durch Saccharose und verschiedene Monosaccharide reguliert. Die kohlenhydratregulierten Gene können in zwei Gruppen eingeteilt werden. In „feast“-Gene, die „Sattgene“ und „famine“-Gene, die „Hungergene“. Die Expression von Genen, welche für Proteine der Photosynthese oder der Mobilisierung von Speicherstoffen codieren, wird durch Kohlenhydratmangel als Hungerantwort induziert. Steigende Zuckerkonzentrationen stimulieren Gene für den Verbrauch und die Speicherung als Sättigungsantwort. Dies geschieht unabhängig von „Sink“- oder „Source“-Gewebe. Die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten hat einen unterschiedlichen Einfluss auf die gewebe- und zellspezifische Transkription der Gene *sh1* und *sus1* (KOCH, 1996). Hohe Transkriptionsraten für *sh1* wurden bei geringen Konzentrationen von Glucose festgestellt, während eine hohe Verfügbarkeit an Glucose zur Repression führte. Hingegen führten hohe Zuckerkonzentrationen zur verstärkten Expression von *sus1*.

Generell scheinen Glucose und Saccharose unterschiedliche Stoffwechselwege zu kontrollieren. Glucose begünstigt eher die Zellteilung, während Saccharose mit der Akkumulation von Speicherstoffen in Verbindung steht. SALANOUBAT und BELLIARD (1989) und FU et al. (1995) zeigten an Kartoffeln, dass die an sich knollenspezifischen Gene der Saccharose-Synthase durch „Fütterung“ von Zuckern auch in Blättern induziert werden, wodurch eine ektopische Expression dieser Gene provoziert wird. Durch Zuckerzugabe konnte in ausdifferenzierten Blättern eine Umsteuerung von „Source“- zu „Sink“-

Stoffwechsel hervorgerufen werden. Zusätzliche Untersuchungen in Kartoffeln zeigten, dass für die Zuckerinduzierbarkeit der Saccharose-Synthase eine Beteiligung der SNF1-related Proteinkinase (SnRK) essentiell ist (PURCELL et al., 1998).

1.2.4 Regulation der Transkription durch Sauerstoffmangel (Anoxia)

Unter anaeroben Bedingungen kann die Oxidation von Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse, nicht stattfinden. Um die für den Zellstoffwechsel benötigte Energie bereitzustellen zu können, kommt es zur Fermentation und somit zur Bildung von Ethanol (HOLE et al., 1992). Daraus resultiert eine Steigerung der Glykolyse. Die Steigerung der Glykolyserate wird teilweise durch eine vermehrte Saccharosespaltung mittels Saccharose-Synthase erreicht. Die Gen-Expression von SUS wird typischerweise durch Sauerstoffmangel induziert, während Invertase-Gene gleichzeitig reprimiert werden. Dieser Befund erklärt, warum die Invertase in der Entwicklung von Kartoffelknollen (APPELDORN et al., 1997) und Maissamen (TSAI et al., 1970) früher und SUS erst später, wenn der interne Sauerstoffgehalt abgesunken ist, exprimiert wird.

Die Gene *sh1* und *sus1* aus Mais reagieren unterschiedlich auf den Sauerstoffmangel. Während die Transkriptionsrate von *sh1* bei Sauerstoffmangel zunimmt, verringert sich die Transkriptionsrate für *sus1* unter diesen Bedingungen. Die vermehrte *sh1*-mRNA-Produktion resultiert lediglich im geringen Maße in einer vermehrten Synthese des Proteins SH1. Andererseits resultiert die verringerte Transkription von *sus1* in einer entsprechend verringerten Synthese von SUS1 (RICARD et al., 1998). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Expression der Gene *sh1* und *sus1* in Maiswurzeln unter anaeroben Bedingungen nicht nur auf transkriptionaler, sondern auch auf translationaler Ebene reguliert ist (GUGLIELMINETTI et al., 1996). Die genauen Mechanismen der Regulation der SUS-Transkription und Translation unter anaeroben Bedingungen sind bislang noch nicht bekannt. Die Regulation der Expression durch Zucker ist sehr wahrscheinlich an den Mechanismen beteiligt, da Sauerstoffmangel die verschiedenen Zuckergehalte im Gewebe beeinflusst.

1.2.5 Subzelluläre Lokalisation und Funktionen von SUS

Die Saccharose-Synthase kommt typischerweise als lösliches Enzym im Cytosol vor und ist an einem ATP-konservierenden Respirationsweg beteiligt. Die Verteilung von SUS in jungen Maisblättern wurde mittels Immuno-Gold-Markierung untersucht (BRANGEON et al., 1996). Das Enzym konnte im Cytosol sich teilender meristematischer Zellen, expandierender Zellen der Elongationszone, Zellen von jungem photosynthetischem Gewebe sowie in Geleitzellen des Phloemgewebes nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar war das Enzym in photosynthetisch aktiven Zellen.

Zusätzlich zu dieser cytosolischen Lokalisation weisen zahlreiche Arbeiten auf ein weites Spektrum transienter Assoziationen mit Membranen und/oder Elementen des pflanzlichen Cytoskeletts hin (Abb. 1.2).

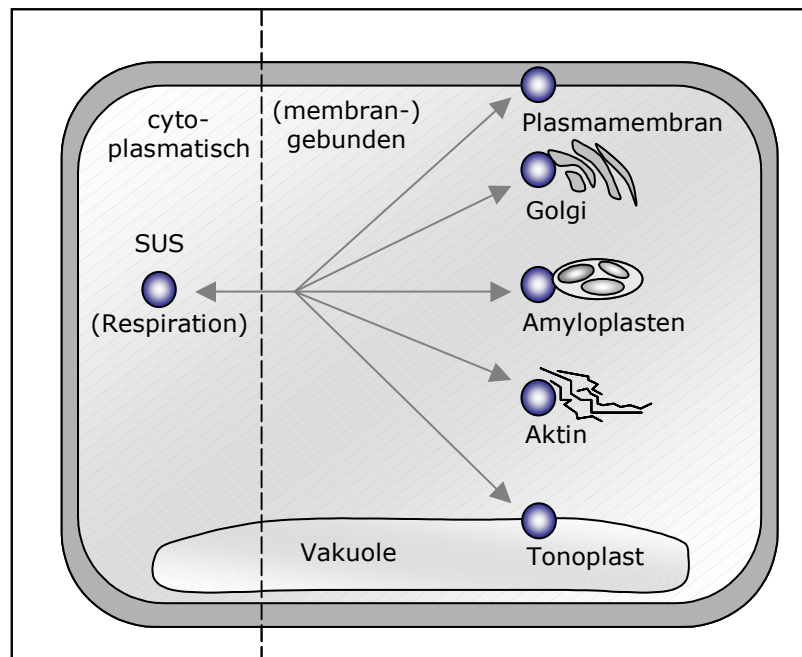


Abb. 1.2: Modell zur subzellulären Lokalisationen der Saccharose-Synthase (SUS).

Nach: KOCH, K. (2004)

Während der Wachstumsphase wird die durch die Spaltungsreaktion von SUS entstehende UDP-Glucose als Substrat für die Cellulose-Synthase (CesA) benötigt. AMOR et al. (1995) beschrieben erstmals eine Membran-assoziierte Form von SUS und deren besondere Bedeutung in der Cellulose- und Callose-Synthese (vgl. 1.3.3). In den Faserzellen der Baumwolle ist SUS das hauptsächliche UDP-Glucose-bindende Protein an der Plasmamembran (AMOR et al., 1995). Untermuert wurden die Befunde durch Untersuchungen an immobilisierten Plasmamembranfragmenten aus Tabak, die bei Saccharose- und UDP-Zugabe β -Glucan-Mikrofibrillen synthetisierten (HIRAI et al., 1998). ALBRECHT und MUSTROPH (2003) zeigten *in situ* die Korrelation von SUS-Aktivität und Zellwanddicke in den Wurzeln von Weizen. Die Assoziation von SUS mit der Plasmamembran konnte ebenfalls in Mais-Endosperm (CARLSON und CHOUREY, 1996), in Stängel-Pulvinus und Elongationszonen in Blättern von Maispflanzen (WINTER et al., 1997) sowie in Baumwollfasern (HAIGLER et al., 2001) nachgewiesen werden. CARLSON und CHOUREY (1996) zeigten, dass beide bis dahin bekannten Isoenzyme in Mais (SUS1 und SH1) in Membran-assoziiierter Form vorliegen können. In Mais fehlen allerdings noch die Beweise für die direkte Beteiligung des Membran-assoziierten SUS-Proteins an der Zellwandsynthese. Strukturinformationen stehen bislang noch nicht zur Verfügung; allgemein akzeptiert ist jedoch, dass SUS kein Transmembran-Protein ist. Neuste biochemische Studien postulieren für das Mais-Protein eine aminoternale Konformationsänderung in Zusammenhang mit der Membran-Assoziation (HARDIN et al., 2004).

Bei Mais-Koleoptilen wurde SUS-Protein in mit der Golgi-Membran angereicherten Proteinfractionen nachgewiesen (BUCKERIDGE et al., 1999). Ferner wurde die Lokalisation von SUS-Protein für die Bakterioid-umgebende Membran der Wurzelknöllchen von Leguminosen gezeigt (ZHANG et al., 1999; KOMINA et al., 2002).

Neuere Arbeiten zeigen eine Assoziation der Saccharose-Synthase mit dem Tonoplasten (ETXEBERRIA und GONZALEZ, 2003). Funktionell wird hier für die Saccharose-Synthase eine Beteiligung an der Mobilisierung oder Akkumulation vakuolärer Saccharose postuliert.

WINTER et al. (1998) zeigten mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationsstudien in Mais, dass ein Teil des cytosolischen SUS-Proteins in Aktin-gebundener Form vorliegen kann (vgl. 1.3.3). *In vitro*-Versuche lieferten erste Hinweise auf eine metabolische Regulation dieser Assoziation durch Zucker-Signale (WINTER und HUBER, 2000). Für Mais-Endosperm wurde neben glykolytischen Enzymen das Vorkommen von SUS in der Cytoskelettfraction beschrieben (AZAMA et al., 2003).

Die transiente Assoziation von SUS-Protein an Elementen des pflanzlichen Cytoskeletts könnte die Synthese von Stärke durch die Nähe zu Amyloplasten erleichtern, oder zusammen mit anderen Enzymen in einem „Metabolon“ die Weiterleitung von Intermediaten durch Assoziation erleichtern (KOCH, 2004).

Mechanismen, die Veränderungen der SUS-Lokalisation auf subzellulärer Ebene regulieren, sind in der derzeitigen Forschung von zentraler Bedeutung. Die Kontrolle der Lokalisation könnte das Gleichgewicht zwischen der Beteiligung von SUS an der Respiration und speziellen Funktionen des Enzyms in Biosynthese und Kompartimentierung beeinflussen (KOCH, 2004).

Neben einer metabolischen Kontrolle wird hauptsächlich ein regulatorischer Einfluss der reversiblen, posttranslationalen Proteinphosphorylierung auf die Lokalisation von SUS diskutiert (HUBER et al., 1996; WINTER et al., 1997; WINTER und HUBER, 2000; SUBBAIAH und SACHS, 2001; KOMINA et al., 2002; HARDIN et al., 2004). Weiter untermauert wird die These durch die Zucker-Sensitivität einiger Kinasen, die an einer Phosphorylierung beteiligt sein könnten. Posttranslationale Modifikationen der Saccharose-Synthase werden im Mittelpunkt der folgenden Kapitel stehen.

1.2.6 Regulation der Saccharose-Synthase durch posttranslationale Modifikation

1.2.6.1 Regulation durch Phosphorylierung

Eine Proteinphosphorylierung der SUS wurde in verschiedenen Maisgeweben (HUBER et al., 1996; LINDBLOM et al., 1997; WINTER et al., 1997; SUBBAIAH und SACHS, 2001), elongierenden Baumwollfasern (HAIGLER et al., 2001) und den Wurzelknöllchen der Sojabohne (ZHANG und CHOLLET, 1997; KOMINA et al., 2002) gezeigt. Der Phosphorylierungsgrad und die Menge an phosphoryliertem Enzym variierte in Abhängigkeit von verschiedenen Gewebefractionen und/oder Organismen. Die freie, cytoplasmatische Saccharose-Synthase wurde in Relation zur Membran-gebundenen Form als hyper- (WINTER et al., 1997; KOMINA et al., 2002) oder

gleichmäßig (HAIGLER et al., 2001; HARDIN et al., 2004) phosphoryliert beschrieben. In Mais werden beide Isoformen der Saccharose-Synthase, SUS1 und SH1, phosphoryliert. Die jeweiligen Phosphorylierungsstellen in den beiden Enzymen sind sehr ähnlich.

In vivo wird die Isoform SUS1 reversibel und kovalent durch Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPK) an einem N-terminalen Serinrest (Ser-15) (HUBER et al., 1996) sowie und an einem weiteren Serinrest (Ser-170) (HARDIN et al., 2003) posttranslational modifiziert. Der Serinrest an Position 170 der Aminosäuresequenz stellt gegenüber dem Ser-15 eine untergeordnete Phosphorylierungsstelle dar. Die Phosphorylierung des Ser-170 scheint an der Regulation der proteolytischen Degradation des SUS-Proteins beteiligt zu sein (HARDIN et al., 2003) (vgl. 1.2.7).

Die Klonierung und Sequenzierung der cDNAs von Saccharose-Synthase verschiedener monokotyle und dikotyle Pflanzen zeigten, dass die Konsensussequenz der Phosphorylierungsstelle (-L-[STA]-R-[LV]-H-S*-[VLQ]-R-; *= zu phosphorylierendes Serin) bis auf eine Isoform in *Arabidopsis* (*A. thaliana*) und Tomate (*L. esculentum*) konserviert vorliegt. Ferner wurde die Serin-Phosphorylierung in der N-terminalen Sequenz außer für die Mais-Isoformen SUS1 und SH1 auch für verschiedene Isoformen anderer Organismen, darunter Sojabohne, Mungbohne, Baumwolle und Tomate nachgewiesen.

Die Modifizierung der übergeordneten Phosphorylierungsstelle am N-Terminus (Ser-15) wird im Zusammenhang mit der Regulation der Aktivität und der Lokalisation der Saccharose-Synthase diskutiert. Verschiedene Versuchsansätze deuteten darauf hin, dass die Assoziation der Saccharose-Synthase mit der Plasmamembran *in vivo* ebenso ein reversibler Vorgang ist wie die Phosphorylierung des Enzyms. Änderungen der intrazellulären Verteilung von SUS in Abhängigkeit von der Ser-15-Phosphorylierung wurden unter anaeroben Bedingungen in Wurzelspitzen (SUBBIAH und SACHS, 2001) und gravistimuliertem Pulvinus-Gewebe (WINTER et al., 1997) von Mais festgestellt. Die Menge Membran-assoziiertes SUS konnte unter dephosphorylierenden Bedingungen *in vitro* gesteigert werden und phosphorylierende Bedingungen führten zur Dissoziation der Membran-gebundenen Form (WINTER et al., 1997). Zusätzlich konnte durch *in vitro*-Phosphorylierung des gereinigten, löslichen Proteins eine erhöhte Löslichkeit erreicht werden, während Dephosphorylierung zur irreversiblen Präzipitation des Enzyms führte.

Untersuchungen der kinetischen Eigenschaften der Saccharose-Synthase deuteten auf eine Stimulierung der Spaltungsreaktion, nicht aber auf eine Beeinflussung der Synthesereaktion infolge der Ser-15-Phosphorylierung hin. Dies manifestierte sich in geringfügiger Steigerung der Affinität für Saccharose und/oder UDP (HUBER et al., 1996; NAKAI et al., 1998; ANGUENOT et al., 1999; TANASE et al., 2002). Für die Saccharose-Synthase aus den Wurzelknöllchen der Sojabohne konnte kein signifikanter Effekt in der Kinetik der Saccharosespaltung durch Phosphorylierung beobachtet werden (ZHANG und CHOLLET, 1997). Die zum Teil geringen Unterschiede in den Kinetiken wurden somit lange als physiologisch nicht signifikant gewertet. Erst die Untersuchungen an heterolog exprimiertem Mais-

SUS1-Protein konnten die Stimulation der katalytischen Spaltungsaktivität durch Ser-15-Phosphorylierung eindeutig beweisen (HARDIN et al., 2004). Der stimulierende Effekt der Phosphorylierung war am deutlichsten im sauren Milieu. Während bei einem pH-Wert von 5,5-6,5 die Aktivität im Vergleich zum dephosphorylierten Enzym um etwa 60-70% gesteigert war, erniedrigte sich der Wert bei einem neutralen pH-Wert auf 10-30%. Im alkalischen Milieu (pH 8,5) wurde sogar eine um 10-20% verminderte Spaltungsaktivität der phosphorylierten SUS im Vergleich zur dephosphorylierten Form ermittelt. Die Autoren gehen davon aus, dass die Steigerung der Spaltungsaktivität durch Phosphorylierung mit einer Umstrukturierung des N-Terminus, wie sie durch niedrige pH-Werte erreicht wird, in Verbindung steht. Anaerobe Bedingungen führen zunächst zu einem raschen Absinken des cytosolischen pH-Werts von 7,5 auf annähernd 6,8 (GOUT et al., 2001), der sich dann innerhalb von etwa 25 Minuten nach Beginn der Sauerstoffarmut zu etwa pH 7,0 regeneriert. SUS-Aktivität (RICARD et al., 1998, ZENG et al., 1998) und SUS-Phosphorylierung (SUBBAIAH und SACHS, 2001) sind unter hypoxischen Bedingungen stark erhöht, während die Aktivität der Invertase absinkt (RICARD et al., 1998). In guter Übereinstimmung mit diesen Befunden postulieren HARDIN et al. (2004) eine duale Aktivierung von SUS durch Konformationsänderung infolge der Phosphorylierung und des erniedrigten pH-Werts.

Neben der Phosphorylierung der Saccharose-Synthase in Abhängigkeit von Calcium durch die CDPKs (Calcium deependent protein kinase) wurde auch eine calciumunabhängige Phosphorylierung, vermittelt durch SnRK (SNF1-related protein kinase), festgestellt. Die Benennung SnRK beruht auf der Homologie und funktionalen Ähnlichkeit zur SNF1 (Sucrose non fermenting 1-Kinase) aus Hefe. Mitglieder der SnRK-Genfamilie sind nah verwandt zu den CDPKs (HARDIE, 2000) und spielen eine zentrale Rolle bei der kontrollierten Kohlenstoffverteilung in Pflanzen (HALFORD et al., 2003). Sie regulieren Enzymaktivitäten, indem der Aktivierungsstatus wichtiger Enzyme oder die Expression ihrer Gene beeinflusst werden (Abb. 1.3.). Die SnRKs können selbst posttranskriptional durch Phosphorylierung mittels vorgeschalteter Kinasen (SUGDEN et al., 1999) reguliert werden. Niedriger zellulärer Glucose- und/oder Saccharosegehalt führen zur Aktivierung der Kinase (HALFORD und DICKINSON, 2001), während 5'-AMP und Glucose-6-Phosphat inhibitorische Wirkung zeigen (SUGDEN et al., 1999). Die SnRKs werden analog zu den orthologen Hefeproteinen vermutlich für die Derepression mehrerer Gene, die durch Glucose reprimiert werden, benötigt. Eine Beteiligung an der Hemmung von Wachstum und Zellzyklus unter Glucoseentzug wird ebenso diskutiert (HALFORD et al., 2003). Nachweislich wird der Phosphorylierungsstatus einiger Stoffwechsellzyme direkt durch SnRK moduliert. Als Enzym-Substrate für eine SnRK-Phosphorylierung wurden u. a. die HMG-CoA-Reduktase, die Nitrat-Reduktase (NR) und die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) identifiziert. Die Enzymaktivität aller drei Enzyme war infolge der Phosphorylierung inhibiert (DALE et al., 1995; BACHMANN et al., 1996; DOUGLAS et al., 1995).

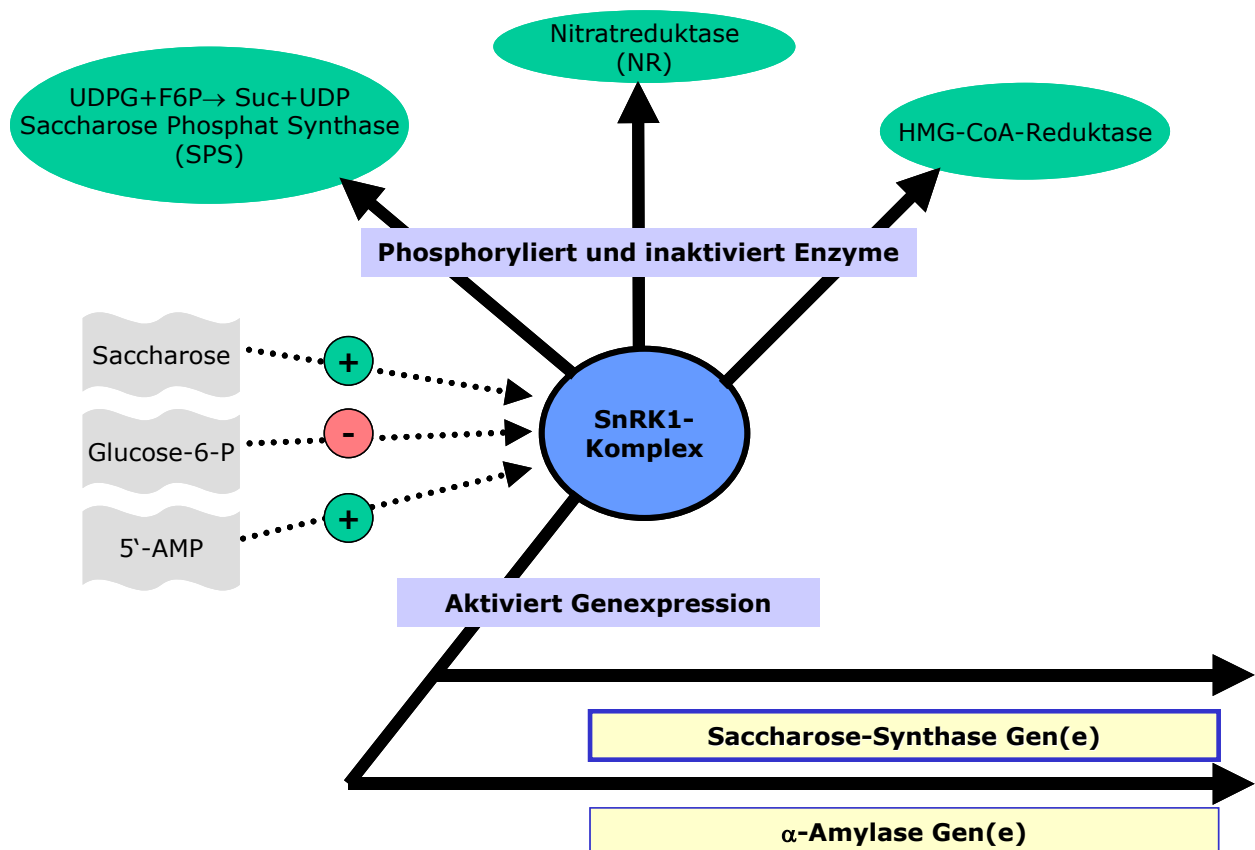


Abb. 1.3: SnRK1 reguliert Enzymaktivitäten, indem der Aktivierungsstatus wichtiger Enzyme oder die Expression ihrer Gene beeinflusst werden. Modifiziertes Modell nach HALFORD et al., (2003).

Die Expression einer Antisense-SnRK1-Sequenz in Kartoffelknollen führte zu einer verringerten SUS-Aktivität und einer stark verminderten SUS-Genexpression. In diesen transgenen Kartoffeln war keine Zuckerinduktion der Saccharose-Synthase möglich (PURCELL et al., 1998), wie sie zuvor durch Inkubation von isolierten Blättern mit Saccharose gezeigt wurde (FU und PARK, 1995).

Neben der Beteiligung von Mitgliedern der SnRK-Genfamilie an der transkriptionalen Kontrolle der SUS-Expression konnte zunächst mit einer rekombinanten *Arabidopsis*-SnRK (*AtSR2*) die Phosphorylierung von SUS-Protein gezeigt werden (CHIKANO et al., 2001). Arbeiten an der heterolog exprimierten Mais-Isoform SUS1 sowie einer SUS1-Doppelmutante, bei der die beiden Phosphorylierungsstellen, Ser-15 und Ser-170, gegen die kleine, ungeladene Aminosäure Alanin ausgetauscht wurden, deuten auf eine zusätzliche, dritte Phosphorylierungsstelle im Mais-Enzym hin (HARDIN et al., 2003). Die Doppelmutante war weiterhin, wenngleich weniger stark, *in vitro* phosphorylierbar, und für die Phosphorylierung war die Anwesenheit von Calcium nicht essentiell.

Eine für SUS spezifische Protein-Phosphataseaktivität wurde bisher noch nicht identifiziert.

1.2.6.2 Posttranslationale Redox-Modifikation von SH-Gruppen

Die definierte räumliche Struktur der Proteine kommt vor allem durch nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren zustande. Geringe Änderungen der räumlichen Struktur (Konformationsänderungen) treten häufig durch Bindung von Liganden (z.B. Substrate, Coenzyme, Effektoren) an den Proteinen auf. Wirksam werden die Konformationsänderungen hauptsächlich auf der Ebene der Tertiärstruktur und sind ein wichtiger Faktor für die Regulierbarkeit von Enzymen. Nach den Veränderungen auf der Ebene der Tertiärstruktur werden neuartige Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten möglich. Neben der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung spielt vor allem die reversible Oxidoreduktion von Cysteinresten über den Wechsel zwischen Dithiol und Disulfid eine Rolle (ROUHIER et al., 2002; MARX et al., 2003). Der Thiol-Disulfid-Redoxstatus wird von zellulären Redoxreagenzien moduliert. Im Cytosol höherer Pflanzen gibt es zwei Systeme, die vorwiegend für die Bereitstellung dieser Reagenzien verantwortlich sind: das Thioredoxin-System (Td-System) und das Glutathion-System (GSH/GSSG-System). Glutathion und Thioredoxin dienen in der Zelle als direkte Überträger von Reduktionsäquivalenten. Beide Reagenzien besitzen exponierte SH-Gruppen, die bei Oxidation inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können. Glutathion spielt in pflanzlichen Zellen neben der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten eine bedeutende Rolle bei der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Es handelt sich um ein Cystein-haltiges Tripeptid, das neben Cystein aus den Aminosäuren Glycin und Glutamat besteht. Glutathion kann in reduzierter Form (GSH) oder in oxidierten Form (GSSG) vorliegen. Zwei GSH-Moleküle bilden, wenn sie durch Oxidation zwei Protonen und zwei Elektronen abgeben, ein GSSG-Molekül.

In Pflanzen unterscheidet man bei der Protein-Disulfid-Oxidoreduktase Thioredoxin zwischen verschiedenen Isoformen, zu denen unter anderem die chloroplastidären Thioredoxine *f* (Td *f*), *mb* (Td *mb*) und *mc* (Td *mc*) sowie das cytosolische Thioredoxin *h* (Td *h*) der heterotrophen Gewebe zählen (ROUHIER et al., 2002). Thioredoxine sind relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa und 95-125 Aminosäureresten. Durch das künstliche Redoxreagenz 1,4-Dithiothreitol (DTT) können *in vitro* Thioredoxin-Effekte simuliert werden.

Für die Aktivität der Saccharose-Synthase wurde eine Inhibition durch Schwermetallionen (MORELL und COPELAND, 1985) und eine Modulation durch Redoxreagenzien (PONTIS et al., 1981) gezeigt. Messungen in gereinigten Pflanzenrohextrakten zeigten den Einfluss von verschiedenen Redoxreagenzien wie oxidiertem und reduziertem DTT, oxidiertem chloroplastidären Td sowie oxidiertem und reduziertem Glutathion (GSSG und GSH) auf die Saccharose-Synthase-Aktivität (PONTIS et al., 1981). Die Spaltungsaktivität des Enzyms wurde in diesen Untersuchungen durch Oxidation stark verringert, die Syntheseaktivität dagegen nur schwach beeinflusst, so dass von den Autoren auf eine unidirektionale Regulation der Saccharose-Synthase-Aktivität geschlossen wurde.

Nachdem über zwei Jahrzehnte keine weiteren Arbeiten zur Redox-Modulation der Saccharose-Synthase publiziert wurden, zeigten RÖHRIG et al. (2004) eine S-Thiolierung des Enzyms. Eine Cystein-haltige Peptidsequenz des ENOD40-Proteins (early nodulin, frühes Nodulin) aus Sojabohne interagiert, vermittelt durch eine Disulfidbindung, mit der Saccharose-Synthase. Diese Modifikation aktivierte die Spaltungsreaktion von Saccharose-Synthase.

1.2.7 Proteolytischer Abbau der Saccharose-Synthase

Im basalen Gewebe sich entwickelnder, noch heterotropher Mais-Blätter hat die Saccharose-Synthase einen Anteil von 3-8% am Gesamtprotein. Mit der Umstellung des Stoffwechsels auf autotrophes Wachstum und Ergrünung der Pflanze wird das Enzym rasch degradiert (NGUYEN-QUOC et al., 1990). Neben einem veränderten Expressionsmuster infolge der gewebespezifischen Transkription ist der proteolytische Abbau an Proteasomen als Mechanismus zur Kontrolle von Proteinmengen in Pflanzen bekannt (INGVARDSEN und VEIERSKOV, 2001). Für SUS-Protein aus jungen Maisblättern wurde eine Proteasom-vermittelte Degradation im Zusammenhang mit einer Phosphorylierung am Ser-170 nachgewiesen (HARDIN et al., 2003; HARDIN und HUBER, 2004). Der genaue Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt. Bisherige Ergebnisse und Hinweise lassen sich jedoch in einem Modell vereinigen (Abb. 1.4). Demnach aktiviert die Phosphorylierung der übergeordneten Phosphorylierungsstelle Ser-15 in SUS die katalytische Spaltungsaktivität und begünstigt gleichzeitig die Phosphorylierung der untergeordneten Phosphorylierungsseite am Ser-170. Diese zweite Phosphorylierung wiederum begünstigt die Ubiquitinierung von SUS, die den proteolytischen Abbau einleitet (HARDIN et al., 2003). Durch endogene Bindeproteine kann die Phosphorylierung am Ser-170 vermutlich verhindert werden, was zu einer Stabilisierung des Ser-15-phosphorylierten Proteins führen würde. Da ENOD40 als endogener Bindepartner der Saccharose-Synthase bekannt ist und die Aktivität des Enzyms steigert, wird postuliert, dass ENOD40 die Ser-170-Phosphorylierung vorübergehend unterbindet.

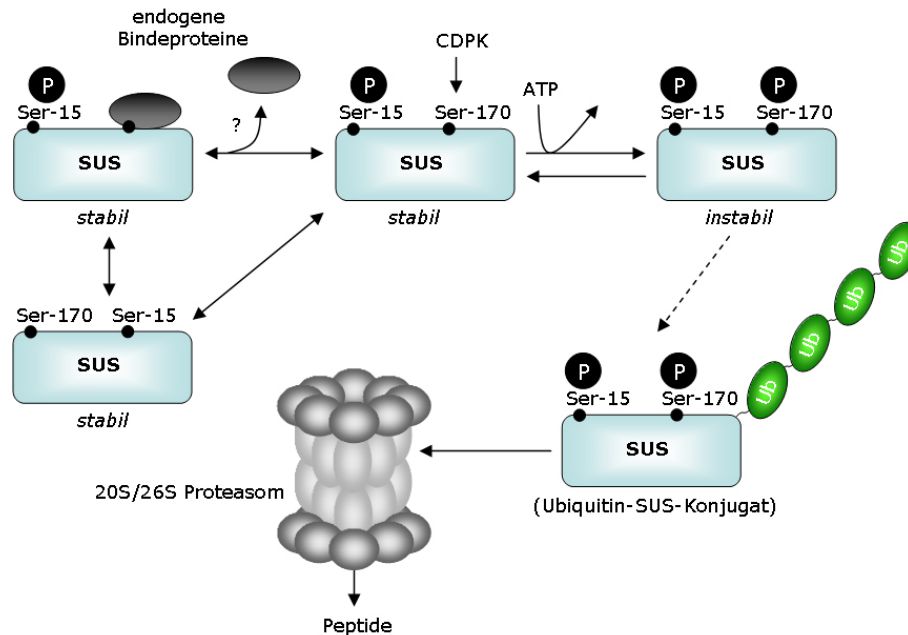


Abb. 1.4: Modell zur Regulation von SUS durch proteolytischen Abbau.

Dephosphoryliertes und Ser-15-phosphoryliertes SUS-Protein besitzen eine stabile Konformation. Durch Phosphorylierung am Ser-170 wird die proteolytische Degradations-Kaskade initiiert oder begünstigt. (Modifiziert nach HARDIN et al., 2003; KOCH, 2004).

1.3 Das pflanzliche Cytoskelett

Das Cytoskelett spielt eine zentrale Rolle für die Architektur eukaryotischer Zellen und für koordinierte intrazelluläre Bewegungen. Ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk unterschiedlicher Proteinfilamentsysteme, welche sich durch das gesamte Cytoplasma erstrecken, bilden das Cytoskelett. Definiert als die Gesamtheit der im Cytoplasma verbleibenden, fädigen Zellstrukturen nach Extraktion mit einem nicht-ionischen Reagenz, stellt das Cytoskelett keine starre, statische Struktur, sondern ein in ständigem Umbau begriffenes, hochdynamisches System dar. Es ist maßgeblich an vielen elementaren Prozessen wie Formgebung, Zelldifferenzierung, Zellteilung, Zell-Lokomotion, Kontaktaufnahme zu Nachbarzellen, intrazellulären Bewegungsvorgängen und vielem mehr beteiligt.

Die einzelnen Filamenttypen werden nach ihrem Durchmesser in Mikrofilamente, Intermediärfilamente (IF) und Mikrotubuli (MT) eingeteilt. Obwohl die verschiedenen Filamente aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sind, liegt ihnen ein gemeinsames Bauprinzip zugrunde, nämlich die Bildung durch die Polymerisation monomerer Proteine. In Abhängigkeit von extra- und intrazellulären Signalen werden die Filamente nach Bedarf auf- oder abgebaut. Akzessorische Proteine, die in das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation der Monomere eingreifen, spielen dabei eine wichtige Rolle.

In Pflanzen sind hauptsächlich die Mikrofilamente und Mikrotubuli als Strukturelemente am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt. Das Vorkommen pflanzlicher Intermediärfilament-Proteine wurde bis auf wenige Ausnahmen wie z.B. das kernlokalisierte Lamin (MCNULTY und SAUNDERS, 1992) bislang biochemisch nicht bestätigt. Sequenzvergleiche von menschlichen

und tierischen Intermediärfilament-Proteinen mit dem *Arabidopsis*-Genom zeigten allerdings mehr als drei Dutzend codierende Sequenzen mit signifikanten Homologien (MEAGHER und FECHHEIMER, 2003). Vermutlich sind die Strukturen des pflanzlichen Cytoskeletts komplexer als in derzeitigen Modellen postuliert.

1.3.1 Das pflanzliche Aktin-Cytoskelett

Der Grundbaustein der Mikrofilamente ist Aktin, ein hochkonserviertes Protein, welches bei allen Eukaryoten vorkommt, von den Protisten bis zu den Wirbeltieren. Jedoch auch in Bakterien wurde ein zu Aktin homologes Protein, MreB, identifiziert (VAN DEN ENT et al., 2001). Die Aktin-Genfamilien in Pflanzen sind größer und diverser als in anderen Organismen. In *Arabidopsis* codieren 10 Gene für mindestens 8 Isoformen (McDOWELL et al., 1996a), die funktionell in eine vegetative und eine reproduktive Gruppe klassifiziert werden (KANDASAMY et al., 1999). Während der Fertilisierung erfolgt eine veränderte Expression von vegetativen gegenüber reproduktiven Aktinen, die jeweils spezielle Funktionen übernehmen können. In Wirbeltieren wurden dagegen nur zwei Nicht-Muskel-Isoformen identifiziert. Aktine verschiedener Pflanzen wurden ausführlich charakterisiert.

MA und YEN (1989) verglichen Aktin aus Maispollen mit muskulärem Aktin aus Kaninchen. Die Proteine hatten das gleiche Molekulargewicht, ähnliche Aminosäuresequenzen und gleiche Charakteristika in der Zirkulardichroismus-Spektroskopie. Immunologische Untersuchungen bestätigten die Homologien zusätzlich (LIU und YEN, 1992).

In Lösungen von niedriger Ionenstärke ist Aktin ein 42-kDa-Monomer mit einem Durchmesser von 4 nm. Wegen seiner globulären Gestalt wird das Monomer „G-Aktin“ genannt. G-Aktin besteht aus zwei Domänen. Im Verbindungsstück einer größeren C-terminalen und einer kleineren N-terminalen Domäne ist eine Bindestelle für ATP oder ADP sowie für divalente Ionen (*in vivo* wahrscheinlich Mg^{2+}) lokalisiert. Bei Erhöhung der Ionenstärke auf physiologische Werte polymerisiert das G-Aktin zu Filamenten, den Mikrofilamenten, Aktinfilamenten oder „F-Aktin“. Aktin ist eine ATPase; der ATP-ADP-Zyklus des Aktins ist an der Assoziation und Dissoziation der Polymere beteiligt. *In vitro* erfolgt die ATP-abhängige Aktin-Polymerisation in Anwesenheit mono- und divalenter Kationen. Das entstehende ADP bleibt an die Protomere der Aktinfilamente gebunden.

Die Aktinfilamente weisen kinetische Polarität auf. Verlängerung durch Einbau weiterer Aktinmoleküle erfolgt ganz überwiegend nur an einem Filamentende, welches als Plus-Ende oder „barbed end“ bezeichnet wird. Die kritische Aktinkonzentration für die Bildung von Aktinfilamenten, d.h. die Konzentration, bei der Polymerisation und Depolymerisation mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen, liegt für Maispollen *in vitro* bei 0,6 μM (REN et al., 1997). Für nicht-pflanzliches Aktin wurde die kritische Konzentration mit 0,1 μM für das „barbed“-Ende und mit 0,5 μM für das „pointed“-Ende (Minus-Ende) bestimmt (HATANO, 1994). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation ist die Erzeugung von Aktintrimeren, die sog. Nukleation. Die Filamentbildung startet in der lebenden Zelle an

besonderen Nukleationspunkten; bevorzugt z.B. an bestimmten Stellen der Zellmembran, die ihrerseits mit Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) besetzt ist. Das an den Bildungszentren fixierte Filamentende ist (überwiegend) das Plus-Ende. Wachstum von Aktinfilamenten an Nukleationsorten bedeutet also Verlängerung am fixierten, nicht am freien Filamentende.

Die Mikrofilamente haben einen Durchmesser von 5-7 nm. In Pflanzenzellen bilden die Aktinfilamente keine permanente Struktur, sie unterliegen vielmehr einem dynamischen Auf- und Abbau. Mikro- bzw. Aktinfilamente bilden die Basis für Bewegungen in allen eukaryontischen Zellen. Im Cytoplasma liegen die Mikrofilamente in Form von linearen Bündeln, zweidimensionalen Netzwerken und dreidimensionalen Gelen vor. Ihre Lokalisation bezieht sich zwar auf die gesamte Zelle, allerdings sind Mikrofilamente in peripheren Regionen nahe der Plasmamembran stark angereichert. Ein dreidimensionales Aktinnetzwerk ist dort über Aktin-bindende Proteine und durch direkte Bindung an integrale Membranproteine mit der Plasmamembran verankert. Dieser sogenannte Zellkortex unterstützt die mechanische Stabilität der Zelle und verleiht ihr die Fähigkeit zur Bewegung. Die Organisation von filamentösem Aktin (F-Aktin) und seine Assemblierung aus monomerem, globulärem Aktin (G-Aktin) kann sich in Pflanzen während der Wachstums- und Entwicklungsphasen und in Reaktion auf eine Vielzahl von Reizen dramatisch verändern (STAIGER, 2000). In eukaryotischen Zellen dient das Aktin-Cytoskelett der Lokalisation von Membranproteinen, der Zellmotilität, der Zellteilung, Umgestaltung der Oberfläche, der Kontrolle der Zellform und Kontraktion sowie dem Vesikeltransport, der Entwicklung der Polarität und der Sekretion und Endozytose (MEAGHER und WILLIAMSON, 1994; AYSCOUGH und DRUBIN, 1996; SAMAJ et al., 2004). Um diese Prozesse zu verstehen, ist zunächst die Identifizierung spezifischer Aktin-Binde-Proteine (ABPs), welche die Organisation und Funktion des Cytoskeletts modulieren, notwendig (POLLARD et al., 1994). Proteine, die mit dem Aktin-Cytoskelett interagieren, verändern häufig die Dynamik oder Organisation des Cytoskeletts oder benutzen dieses zur Kontrolle ihrer Lokalisation.

Damit sich das Aktin angemessen formiert, sind ABPs erforderlich, die wiederum reguliert werden müssen. Die Aktivität und Größe des monomeren Aktin-Pools, die subzelluläre Lokalisation der Nukleation, die Umsatzrate der Filamente und die Anordnung der Filamente in komplexer organisierte Strukturen wird durch die ABPs kontrolliert (STAIGER, 2000; COOPER und SCHAFER, 2000). Neben einer Bindestelle für Aktin zeigen alle identifizierten ABPs Bindekapazitäten für verschiedene andere Moleküle (STAIGER et al., 1997). ABPs werden entsprechend ihrer Aktinbindefunktion klassifiziert. Es gibt monomerbindende Proteine (z.B. Profilin, Cofilin, Thymosin), die G-Aktin binden und so dem Aktinpool die Monomere für die Polymerisation von Filamenten entziehen. „Capping“-Proteine binden meist an das wachsende Ende eines Filaments und behindern die Polymerisation und somit die Dynamik des Aktins. Die „Severing“-Proteine spalten Aktinfilamente und binden dann an das Polymerisationsende, während „Side-Binding“-Proteine Aktinfilamente entweder bündeln und so die Filamente nahezu parallel aneinanderlegen, oder mehrere Filamente kreuzen und

zu Netzwerken und Maschen verbinden können („crosslinking“). Einige ABPs können membranassoziiert sein, oder als Aktin-Motor-Proteine fungieren und somit Einfluss auf die Bewegung des Aktins nehmen. Für die Bildung kompakter, nahezu paralleler Bündel von Aktinfilamenten reichen kleine unflexible Proteine, während für die Ausbildung von Netzwerken und Gel-Maschen größere und flexiblere Proteine notwendig sind. Die Aktinbindeaffinitäten sind abhängig von intrazellulären Bedingungen wie Ionenstärke, pH-Wert, ATP-Konzentration und Ca^{2+} -Gehalt. Deshalb sind die ABPs geeignete Kandidaten für Cytoskelett-vermittelte Eingriffe in verschiedene Signalübertragungsprozesse.

Der Einfluss des pflanzlichen Cytoskeletts auf die Proteinbiosynthese und die Verteilung von Speicherproteinen wurde mehrfach gezeigt (CLORE et al., 1996; WU et al., 1998; DAVIES et al., 2001; AZAMA et al., 2003); dabei wird speziell die Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts postuliert. Einige Isoformen von Aktin sind mit der Plasmamembran assoziiert und an Signalübertragungswegen basierend auf dem Phosphoinositolweg beteiligt (TAN und BOSS, 1992). Interaktionen zwischen dem Efflux-Carrier des pflanzlichen Hormons Auxin und Aktinfilamenten an der Plasmamembran deuten darauf hin, dass Aktinfilamente am intrazellulären Transport des Hormons beteiligt sind (COX und MUDAY, 1994; BUTLER et al., 1998). Das Aktin-Cytoskelett ist ebenso beteiligt an intrazellulären Bewegungen (LICHTSCHEIDL und URL, 1990). Gut bekannt ist, dass F-Aktin essentiell für Spitzenwachstum (PIERSON und CRESTI, 1992; BALUSKA et al., 2000, BALUSKA et al., 2004) und die Wundheilung (FOISSNER et al. 1996) ist.

Neben dem Kurzstreckentransport ist Aktin auch am Langstreckenmassentransport, der Cytoplasmaströmung, beteiligt. Langstreckenbewegungen in pflanzlichen Zellen basieren grundsätzlich auf ähnlichen Mechanismen wie sie bereits für Actomyosin-basierende Kräftebildung im Skelettmuskel bekannt sind. Aktin ist essentiell in die Cytokinese pflanzlicher und tierischer Zellen involviert. In Pflanzenzellen entsteht ein dichtes Netzwerk aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten in der Äquatorebene der postmitotischen Zelle und expandiert zentrifugal zur Zelloberfläche als Phragmoplast (BOWERMAN und SEVERSON, 1999). Neben der Bedeutung des Aktins für die Zellteilung spielt Aktin auch beim anschließenden Zellstreckungswachstum eine wichtige Rolle. Die Abwesenheit von F-Aktin verringert drastisch die finale Zelllänge von Maiswurzelspitzen. Auf der anderen Seite wird die Zellbreite durch die pharmakologisch induzierte Depolymerisation von Aktinfilamenten nur schwach beeinflusst (VOLKMANN und BALUŠKA, 1999).

Das pflanzliche Actomyosin-Cytoskelett ist an der strukturellen und funktionalen Organisation von Plasmodesmata beteiligt, also an Interaktionen zwischen den Zellen (WHITE et al., 1994). Plasmodesmata werden als cytoplasmatische Kanäle charakterisiert, die Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-200 kDa, die aus den Mesophyllzellen ausströmen, schnell in das Phloem gelangen lassen. Über den beteiligten Mechanismus ist wenig bekannt; es sammeln sich jedoch Hinweise über die Beteiligung des Cytoskeletts an diesem Prozess. Die Lokalisation von Aktinfilamenten an den Plasmodesmata, sowohl an der

Randregion, als auch im Kanallinneren (WHITE et al., 1994) wurde nachgewiesen. Neben der Rolle des dynamischen Aktin-Cytoskeletts in Langzeitprozessen wie Zellwachstum und Morphogenese, zeigen Experimente die Bedeutung des pflanzlichen Aktin-Cytoskeletts in Kurzzeitprozessen verbunden mit komplexen Netzwerken von Signalfaktoren, welche Umweltreize in zelluläre Signale und Reaktionen transformieren. Das Aktin-Cytoskelett spielt eine Rolle bei der lichtregulierten Chloroplastenpositionierung (KADOTA und WADA, 1992; KANDASAMY und MEAGHER, 1999), bei der Bewegung der Schließzellen (KIM et al., 1995), bei Reaktionen auf die Schwerkraft und Berührung (BALUSKA und HASENSTEIN, 1997; SEDBROOK et al., 1999), bei pflanzlichen Pathogen-Interaktionen (VOLKMANN und BALUŠKA, 1999) und bei der Wundheilung (McDOWELL et al., 1996b).

1.3.2 Das Mikrotubuli-basierende Cytoskelett

Das auf Mikrotubuli (MT) basierende Cytoskelett der Pflanzen ist in viele verschiedene Prozesse der Generierung subzellulärer Strukturen und der Steuerung der Zell- und Organentwicklung involviert. Pflanzliche Mikrotubuli spielen eine essentielle Funktion bei der Organisation des Cytoplasmas vor allem durch das Bilden von „Schiene“ für den Vesikeltransport, bei der Chromosomenwanderung der Zelleitung und der geordneten Ablagerung von Cellulosefibrillen während der Synthese und Morphogenese der Zellwand. Eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) unterstützt die Organisation und stabilisiert das Netzwerk. Obwohl die MTs weniger elastisch sind als die Aktinfilamente, partizipieren die Proteinfilament-Systeme gemeinsam an vielen, aber nicht allen, Cytoskelett-basierenden zellulären Prozessen.

Mikrotubuli sind hohle, zylindrische Polymere mit einem Durchmesser von etwa 25 nm. Die röhrenbildenden Protofilamente werden vor allem aus den heterodimeren Untereinheiten α - und β -Tubulin aufgebaut. Tubulin findet man im Cytoplasma aller Eukaryotenzellen. Ebenso wie beim Aktin wurde auch ein Tubulin-homologes Protein, FtsZ, in Bakterien identifiziert (ERICKSON und STOFFLER, 1996).

Das Molekulargewicht von Tubulin beträgt etwa 55 kDa. Die *in vitro*-Assemblierung der Untereinheiten erfolgt spontan und wird durch erhöhte Temperatur beschleunigt. Als Nukleotid wird GTP benötigt, welches erst kurz nach dem Einbau in das Protofilament zu GDP hydrolysiert wird. Ebenso wie die Mikrofilamente sind auch Mikrotubuli polare Strukturen, bei denen beide Polymerenden unterschiedliche Einbauraten für die Tubulindimere besitzen. Analog zu den Aktinfilamenten wird zwischen einem schneller wachsenden Plus- und einem langsamer wachsenden Minus-Ende unterschieden. In Zellen sind Mikrotubuli zumeist polar organisiert, d.h. sie weisen mit ihren Plus-Enden zur Außenmembran. Die Minus-Enden sind in der Zelle meistens mit einem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) verbunden, von dem aus neue Mikrotubuli entstehen. Zelluläre Mikrotubuli sind dynamische Strukturen. Selbst wenn die (zelluläre) Organisation eine scheinbar statische Phase erreicht hat, können die einzelnen Mikrotubuli sehr

dynamisch bleiben. Diese dynamische Instabilität (MITCHISON und KIRSCHNER, 1984) ermöglicht die Coexistenz von wachsenden und schrumpfenden Mikrotubuli-Populationen, wobei statistisch beide Populationen ineinander übergehen können.

1.3.3 Interaktionen von SUS mit dem Cytoskelett und der Cellulose-Synthase

Aktin ist reguliert durch seine Bindeproteine (ABPs), die ihrerseits durch Ionen (Calcium, Magnesium, Kalium), „second messenger“, Metabolite, posttranslationale Modifikation etc. reguliert werden. SUS ist ein ABP (WINTER et al., 1998). „Lösliche“, phosphorylierte Saccharose-Synthase bindet *in vitro* sowohl globuläres, als auch filamentöses Aktin. Es wurde gezeigt, dass die lösliche und stärker phosphorylierte Form der Saccharose-Synthase Affinität zu G-Aktin besitzt. Hieraus ließ sich ableiten, dass der N-Terminus und die Phosphorylierungsstelle, Ser-15, an der Interaktion beteiligt sind, oder dass die Phosphorylierung des Enzyms zu einer Konformationsänderung führt, aus der die Freilegung einer Aktinbindestelle an einer anderen Proteinstelle resultieren könnte. *In situ*-Versuche zur Co-Immunpräzipitation der Saccharose-Synthase mit durch Phalloidin stabilisierten Aktinfilamenten zeigten, dass annähernd 15% des gesamten SUS-Proteins *in vivo* mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert sein könnten. *In vitro*-Versuche beweisen die Bindung der Saccharose-Synthase an filamentöses Aktin. Mittels des Kontrollproteins BSA, welches nicht an Aktin bindet, wurde nachgewiesen, dass die Bindung der Saccharose-Synthase spezifisch ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass tierische Aldolase, ein Enzym der Glykolyse, aber auch als ABP in Tieren bekannt, die Assoziation von SUS mit Aktin beeinflusst. Wurden Aktinfilamente gleichzeitig mit tierischer Aldolase und Saccharose-Synthase inkubiert, so wurde die Assoziation von SUS mit Aktinfilamenten reduziert, während die Assoziation der Aldolase nicht vermindert wurde. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass ein Teil der nicht an Membranen gebundenen Saccharose-Synthase mit dem Aktin-Cytoskelett *in vivo* assoziiert ist (WINTER et al., 1998). Über ihre physiologische Funktion und Aufgabe kann bisher jedoch nur spekuliert werden. In Analogie zu gut dokumentierten Enzym-Aktin-Assoziationen in tierischen Systemen wäre die Regulation von Aktivitäten durch Bindung denkbar, oder die Assoziation schafft innerhalb der Zelle ein Gerüst für die koordinierte Anordnung von Enzymen des gleichen Stoffwechselweges. Für eine Regulation der Assoziation von F-Aktin mit Saccharose-Synthase durch Metabolite existieren bereits Hinweise. Da nur ein Teil der Saccharose-Synthase in der Zelle mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert ist, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass für die Bindung eine weitere posttranslationale Modifikation erforderlich ist, die eine Bindestelle entwickelt und/oder die Anwesenheit von Cofaktoren oder metabolischen Effektoren, die eine Konformationsänderung induzieren und so eine Aktinbindestelle an der Saccharose-Synthase freigeben. Winter und Huber (2000) postulierten eine Zuckerinduzierbarkeit der Aktinbindung und kamen zu der Hypothese, dass phosphorylierte Saccharose-Synthase zwei deutlich voneinander getrennte Bindestellen für Saccharose besitzt. Eine katalytische Bindestelle mit

einer hohen Affinität für Zucker und eine regulatorische Bindestelle mit einer geringeren Affinität. Über die physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen der Saccharose-Synthase und dem Aktin-Cytoskelett gibt es bisher noch keine Erkenntnisse, aber es wird spekuliert, dass die regulatorische Zuckerbindestelle an der Wahrnehmung von Kohlenstoffkonzentrationen im „Sink“-Gewebe beteiligt ist. Bislang fehlen für Mais jegliche Daten über cytosolische Saccharosekonzentrationen im „Sink“-Gewebe. In Analogie zu anderen Pflanzenarten und Geweben scheinen cytosolische Saccharosekonzentrationen im „Sink“-Gewebe von 20-200 mM durchaus im physiologischen Bereich zu liegen (GERHARDT et al., 1987; FARRE et al., 2001). Bei ausreichender Saccharoseverfügbarkeit könnte SUS an das Cytoskelett binden und als Teil des Kontrollmechanismus für die Verteilung von Kohlenstoff in die Zellwand- oder Stärkesynthese oder für die Saccharoseakkumulation in der Vakuole fungieren („partitioning“). In diesem Zusammenhang wird zusätzlich eine direkte oder indirekte Assoziation von SUS mit der Cellulose- und/oder Callose-Synthase postuliert. In den Wachstumsbereichen von Pflanzen werden Kohlenhydrate in Form von Cellulose [(1-4) β -D-Glucan], dem Hauptbestandteil der Zellwand, gespeichert. Nach einem Modell von AMOR et al. (1995) spielt die Saccharose-Synthase bei der Synthese von Cellulose und auch Callose [(1-3) β -D-Glucan] eine essentielle Rolle. Demnach bildet die an der Plasmamembran assoziierte Saccharose-Synthase einen Komplex mit den Transmembranproteinen Cellulose-Synthase (CesA) und/oder Callose-Synthase (CIs) und versorgt diese direkt mit dem Substrat UDP-Glucose. Cellulose bzw. Callose wird unter Abspaltung von UDP synthetisiert. Mit der Kopplung von Saccharose-Synthase mit den Glucan Synthasen würden sich für die Pflanzen mehrere Vorteile ergeben.

- Die Förderung der Cellulose- und Callose-Synthase aus Saccharose ohne zusätzlichen Energieaufwand,
- die Vermeidung von Kompetitionen mit anderen UDP-Glucose-verbrauchenden Biosynthesewegen und
- das interne Recycling von UDP, das sowohl die Cellulose-Synthase als auch die Callose-Synthase inhibiert (HAIGLER et al., 2001).

Für die Biosynthese von Callose fanden HONG et al. (2001) die zusätzliche Beteiligung einer UDP-Glucose-Transferase, welche den Transfer von UDP-Glucose von Saccharose-Synthase zur Callose-Synthase katalysiert.

In wachsenden Pflanzenzellen legt das kortikale Cytoskelett die Orientierung der neu gebildeten Cellulosefibrillen in der Zellwand fest. Aufgrund der starren und kristallinen Form der Cellulose- oder Mikrofibrillen kann die Anordnung nur während oder unmittelbar nach der Synthese erfolgen. Die Bereitstellung von UDP-Glucose, dem Substrat der Cellulose-Synthase, könnte durch direkte Assoziation mit der Saccharose-Synthase erfolgen. Verschiedene Hinweise deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Membranassoziation von SUS und einem „Metabolit-Channeling“ für die Cellulosesynthese hin. Die Expression von SUS in *Acetobacter xylium* führte zur Erhöhung der Cellulosesyntheserate (NAKAI et al.,

1999). Menge und Aktivität der Membran-assoziierten SUS korrelierten mit der Zellstreckungsrate in Mais-Pulvini (WINTER et al., 1997) und mit der Syntheserate von Cellulose in Baumwollfasern (RUAN et al., 1997). Eine Colokalisation von Mikrofibrillen und SUS-Protein wurde in Baumwollfasern gezeigt. Ein molekularer Mechanismus der Interaktionen von SUS, Cytoskelett-Elementen und Cellulose-Synthase ist nicht bekannt.

1.4 Fragestellung

Saccharose-Synthase (SUS; Saccharose-UDP-Glycosyltransferase; EC 2.4.1.13) spielt eine zentrale Rolle im pflanzlichen Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von UDP und Saccharose in UDP-Glucose und Fructose. SUS wird vorrangig im heterotrophen Gewebe von Pflanzen exprimiert und ist an der Verteilung von Saccharose, der Haupttransportform assimilierten Kohlenstoffs, in verschiedene Stoffwechselwege wie z.B. Stärkesynthese, Glykolyse und Synthese der Strukturglukane beteiligt. Saccharose-Synthase kommt als frei lösliches Enzym im Cytosol, assoziiert mit der Plasmamembran und/oder am Aktin-Cytoskelett angelagert vor. Die Interaktionen mit der Plasmamembran und den Mikrofilamenten sind spezifisch und transient. Eine physiologische Bedeutung ist für keine dieser Assoziationen nachgewiesen. Der Mechanismus für die Membranassoziation (Protein-Protein-Wechselwirkung und/oder direkte Bindung) ist unbekannt, ebenso wie für die Interaktion der Saccharose-Synthase mit Aktinfilamenten; jedoch wird der reversiblen Phosphorylierung der Saccharose-Synthase sowie der metabolischen Regulation durch lösliche Zucker eine Rolle zugeordnet.

Zu Beginn der Forschungsarbeiten waren in Mais zwei SUS-Isoformen (SUS1 und SH1) identifiziert, die sich hauptsächlich in zell-, entwicklungs- und umweltspezifischer Expression unterscheiden. Funktionale Unterschiede der Isoformen wurden bislang nicht eindeutig geklärt.

Die Forschungsarbeiten sollten dazu dienen, die regulatorischen Mechanismen und physiologischen Bedingungen, die die Lokalisation der Saccharose-Synthase aus Mais in der Zelle bestimmen, zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf verschiedene Aspekte gelegt: Der Einfluss der reversiblen Proteinphosphorylierung und Redox-Modifikation von SUS auf deren enzymatische Aktivität und Aktin-Assoziation wurde mittels mutagenisiertem, rekombinantem Protein untersucht. Ferner wurden Hinweise für die metabolische Regulation der Assoziation im Zusammenhang mit der katalytischen Aktivität gesammelt, womit die Wechselwirkung genauer charakterisiert werden sollte.

Die Bindestelle zwischen Aktin und SUS sollte durch Wettbewerbsversuche von SUS-Protein mit synthetischen Peptiden sowie durch Bindestudien mit mutagenisiertem SUS-Protein eingegrenzt werden. Die subzelluläre Lokalisation von SUS-Protein sollte *in situ* mittels GFP-SuSy-Fusionsproteinen in transformierten Protoplasten visualisiert werden.

Um funktionale Unterschiede und Interaktionspartner der verschiedenen Saccharose-Synthasen zu identifizieren, wurden mit dem Hefe-2-Hybrid-System Isoform-spezifisch nach

proteinogenen Bindepartnern gesucht. Zusätzlich wurde nach Bindepartnern für Mais-Aktin aus Mais gesucht. Da das Mais-Genom bislang nur unvollständig sequenziert ist, wurden beim Durchmustern einer cDNA-Bank aus Mais zahlreiche, bis dahin unbekannte Sequenzen und Proteine als mögliche Bindepartner identifiziert. Durch biochemische Ansätze wurden einige der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen verifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt), BD Biosciences Clontech (Heidelberg), Biometra (Göttingen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym (Oldendorf), Calbiochem (Schwalbach), Diagonal (Münster), Difco (Augsburg), Duchefa Biochemie BV (Haarlem), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenheim), ICN (Eschwege), IBA (Göttingen), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey & Nagel (Düren), Nunc (Wiesbaden), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Mannheim), Riedel-de Haën (Seelze), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deideshofen), Sigma Ark (Steinheim), Stratagene (Heidelberg) und Tebu (Offenbach) im Reinheitsgrad „pro analysi“ bezogen.

Folgende Materialien wurden verwendet: Restriktionsenzyme, RNase, DNase, T4-Ligase und CIAP von MBI Fermentas (St. Leon-Roth); QIAprep-spin-Kit, OligoEx-II-Gel-Extraction-Kit, RNeasy Plant-Kit, Strep-Tactin Superflow Matrix, Nickel-NTA Matrix von Qiagen (Hilden); Kodak BioMax Film von Sigma-Aldrich (Deideshofen); Nitrozellulose (0,45 µm) von Schleicher & Schüll (Dassel), PVDF-Membran von BioRad (München); ECL™ Western Blotting Detection Reagents RPN2209 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) Nylonmembran Hybond-N von Amersham-Buchler (Braunschweig); Dynabeads von Dynal (Hamburg), Protino® Ni 2000 prepacked columns kit von Macherey & Nagel (Düren), MATCHMAKER II Library Construction & Screening Kit von BD Biosciences Clontech (Heidelberg), Enterokinase Cleavage Capture Kit von Novagen (Heidelberg).

2.2 Pflanzenanzucht von *Zea mays*

In der vorliegenden Arbeit wurden alle molekularbiologischen und physiologischen Untersuchungen an Maispflanzen (*Zea mays* L.) der Varietäten *Bergamo* (Pioneer), *Caramba* und *Apache* durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde anteilig im Freiland, im Gewächshaus und in Klimakammern kultiviert. Von im Freiland ausgesäten Pflanzen wurden lediglich die jungen, noch nicht grünen Blätter nach 6-8 Wochen direkt in flüssigen Stickstoff geerntet und bei -80°C aufbewahrt. Für die Anzucht der Maispflanzen im Gewächshaus wurde Anzuchterde verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei einer Belichtungszeit von 16 Stunden und einer relativen Feuchte von 60%. Die sterile Anzucht von etiolierten Maispflanzen erfolgte auf doppelt konzentriertem MSMa-Festmedium (4,4 g/l MS (Murashige and Skoog Medium including vitamins; Duchefa Biochemie BV, Haarlem), 1 g/l MES, 20 g/l Saccharose, 8 g/l Mannitol und 8 g/l Agar) in 15 cm ø Petrischalen. Etiolierte Spross- und Wurzelspitzen wurden nach 4-6 Tagen im Dunkeln geerntet. Als Pflanzenmaterial für die Gewinnung

anaerober RNA wurden definierte Bereiche von Wurzeln und etiolierten Keimlingen 3-5 Tage alter, steril angezogener Maispflanzen verwendet.

Die Sterilisation erfolgte, indem die Maiskörner zunächst für zwei min mit 70%igem Ethanol und anschließend 15 min mit 3-4%igem Natriumhypochlorit inkubiert wurden. Nachdem Ethanol und Chlorbleiche sorgfältig mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ entfernt worden waren, wurden die Maiskörner in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ über Nacht bei 4°C abgedunkelt gequollen. Im Exikkator wurden die Maiskörner auf einem mit Mull bespannten Gitter in mit 100 mM Saccharose komplettierter Maisnährlösung hydroponisch und etioliert bei einer Temperatur von 24°C 3-5 Tage lang kultiviert. Die anaerobe Atmosphäre wurde durch Begasen des Exikkatorinnenraumes mit Stickstoff erreicht.

Maisnährlösung:

1 mM	KNO_3
1 mM	CaNO_3
5 mM	KCl
4 mM	MgCl_2
2 mM	MgSO_4
1 mM	Fe-EDTA (pH 6,5)
1 mM	KP_i ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$)
100 μM	H_3BO_3
1 μM	MnCl_2
30 μM	ZnSO_4
1 μM	CuSO_4
1 μM	Na_2MoO_4

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Bakterien- und Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Zur Vermehrung von Plasmidvektoren wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm XL1 Blue (Stratagene) verwendet. Zur heterologen Expression im bakteriellen System diente der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS (Novagen). Die *S. cerevisiae*-Stämme Y187 und AH109 (BD Biosciences Clontech) wurden zum Identifizieren und Analysieren von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Hefe-2-Hybrid-System benutzt.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.

Stamm	Genetische Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> XL1 Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsrR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lac ^q ZΔM15Tn10 (tet ^r)]	BULLOCK et al. (1987)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F ⁻ , ompT, r ⁻ , m ⁻ , clm ^r	STUDIER et al. (1990)
<i>S. cerevisiae</i> Y187	MAT α , ura3- 52, his3- 200, ade 2- 101, lacZ, MEL1, trp1, leu2	HARPER et al. (1993)
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, HIS3, DE2, lacZ, trp1, leu2	JAMES et al. (1996)

2.3.2 Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Die *E. coli*-Stämme wurden auf LB- oder YT-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Um auf die Anwesenheit eines Plasmides zu selektionieren und Kontamination zu vermeiden, wurden den Medien Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen (Tab. 2.2) zugesetzt. Für Farbindikatorplatten zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten wurden die fertigen Platten jeweils mit 10 µl 20%iger IPTG-Lösung und 80 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml DMF) bestrichen.

LB-Medium: pH 7,5 (NaOH)

1%	(w/v) Bacto Trypton
0,5%	(w/v) Hefeextrakt
0,5%	(w/v) NaCl
für Festmedium	
+ 1,5%	(w/v) Agar

YT-Medium: pH 7,0 (NaOH)

0,8%	(w/v) Bacto Trypton
0,5%	(w/v) Hefeextrakt
0,25%	(w/v) NaCl
für Festmedium	
+ 1,5%	(w/v) Agar

2.3.3 Anzucht von *S. cerevisiae*-Kulturen

Der *S. cerevisiae*-Stamm Y187 wurde auf 0,5-2,0 fachem YPD-Medium (2% (w/v) Difco Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose, pH 6,5) bzw. YPD-Platten (+ 2% (w/v) Agar) und der *S. cerevisiae*-Stamm AH109 auf YPDA-Medium (YPD-Medium + 0,003% (w/v) Adeninhemisulfat) bzw. YPDA-Platten (+ 2% (w/v) Agar) unter aeroben Bedingungen bei 30°C angezogen. Die Glucose sowie das Adeninhemisulfat wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C dem Medium aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (40% (w/v) Glucose bzw. 0,2% (w/v) Adeninhemisulfat) zugeführt. Zur Plasmidselektion wurde den Medien ggf. Kanamycin zugesetzt. Alternativ wurden transformierte Hefestämme, entsprechend der haploiden oder diploiden Genotypen der Hefezellen, auf selektivem SD (synthetic dropout)-Medium (0,67% (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren, 2% (w/v) Glucose, 10% (v/v) Dropout-Lösung, pH 5,8) bei 30°C angezogen und kultiviert. Die Zusammensetzung der Dropout-Lösung (DO) ist in Tabelle 2.3 aufgeführt. Je nach Dropout-Lösung wurden die entsprechenden Aminosäuren nicht zugegeben. Die SD-Minimalmedien wurden nach Zugabe der sterilen Dropout-Supplementlösungen entsprechend der fehlenden Aminosäure(n) mit SD-/Trp, SD-Leu/Trp, SD-Ade/Trp, SD-QDO (für vierfach selektives Medium) usw. bezeichnet.

Tabelle 2.2: Konzentration der verwendeten Antibiotika.

Antibiotika	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	200 µg/ml
Kanamycin (Kan)	30 µg/ml
Chloramphenicol (Clm)	25 µg/ml
Tetrazyklin (Tet)	10 µg/ml

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Dropout-Lösungen für das Hefe-2-Hybrid-System.

Aminosäure	Endkonzentration in der Dropoutlösung (DO)			
	DO-Leu	DO-Trp	DO-Leu/Trp	QDO (-His/Trp /Ade/Leu)
L-Adeninhemisulfat	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	-
L-Arginin HCl	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Histidin HCl-monohydrat	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	-
L-Isoleucin	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
L-Leucin	-	1000 mg/l	-	-
L-Lysin-HCl	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l	2000 mg/l	2000 mg/l	2000 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l	-	-	-
L-Tyrosin	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l	300 mg/l
L-Uracil	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l	1500 mg/l	1500 mg/l	1500 mg/l

2.3.4 Plasmide

In Tabelle 2.4 sind die Vektoren aufgeführt, die zur Klonierung und Expression eingesetzt wurden. Des Weiteren sind Plasmide, die für Klonierungen und Expressionen verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren und Plasmide.

Soweit nicht anders vermerkt wurden die Plasmide in der Abteilung Pflanzenphysiologie der Universität Osnabrück hergestellt.

Vektoren	Relevante Merkmale	Referenz
pGEM-Teasy	Klonierungsvektor, Amp ^r , lacZ, T7-Promotor	Promega, Mannheim
pDrive	Klonierungsvektor, Amp ^r , Kan ^r lacZ, T7-Promotor	Qiagen, Hilden
pRSET-A, -B, -C	Expressionsvektor <i>E. Coli</i> , N-terminaler His-tag, Amp ^r , EK-Schnittstelle, T7-Promotor	Invitrogen, Karlsruhe
pRIBA1	Expressionsvektor, C-terminaler Streptag II, Amp ^r , T7-Promotor	IBA, Göttingen
pET-16b	Expressionsvektor, N-terminale His-tag, Amp ^r , Factor Xa, T7-Promotor	Novagen, Madison, USA
pGADT7-Rec	Expressionsvektor (Hefe), HA-Tag, LEU2, GAL4AD, Amp ^r	CHIEN et al., (1991)
pGADT7-RecT	Expressionsvektor (Hefe), HA-Tag, LEU2, SV40 Large T-antigen, GAL4AD, Amp ^r	Clontech, Heidelberg
pGBKT7	Expressionsvektor (Hefe), c-Myc, TRP1, Kan ^r , GAL4-DNA-BD	LOURET et al., (1997)
pGBKT7-53	Expressionsvektor (Hefe), Murein p53, c-Myc, TRP1, Kan ^r , GAL4-DNA-BD	Clontech, Heidelberg
pGBKT7-Lam	Expressionsvektor (Hefe), Lamin C, c-Myc, TRP1, Kan ^r , GAL4-DNA-BD	Clontech, Heidelberg
pGFP2	GFP-cytosolisch in pUC19 mit CaMV 35S Promotor, Amp ^r	Kost, Benedikt; Chua-Labor, NY
Plasmide	Relevante Merkmale	Referenz
Klonierung und Expression in <i>E. coli</i>		
SuSy-wt (S15N)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (N= nativ) [GI:1351136] BamHI/EcoRI; (<i>Z. mays</i>)	Winter, H./Hannah, C.; USF, USA
SuSy-D (S15D)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→D mutagenisiert)	Winter, H./Hannah, C.; USF, USA
SuSy-E (S15E)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→E mutagenisiert)	Winter, H./Hannah, C.; USF, USA

SuSy-A (S15A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→A mutagenisiert)	Winter, H./Hannah, C.; USF, USA
S15A(S170A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→A, S170→A mutagenisiert)	Thilo, A.
S15E(R380A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→E, R380→A mutagenisiert)	Winter, H./Holtgräwe, D.
S15E(W382A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→E, W382→A mutagenisiert)	Winter, H./Holtgräwe, D.
S15E(W398A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→E, W398→A mutagenisiert)	Winter, H./Holtgräwe, D.
S15E(Y391A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→E, Y391→A mutagenisiert)	Winter, H./Holtgräwe, D.
S15E(E387A)	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (S15→E, E387→A mutagenisiert)	Winter, H./Holtgräwe, D.
C352S	SuS1 cDNA clone in pRSET-A (C352→S, mutagenisiert)	Holtgräwe, D.
C437S	SuS1 cDNA clone in pRSET-A (C437→S, mutagenisiert)	Holtgräwe, D.
C352S/C437S	SuS1A cDNA clone in pRSET-A (C352→S, C437→S mutagenisiert)	Holtgräwe, D.
SuS3-pRSET-B	SuS3 cDNA clone [GI:22121989] in pRSET-B Klonierung: <i>BglII/EcoRI</i>	Holtgräwe, D.
cGPx-pRIBA1	cGPx cDNA [GI:22268404] ohne Stoppcodon in pRIBA1; Klonierung: <i>Eco31I</i>	Holtgräwe, D./Schipper, K.
EnoII-pRSET	Enolase2 (GI:602253) cDNA (<i>Z. mays</i>) in pRSET-A. Klonierung: <i>BamHI/XhoI</i>	Holtgräwe, D.
Snrk1-pET16b	Snrk1 cDNA clone [GI:45378905] über <i>NdeI/BamHI</i> in pET16b	Holtgräwe, D.
GAPDH2-pet16b	GAPDH cDNA clone [GI:30679036] über <i>NdeI/BamHI</i> in pET16b (<i>A. thaliana</i>)	Altmann, B.
ALF-IBA3	Aldolase cDNA clone [GI:168419] über <i>XbaI/HindIII</i> in pASK-IBA3 (<i>Z. mays</i>)	Thilo, A.
HVR-pRSET	partialer CesA1 clone (C2085 - A2465) [GI:9622873], <i>ACC65I/PstI</i> in pRSET-C	Altmann, B./Pelz, J.
Klonierung und Expression in Hefen		
SuSy-pGBKT7	SuS1 cDNA clone [GI:1351136] über <i>EcoRI/BamHI</i> in pGBKT7	Altmann, B./Holtgräwe, D.
Sh1-pGBKT7	SH1 cDNA clone (SH1, GI:135060) über <i>EcoRI/BamHI</i> in pGBKT7	Altmann, B./Holtgräwe, D.
SuS3-pGBKT7	SuS3 cDNA clone [GI:22121989] über <i>NdeI/EcoRI</i> in pGBKT7	Altmann, B./Holtgräwe, D.
Snrk1-pGBKT7	Snrk1 cDNA clone [GI:45378905] über <i>NdeI/BamHI</i> in pGBKT7	Altmann, B./Holtgräwe, D.
Actin-pGBKT7	ACT1 cDNA [GI:113220] über <i>PstI/BamHI</i> im pGBKT7	Altmann, B./Holtgräwe, D.
HVR-pGBKT7	partialer CesA1 clone (C2085 - A2465) [GI:9622873] über <i>SalI/PstI</i> in pGBKT7	Altmann, B./Pelz, J.
Sonstige		
pGFP2mut	<i>BsaI</i> -Schnittstelle mutagenisierter (C1538→T) pGFP2	Holtgräwe, D.
SuSy-GFP	35S-SuSy (SuS1 ohne Stoppcodon)-GFP-Konstrukt in pGFP2mut	Holtgräwe, D.
Sh1-pGFP2	SH1 cDNA (SH1, GI:135060, ohne Stoppcodon)-GFP-Konstrukt in pGFP2mut	Holtgräwe, D.

2.3.5 Hefe-2-Hybrid cDNA-Bibliothek

Für das Screening mit dem 2-Hybrid-System wurde eine Mais-cDNA-Bibliothek (Anke Scholz, Dissertation) verwendet, deren cDNA-Gesamtheit in den *SmaI*-linearisierten AD-Vektor pGAD-T7rec kloniert wurde (2.6.1.2). Der AD-Vektor induziert in einem geeigneten

Hefewirtsstamm die Expression eines Fusionsproteins, das aus der N-terminal lokalisierten Gal4-Transaktivierungsdomäne (GAL4-AD; aa 768-881) und den C-terminal gelegenen Proteinen der cDNA-Bibliothek zusammengesetzt ist. Ein N-terminal eingefügtes Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal) des großen T-Antigens des SV40-Virus (SV40 NLS) dirigiert die Fusionsproteine in den Kern der Hefezelle.

2.3.6 Oligonukleotide

In Tabelle 5 sind Oligonukleotide aufgelistet, die als Primer für die Amplifikation von cDNA-Fragmenten mittels PCR (2.4.6.3), zur ortsspezifischen Mutagenese (2.4.6.4) oder als standardisierte Oligonukleotid-Primer zur DNA-Sequenzanalyse (2.4) eingesetzt wurden.

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')
Klonierungsprimer	
Shu1	TGCTCTAGAATGGCTGCCAAGCTGACTC
Shu2	CCGCTCGAGCTAATCGAAGGACAGCGGAAC
Shu3	CCGCTCGAGATCGAAGGACAGCGGAAC
DaSy1(XbaI)	TGCTCTAGAATGGGGGAAGGTGCAGGTGAC
DaSy5(XhoI)	CCGCTCGAGCTTGCTGGAGGGCTCTCCCTC
DaSy4	CCGCTCGAGTCACTTGCTGGAGGGCTCTCCCTC
SuS3NdeI-fw	GGAATTCATATGATGTCTGCGCCGAAGCTGGACC
SuS3Bgl2-fw	GAAGATCTATGTCTGCGCCGAAGCTGGACC
SuS3EcoRI-rev	GCGAATTCCTACTGCGGTTGGTCAATTGCAAG
SH1BamHI-fw Shu4	GGATCCATGGCTGCCAAGCTGACTCGCCTT
SH1EcoRI-rev Shu5	GAATTCCTAATCGAAGGACAGCGGAACCTGGCT
SuSyEcoRIfw	CCGGAATTCATGGGGGAAGGTGCAGGTGACCGT
SuSyBamHIrev	CGCGGATCCCTCACTTGCTGGAGGGCTCTCCCTC
SH1EcoRIfw	CCGGAATTCATGGCTGCCAAGCTGACTC
SH1BamHIrev	CGCGGATCCCTAATCGAAGGACAGCGGAAC
GLUPO-priba1fw	ATGGTAGGTCTCAAATGGCTGCTGCCTCC
GP-PRIBA1-rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTATAACTCCCTAGTAGTTTCTTG
GPx-fw	ATGGCTGCTGCCTCCTCCGCCAC
GPx-rev	TTAATTAACCTCCCTAGTAGTAGTTTCTTGATGTCC
Aktin-sense	CGCGGATCCATGGCTGACGAGGATATCCAGC
Aktin-antisense	AACTGCAGTTAGAAGCACTTCATGTGGACATTG
SnrkI-fw	ATGGATGGAAGTAGTAAAGGGAGTGGGC
SnrkI-rev	CTATAGAACCCTAAGCTTGGTA
SnrkNdeIfw	GGAATTCATATGATGGATGGAAGTAGTAAAGGGAGTGGGC
SnrkBamHIrev	CGCGGATCCCTATAGAACCCTAAGCTTGGTAAG
ENO-fw	GGATCCATGGCGGCAACGATCCAATC
ENO-rev	CTCGAGTTAGTAGGGCTCCACAGGTGT
Mutageneseprimer	
SuSyC352Sfw	AACTGGCACCACAGTGGCCAGC
SuSyC352Srev	GCTGGCCACTGGTGGTGGCCAGTT
SuSyC437Sfw	GGTGTACTCACAGTACCATTGCC
SuSyC437Srev	GGCAATGGTACTGTGAGTAACACC
Sequenzierungsprimer	
T7-Promotor-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-Terminator	GCTAGTTCATTGCTCAGCGG
SP6 Promotor-Primer	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
Oligo-dT ₁₈ -Primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTN (N = C,A oder G)
AD-Insert-fife	GATGAAGATACCCCAACAAACCC
AD-Insert3-antisense	AGATGGTGCACGATGCACAG

Sequenzierungsprimer für SUS1

SeqSuSy423	GGACTTTGAGCCATTCAATGCCTC
SeqSuSy954	GCTGCTGAGGATCAAGCAGTGTGG
SeqSuSy1560	CGACCCCAAGTTCAACATCGTGTC
SeqSuSy2044	CTGACGGTGGTTGAGGCCATGACC

Sequenzierungsprimer für SuS3

SuS3-fw2	CGAGCTTGACTTCGAGCCG
SuS3-fw3	CATCATTGAGGCCAGACC
SuS3-fw4	GGAAATCTTGTGGCGTCATTGC
SuS3-fw5	GAACACATTGGGCATCTGGA
SuS3-fw6	AGGTCCAGCTGAGATCATAG

Sequenzierungsprimer für diverse AD-Plasmide waren stets genspezifisch und werden nicht gesondert aufgeführt.

Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden unterstrichen. Sämtliche Primer wurden von Sigma-Ark, Steinheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Roth bezogen.

2.4 Molekularbiologische Standardmethoden**2.4.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

Die effiziente Transformation von *E. coli*-Zellen mit Nukleinsäuren erfordert eine Desintegration der Bakterienmembran. Neben dem chemischen Verfahren mit divalenten Kationen kann dies auch durch ein starkes elektrisches Feld erreicht werden. Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase müssen zuvor durch sequentielle Waschschriffe in ein Medium mit einem geringen elektrischen Leitwert überführt werden. Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes (5 kV/cm) kann dann für 4-5 ms die Membran desintegriert werden, ohne dass die Zellen absterben. Die Aufnahme von Fremd-DNA wird somit ermöglicht.

2.4.1.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und deren Transformation in rubidiumchloridhaltigen Medien erfolgte nach HANAHAN (1983). Von der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden 0,1-0,5 µg mit den kompetenten Zellen 30 min lang auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Hitzeschock (42°C, 90 s) wurde die Aufnahme von Fremd-DNA in die Zellen erleichtert. Die transformierten Zellen wurden in LB-Medium (2.3.2) 60-90 min lang bei 37°C aerob angezogen, anschließend zur Plasmidselektion auf Festmediumplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet.

2.4.1.2 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dichtbewachsener *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 bei 37°C aerob angezogen. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde nach 30 minütiger Inkubation auf Eis für 15 min bei 4°C und 4.000g pelletiert. Das Resuspendieren des Bakterienpellets erfolgte in 100 ml Glycerollösung (10% (v/v) Glycerol). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 50 ml Glycerollösung aufgenommen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe,

bestehend aus Zentrifugation und Resuspension in einem Volumen von 10 ml. Nach dem abschließenden Waschschrift wurden die Bakterien in 4 ml Glycerollösung konzentriert. Die Lagerung der elektrokompenten Zellen erfolgte in Fraktionen zu je 80 µl bei -80°C.

Für die Elektrotransformation wurden 80 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen, 0,1 cm Elektrodenabstand) überführt. Jeweils 1-500 ng gereinigtes Plasmid (entsprechend ca. 20 µl Suspension der Plasmidisolierung aus Hefen, s. 2.4.4) wurden mit den elektrokompenten Bakterien durchmischt und für 4-5 ms einer elektrischen Spannung von 1,25 kV bei einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω (Gene-Pulser™, BioRad) ausgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml SOC Medium überführt und für 60-90 min bei 37°C und 220 Upm inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden 100-250 µl des Ansatzes auf selektiven Agarplatten ausgestrichen, so dass sich nach 12-16 h Bebrüten antibiotikaresistente Klone zeigten.

SOC-Medium: pH 7,0 (NaOH)

2% (w/v) Bacto Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂*
10 mM MgSO₄*
20 mM Glucose*

*Substanzen wurden dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C aus einer sterilfiltrierten Stammlösung zugeführt.

2.4.2 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Hefezellen der Stämme Y187 und AH109 wurden für das Screenen einer cDNA-Bibliothek sowie für den direkten Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen bekannter Proteine mit der Lithium-Acetat-Methode (modifiziert nach GIETZ et al., 1992) transformiert. Zum Herstellen kompetenter Zellen wurden 50 ml YPD-Medium mit einer Kolonie *S. cerevisiae* Y187 oder AH109 von einer Stammpalte (YPD- bzw. YPDA-Agarplatte) angeimpft und aerob bei 30°C für 24 h inkubiert. 300 ml YPD- bzw. YPDA-Medium wurden mit dieser Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 angeimpft und unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei RT für 5 min mit 1.000g. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 50 ml H₂O_{bidest} resuspendiert, erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1,5 ml TE/LiAc-Puffer (100 mM Lithium-Acetat, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert. In einem E-Cup wurden 1 µg Plasmid-DNA, 100 µg denaturierte Herring Testes Carrier-DNA und 100 µl kompetente Zellen gemischt und mit 600 µl PEG/LiAc-Puffer (40% PEG (durchschnittliches MW: 3.500), 100 mM LiAc, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,5) versetzt. Der Ansatz wurde bei RT für 30 min bei 200 Upm geschüttelt und anschließend mit 70 µl DMSO komplettiert. Nach einem Hitzeschock (15 min, 42°C) wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert, für 10 s bei 14.000g zentrifugiert; und das Pellet wurde in 500 µl TE-Puffer

(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Jeweils 100 µl der Transformationsansätze wurden auf Tryptophan- (für pGBKT7-Plasmidkonstrukte) bzw. Leucin-defizienten (für pGADT7-Rec-Plasmidkonstrukte) SD-Agarplatten ausplattiert und 3-5 Tage lang bei 30°C inkubiert.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Aus dicht bewachsenen *E. coli*-Übernachtskulturen (14-16 h, OD₆₀₀>2) wurde zur Restriktionsanalyse, Ligation oder Sequenzierung eine Isolierung der Plasmid-DNA vorgenommen. Diese wurde mit Hilfe des „QIAprep-spin-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll zur Isolierung von High-copy-Plasmiden durchgeführt. Die Isolierung beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellwand. Das Lysat wurde auf eine Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an der Säulenmatrix (Silika-Gel) gebunden wurde. Verunreinigungen wurden durch Waschschriffe entfernt, die DNA mit Puffer oder Wasser eluiert und bei -20°C oder -70°C gelagert.

2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Analyse positiver Interaktionen, die beim jeweiligen Screenen der Mais-cDNA-Bibliothek mit dem Hefe-2-Hybrid-System aufgetreten waren, erfolgte eine Plasmidisolierung aus den Hefezellen nach der Methode von HOFFMAN und WINSTON (1987). Hefetransformanten, die eine deutliche Galaktosidaseaktivität zeigten und damit als positive Interakteure anzusehen waren, wurden von SD/QDO-Agarplatten entnommen, in 3 ml SD/-Leu/Trp-Medium resuspendiert und über Nacht aerob bei 30°C inkubiert. Die Kultur wurde durch Zentrifugation (2 min, 5000g, RT) geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl Lysispuffer H resuspendiert, mit 200 µl PCI (25:24:1 PCI, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol) und ca. 300 mg säuregewaschenen Glasperlen (Ø = 250-700 µm) gemischt und 3 min lang kräftig gevortext. Anschließend wurde die Hefesuspension 5 min lang bei 13.500g zentrifugiert, die wässrige obere Phase in ein neues E-Cup transferiert und die Phenol/Chloroform-Fällung ohne Glasperlen zweimal wiederholt. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurden mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2,5 Vol. 100%-igem Ethanol für 30 min auf Eis gefällt, durch Zentrifugation pellettiert (13.500g, 20 min, 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Für die Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen (2.4.1.2) wurde das getrocknete DNA-Pellet in 20 µl H₂O_{bidest} oder TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

Lysispuffer H: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
2% (v/v) Triton X-100
1% (w/v) SDS
100 mM NaCl
1 mM EDTA

2.4.5 Prinzipielle Verfahren zur DNA-Analyse

2.4.5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde die DNA enthaltende Lösung mit dem gleichen Volumen an Phenol versetzt, gut gevortext und für 5 min bei 10.000g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde dem gleichen Volumenanteil Chloroform versetzt, gut durchmischt und für 5 min bei 10.000g zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und die Nukleinsäure mittels einer Ethanolpräzipitation isoliert.

2.4.5.2 Ethanolpräzipitation und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Bei dieser Methode, die zum Ankonzentrieren von DNA eingesetzt wird, werden Nukleinsäuren durch Zugabe von Ethanol und Salz als Natriumsalze aus wässrigen Lösungen gefällt. Die Quantifizierung der isolierten Nukleinsäuren erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm (*Bio* Spektralphotometer, Eppendorf; Quarzküvette, Hellma). Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit abgeschätzt, weil Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen. Zusätzlich wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm der Gehalt an verunreinigenden Proteinen innerhalb einer Probe bestimmt. Bei einem Quotienten E_{260}/E_{280} von 1,8-2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95%. Einer OD_{260nm} von 1,0 entsprechen etwa 50 µg/ml doppelsträngiger (ds)DNA (33 µg/ml einzelsträngige (ss)DNA, 40 µg/µl RNA und 31 µg/µl Oligonukleotide). Bei Plasmid-Isolierungen mit dem „QIAprep-spin-Kit“ wurden Extinktionsratio-Werte (E_{260}/E_{280}) von 1,7-1,9 erreicht.

2.4.5.3 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren mit Hilfe eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Diese Methode wurde verwendet, um Nukleinsäuren zu identifizieren, analysieren und isolieren. Durch das in die DNA interkalierende Homidiumbromid bzw. Ethidiumbromid (EtBr) fluoreszieren die Nukleinsäuren unter UV-Licht und können lokalisiert werden. Die Agarosekonzentration lag je nach Größe der zu trennenden Fragmente bei 0,8-1,5%. Es wurden horizontale Agarosegele in 0,5 x TBE-Puffer verwendet (nach SAMBROOK et al., 1989). Dafür wurde die Agarose in 0,5 x TBE-Puffer mit 0,5 µg/ml Homidiumbromid (BioMol) versetzt. Die aufzutrennenden Nukleinsäureproben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. 6x Loading-Dye Lösung (MBI Fermentas) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60-120 V. Die Größe der aufgetragenen Nukleinsäurefragmente wurde mit Hilfe eines Größenstandards (λ DNA/*Pst*I 24 oder O'Range Ruler 500 bp, beide MBI Fermentas) bestimmt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Geldokumentationsanlage (Camag Reprostar II, Berlin). Die jeweiligen Fragmente wurden bei einer Wellenlänge von 302 nm im UV-Transilluminator sichtbar gemacht und für präparative Zwecke aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Dokumentation wurden die Gele mit der Polaroid MP 4 Instant Camera System (Kodak) fotografiert.

2.4.5.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QIAex II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven und quantitativen Adsorption von DNA an Silicagel-Partikel unter Hochsalzbedingungen. Die DNA bleibt während des Waschvorgangs an die Silica-Partikel gebunden und kann zum Ende der Aufreinigung spezifisch abgelöst werden.

2.4.5.5 Restriktion und Modifikation von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit TypII-Restriktionsendonukleasen, die palindromische Sequenzen erkennen. Durch die Spaltung der Erkennungssequenz (4-8 Nukleotide) entstehen glatte oder einzelsträngige 3'- bzw. 5'- überhängende Enden. Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller (MBI Fermentas) angegebenen Puffersystem bei empfohlener Temperatur-, Mengen- und Zeitkonstante. Der Restriktionsverdau wurde bei unterschiedlichen Optima zweier Enzyme separat mit eingefügter Reinigung durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte bei Bedarf eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz (20 min 65°C) oder eine Trennung des Enzyms von der DNA-Lösung durch eine Reinigung der DNA mit Hilfe des „QIAquick Spin PCR-Purification Kit“ (Qiagen) entsprechend zum Herstellerprotokoll. Neben dem präparativen Zweck der Restriktion wurden Restriktionsanalysen zur Überprüfung einer erfolgreichen Subklonierung durchgeführt.

2.4.5.6 Dephosphorylierung der kohäsiven Enden von Plasmiden

Durch die Inkubation mit CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, MBI Fermentas) wurden die Phosphatreste an den 5'- und 3'-Enden der Plasmid-DNA abgespalten. Die Dephosphorylierung verhinderte eine Religation des Vektors und erhöhte damit die Effizienz der Subklonierung. Die Inkubation wurde mit 1 U CIAP/μg Vektor-DNA in Reaktionspuffer bei 37°C für 1 h durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 μl. Durch anschließendes Erhitzen bei 72°C für 10 min wurde das Enzym inaktiviert.

2.4.5.7 Ligation von doppelsträngiger DNA

Die komplementären kohäsiven Enden der jeweiligen cDNA und des Plasmids, die nach dem Restriktionsverdau entstanden waren, wurden im molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) für 16 h bei 4-16°C ligiert. Die Inkubation von insgesamt 700-1000 ng DNA erfolgte mit 0,1 U T4-DNA Ligase (MBI Fermentas) in Ligasepuffer. Das Reaktionsvolumen betrug 20 μl. Zum Beenden der Ligrationsreaktion wurde der Ansatz 20 min bei 65°C inaktiviert.

2.4.6 Amplifikation, Klonierung und Mutagenese von cDNA-Konstrukten

Für die heterologe Expression von rekombinantem Protein (2.8.4.1) in *E. coli* und *S. cerevisiae* sowie für die Herstellung von Sonden für die RNA-Gel-Blot-Analysen (2.7.5)

wurden verschiedene Plasmidkonstrukte verwendet. Für deren Klonierung wurden zunächst anhand der bekannten Sequenzen die in Tabelle 5 angegebenen Primer ausgewählt. Als DNA-Matrize diente der erste Strang cDNA (2.4.6.2) aus *Zea mays*. Unter Verwendung der entsprechenden Primer wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, welches nach Reinigung (2.4.5.4) in die geöffneten Klonierungsvektoren (pGEM-Teasy oder pDrive) inseriert wurde. Nach Restriktionsverdau (2.4.5.5) des Plasmides wurde das resultierende DNA-Insert entweder als Matrize zur Sondenherstellung (2.7.4) oder für die Subklonierung in Expressionsvektoren verwendet. DNA-Sequenzierungen (2.5) wurde durchgeführt, um die Richtigkeit der Konstrukte zu überprüfen.

2.4.6.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird durch das Enzym Reverse Transkriptase ein RNA-*Template* in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss daran folgt eine PCR, bei der mit spezifischen Primern gezielte Regionen der entstandenen cDNA amplifiziert werden. Die Methode wurde zur gewebespezifischen Identifikation und Amplifikation von cDNA-Klonen angewandt.

2.4.6.2 Einzelstrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

RNA-Moleküle sind aufgrund ihrer OH-Gruppen leicht degradierbar und werden daher in molekularbiologischen Untersuchungen häufig durch cDNA-Sequenzen ersetzt. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase können RNA-Sequenzen in komplementäre DNA-Sequenzen umgeschrieben werden. Die reverse Transkription ist somit eine hoch empfindliche Methode, um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen, mRNA zu quantifizieren oder cDNA zu synthetisieren. Der Start der Synthese durch die Reverse Transkriptase wird durch Bindung an doppelsträngige Nukleinsäure möglich. Die Reaktionsgemische enthalten daher z.B. Desoxythymidin-Oligonukleotide (Oligo(dT)) als Startmoleküle. Die Oligo(dT)-Primer hybridisieren mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle und bilden so die Startpunkte für die cDNA-Synthese. Auf diese Weise werden nur mRNA-Sequenzen in cDNA umgeschrieben und von der übrigen Zell-RNA getrennt. Pro Reaktionsansatz wurden 5 µg Gesamt-RNA und 1 µl Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml) mit H₂O_{bidest.} (PCR-Qualität) auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt, zur Denaturierung 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Pro Ansatz wurden 4 µl 5x Erststrang-Puffer (GIBCO BRL), 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl 10 mM dNTPs hinzugefügt. Die Proben wurden vorsichtig gemischt, 2 min bei 42°C vorgewärmt und anschließend mit je 1 µl SuperScript II Transkriptase (200 U/µl; GIBCO BRL) versetzt. Nach Inkubation für 60 min bei 42°C wurden die Reaktionen durch Denaturierung des Enzyms bei 70°C (15 min) gestoppt, die Ansätze werden bei -20°C eingefroren.

2.4.6.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) kann bei Wahl geeigneter Oligonukleotide zur *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten verwendet werden. Dazu werden ein doppelsträngiges DNA-Template sowie zwei begrenzende Oligonukleotide (Primer) in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und hitzeresistenter *Taq*-DNA-Polymerase einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen und DNA-Polymerisierungen ausgesetzt. Mit Hilfe der PCR wurden die codierenden Bereiche verschiedener cDNAs spezifisch amplifiziert. Bei der PCR fanden Composite-Primer, mit denen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen an den Enden des PCR-Fragments angebracht wurden, Anwendung. Durch die Wahl von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsenzyme am 5'- und 3'-Ende der PCR-Fragmente war nach einem Restriktionsverdau eine in der Orientierung der cDNA festgelegte Subklonierung in den Vektor möglich. Die jeweiligen *forward* und *reverse* Composite-Primer trugen neben der codierenden cDNA-Sequenz am 5'-Ende die Erkennungssequenz für die ausgewählten Restriktionsenzyme und mindestens drei weitere Nukleotide, um die Effizienz des Restriktionsschnitts zu erhöhen. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 0,5 U *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) oder *Pfx*-Polymerase (Gibco) 1 µl dNTP Mix (10 mM pro Nukleotid) und je 50 pmol der Primer sowie 10-100 ng cDNA-Template in Reaktionspuffer durchgeführt. In einem PCR-Mastercycler (Eppendorf) wurden nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 96-98°C die drei folgenden Schritte in 30-45 Zyklen wiederholt. Eine Denaturierung bei 96°C für 30 s, das Primerannealing für 1 min bei einer um 5-10°C unter der Schmelztemperatur (T_m) des Oligonukleotids liegenden Temperatur und schließlich die Elongation für 1 min je 1.000-bp-Fragment bei 72°C. Die PCR wurde durch eine 5-minütige Inkubation bei 72 °C beendet.

2.4.6.4 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese dient der Untersuchung von Beziehungen zwischen Proteinstruktur und -funktion sowie zwischen Proteinstruktur und Genexpression aber auch der Modifikation von Vektoren. Durch Mutationen werden bestimmte DNA-Bereiche gezielt verändert und nach der Expression des daraus resultierenden Enzyms werden dessen Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp untersucht und charakterisiert. Punktmutationen sowie Austausch, Deletionen und Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren können an dsDNA vorgenommen werden. Die Ansätze zur Mutagenese wurden leicht nach dem „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) verändert. Für die Mutagenese des Tripletcodes der Aminosäuren S-15, S-170, C-352, R-380, E-387, Y-391, W-398 und C-437 im Plasmid SuSy-wt (Tabelle 2.4) wurden je zwei komplementäre Oligonukleotide (Tabelle 2.5) synthetisiert, bei denen eine Mutation von zwei Sequenzen flankiert wurde. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten, ortsspezifischen Mutagenesen handelte es sich jeweils um den Austausch nur eines Nukleotids im Tripletcode, was zum

Austausch einer einzelnen Aminosäure führte und gleichzeitig das Plasmid so wenig wie möglich zu modifizierte. Ausgehend von den beiden Oligonukleotiden erfolgte eine Amplifikation der gesamten Template-DNA unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase, die aufgrund einer 3'→5'-Korrekturlese-Exonuklease-Aktivität eine geringe Fehlerrate bei der DNA-Synthese aufweist.

10 x Reaktionspuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8,8
 20 mM MgSO₄
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 1% (v/v) Triton X-100
 0,1% (w/v) BSA

Reaktionsansatz: 5 µl 10 x Reaktionspuffer
 125 ng Forward-Primer
 125 ng Reverse-Primer
 1 µl dNTP-Mix (2,5 mM pro dNTP)
 x µl DNA-Template (5-50 ng)
 2,5 U *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase
 ad 50 µl H₂O (HPLC-grade)

Ausgehend von der Länge des verwendeten DNA- Templates wurden folgende Reaktionszeiten für die PCR angewandt:

16 Zyklen:	}	Denaturierung	95°C	30 s
		Denaturierung	95°C	30 s
		Annealing	55/60°C	1 min
		Extension	68°C	2 min pro kb DNA-Template

Während der PCR hybridisieren die Primer an die *Template*-DNA und werden durch die DNA-Polymerase verlängert. Es wurde ein Vektor erzeugt, der ein *Insert* mit der gewünschten Mutation trägt. DNA, die von *E. coli*-Stämmen isoliert wurde, enthält in den meisten Fällen Dam-Methylase, die die Adeninbasen der DNA methyliert. Diese als *dam*⁺ bezeichnete DNA ist Ziel des Abbaus durch die Restriktionsendonuklease *DpnI*. Das PCR-Produkt wurde deshalb mit 0,1 U/µl der *DpnI*-Endonuklease verdaut, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA abbaut und somit die parentale, nichtmutierte *Template*-DNA eliminiert. Die selektierte, mutierte Plasmid-DNA wurde in *E. coli* XL1Blue transformiert (2.4.1.1) und vermehrt. Durch Selektion der positiven Klone und nachfolgender Sequenzierung (2.5) konnte der Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese überprüft werden.

2.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung konnten Klonierungen und Mutagenesen kontrolliert sowie putative Bindepartner im Hefe-2-Hybrid-Screen identifiziert werden. Sequenzanalysen

wurden nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (SANGER et al., 1977) durchgeführt. Hierbei wurden in einer speziellen PCR sowohl gewöhnliche dNTPs als auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt, die einen Kettenabbruch initiierten. Die Sequenzierungs-PCR erfolgte mit dem „ABI Prism®BigDye™Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (PE Biosystems, Foster City, USA). Der 15 µl-Sequenzierungs -Ansatz (0,8-1 µg Plasmid-DNA, 1 µl Sequenzierungsprimer (10 µM), 4 µl Ready Reaction Mix [mit AmpliTaq®DNA-Polymerase; BigDye Terminators (ddNTPs), dNTPs, Puffer] und x µl Merck-H₂O) wurde mit folgendem PCR-Programm amplifiziert.

PCR-Programm:		96°C	1 min	Initiale Denaturierung
	}	96°C	30 s	<i>Template</i> -Denaturierung
		50°C	15 s	Primeranlagerung
		60°C	4 min	Primerverlängerung
		60°C	5 min	Finale Verlängerung
		10°C	∞	
	30 Zyklen			

Nicht eingebaute Nukleotide und andere Verunreinigungen wurden von der amplifizierten DNA durch anschließende Fällung getrennt.

360 µl-Fällungsansatz:	15 µl	Sequenzierungs-Ansatz
	85 µl	Merck-H ₂ O
	10 µl	3 M Na-Acetat pH 5,0
	250 µl	100% Ethanol

Der Fällungsansatz wurde für 15 min bei 4°C und 16.000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Durch Zugabe von 300 µl 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet vor erneuter Zentrifugation (5 min, RT, 16.000g) gewaschen. Das trockene Pellet wurde bis zum Gelauftrag abgedunkelt und gekühlt aufbewahrt. Die Sequenzierung der gefällten DNA-Fragmente erfolgte mit dem ABI Prism®-Sequenzierungsautomat (PE Biosystems, Foster City, USA) durch Ulrike Coja in der Abteilung Spezielle Botanik der Universität Osnabrück. Die Produkte der Sequenzierungs-PCR wurden dort über ein Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Laser abgetastet. Mittels des Computerprogramms Chromas (Version 1.43) wurden die Fluoreszenzreaktionen erfasst und die Nukleotidsequenz ermittelt.

2.5.1 Kommerzielle Sequenzanalyse

Die kommerzielle Sequenzierung der Nukleinsäuresequenzen wurde von der Firma MWG AG Biotech, Ebersberg durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich über „QIAprep-spin-Kit“ (2.4.3) gereinigte DNA als Matrize verwendet. Für die Sequenzierungen wurden standardisierte Oligonukleotid-Primer eingesetzt (Tab. 2.5)

2.5.2 DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung

Die DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm „Clone Manager“ (Version 7.01) sowie „Align Plus“ (Version 5.01) analysiert. Für Sequenzvergleiche mit Hilfe des Programms „Clustal W“ (Version 1.82) wurden Daten direkt aus den entsprechenden Datenbanken (EMBL, GenBank, SwissProt, usw.) angefordert.

Die isolierten pGAD-cDNA-Plasmide wurden mit den Primern „AD_Insert-fife“ und „AD-Insert3-antisense“ sequenziert und sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Proteinebene durch Datenbankvergleiche analysiert. Mit den Programmen BLASTN und TBLASTN wurden auf Nukleinsäureebene die Datenbanken Genbank, EST Division, EMBL, DDBJ und PDB durchsucht (ALTSCHUL et al., 1990). Während BLASTN sehr ähnliche Sequenzen mit hoher Homologie erkennt, werden mit dem Programm TBLASTN ähnliche Sequenzen mit größeren Lücken ermittelt. Sequenzvergleiche auf Peptidebene wurden mit den Programmen BLASTP und TBLASTP gegen die Datenbanken GenBank, PDB, SwissProt und PIR durchgeführt (ALTSCHUL et al., 1990). Molekulargewichte sowie isoelektrische Punkte wurden mit dem Programm „ProtParam tool“ berechnet. Hinweise zur Sekundärstruktur der Proteine wurden mit dem Programm „Pôle BioinformatiqueLyonnais“ (GEOURJON und DELÉAGE, 1995) gewonnen. Mit Hilfe der Programme „MOTIFSearch“ und „MOTIFfinder“ (BAIROCH, 1992) wurden bekannte Motive in Peptidsequenzen ermittelt. Strukturvorhersagen zur Wahrscheinlichkeit der Bildung einer superspiralisierten Helix wurden mit dem COILS Algorithmus (LUPAS et al., 1991) getroffen. Vorhersagen zu wahrscheinlichen Phosphorylierungsstellen wurden mit dem Programm „NetPhos 2.0“ erstellt. Verweise auf die genannten Programme sind im Internet unter der Web-Adresse von „ExpASY“ (<http://www.expasy.ch>) zu finden.

2.6 Das Hefe-2-Hybrid-System (Two-Hybrid-System)

Das 2-Hybrid-System ist ein genetischer Assay zur *in vivo*-Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in einem eukaryotischen System, z. B. dem Hefesystem (FIELDS und SONG, 1989; CHIEN et al., 1991; GUARANTE, 1993). Das System kann zur Charakterisierung von bekannten Interaktionen und zur Identifizierung von neuen Proteinen, die mit einem Köderprotein (*Bait*) interagieren, angewendet werden. Der Vorteil des Systems gegenüber biochemischen Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen besteht in der Empfindlichkeit der Methode und der sofortigen Verfügbarkeit der cDNA-Sequenz des interagierenden Proteins. Das System basiert auf der modularen Struktur des Gal4-Transkriptionsfaktors aus Hefe, der aus zwei separaten Domänen, der aminoterminalen DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne (AD), besteht (KEEGAN et al., 1986) und an der positiven Regulation von Genen zur Galaktoseverwertung in *S. cerevisiae* beteiligt ist. Die Gal4-BD bindet sequenzspezifisch an eine cis-regulatorische, palindromische Sequenz in der Nähe der Promotorregionen der *Gal*-Gene, die als UAS (upstream activating sequence) bezeichnet wird. Die Gal4-AD interagiert

ihrerseits mit anderen für die Transkriptionsinitiation benötigten Faktoren und aktiviert die Transkription der stromabwärts liegenden Ziel- bzw. Reporter gene. Die direkte kovalente Bindung zwischen diesen Domänen kann durch andere Proteinabschnitte ersetzt werden. Beide Domänen allein sind transkriptionell inaktiv (FIELDS und SONG, 1989), jedoch reicht die nichtkovalente Bindung der beiden isolierten Domänen aus, um einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor zu rekonstituieren.

In Hefen werden die für den Galaktosemetabolismus benötigten Gene sowohl durch zwei regulatorische Proteine GAL4 und GAL 80 als auch durch die Kohlenstoffquelle im Medium kontrolliert (GUTHERIE und FINK, 1991; HESLOT und GAILLARDIN, 1992). Unter Anwesenheit von Galaktose bindet das GAL4-Protein an GAL4-sensitiven distalen Kontrollelemente stromaufwärts (Enhancer) von verschiedenen am Galaktosemetabolismus beteiligten Genen und aktiviert deren Transkription. Bei Abwesenheit von Galaktose bindet GAL80 an GAL4 und blockiert die transkriptionale Aktivität. Ferner ist bei Anwesenheit von Glucose die Transkription der im Galaktosemetabolismus involvierten Gene unterdrückt. Protein-Protein-Interaktionen wurden mit dem Matchmaker Yeast-Two-Hybrid-System II (MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit, BD Biosciences Clontech) und den Hefewirtsstämmen AH109 (Clontech) sowie Y187 (Clontech) aus *S. cerevisiae* untersucht, bei denen die endogenen *Gal4*- und *Gal80*-Gene durch Deletionen inaktiviert sind. Diese Stämme zeigen weder Glucoserepression noch Induktion von Galaktose verstoffwechselnden Proteinen, solange keine Two-Hybrid-Interaktion stattfindet. Der Hefestamm AH109 ist für die Biosynthese der Aminosäuren Tryptophan (Trp), Adenin (Ade), Histidin (His) und Leucin (Leu) auxotroph. Für die Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen wurden die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 (beide Clontech) verwendet. Der Vektor pGBKT7 trägt neben der Sequenz des *TRP1*-Gens auch die Sequenzen für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne, während der Vektor pGADT7 über die Sequenz der GAL4-Aktivierungsdomäne und das *LEU2*-Gen verfügt. Die beiden verwendeten Hefestämme gehören unterschiedlichen Paarungstypen (AH109 Mat a und Y187 Mat α) an, so dass es bei einer Hefe-Paarung, ähnlich der Konjugation bei Bakterien, zu einer Plasmidübertragung von einer Donorhefe auf eine Akzeptorhefe kommen kann. Die Co-Expression der beiden Gene *TRP1* und *LEU2* ermöglicht die Komplementation der TRP und LEU Auxotrophie von *S. cerevisiae* AH109. Die N-terminale Fusion der GAL4-Domänen an die zu testenden Konstrukte erfolgte so, dass das zu klonierende Fragment im Leseraster der GAL4-Domäne weitergeführt wurde. Die Reporter gene *ADE2*, *HIS3*, *LacZ* und *MEL1* stehen unter Kontrolle des GAL4 Transkriptionsfaktors. Kommt es infolge einer Wechselwirkung zweier Fusionsproteine zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors und damit zur Aktivierung der GAL4 regulierten *HIS3* oder *ADE2* Gene, so kann die HIS beziehungsweise ADE-Auxotrophie von *S. cerevisiae* AH109 komplementiert werden. Somit kann die Transformation der Expressionsvektoren in Hefezellen, bzw. eine Interaktion

zwischen Köder- und Genbankprotein, durch das Wachstum auf selektivem Medium, welchem die entsprechende Aminosäure(-kombination) fehlt, überprüft werden.

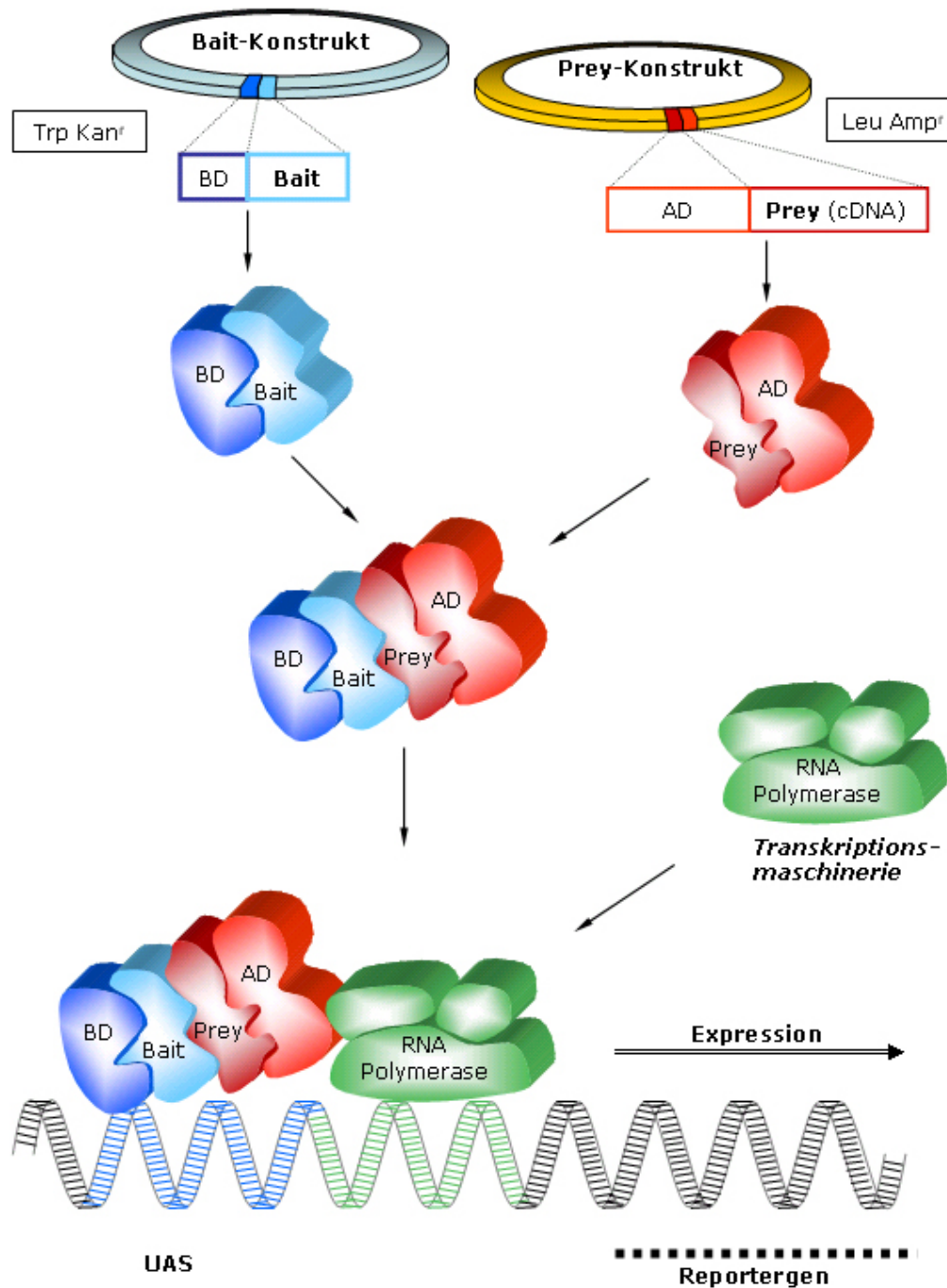


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Hefe-2-Hybrid-Systems.

Die Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* und *lacZ* wurden in die chromosomale DNA des Hefestammes AH109 inseriert. Die vier Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1/lacZ* stehen unter der Kontrolle dreier völlig heterologer, GAL4-aktivierbarer UASs und Promotorelemente (GAL1, Gal2 sowie Mel1). Das Köderprotein allein bindet über die BD-Domäne an den Gal1-Promotor, was jedoch nicht zur Transaktivierung der Reportergene führt. Ebenso sind die AD-Fusionsproteine der cDNA-Bibliothek allein nicht in der Lage, die Reportergene

zu aktivieren. In beiden Fällen wachsen die Hefezellen nicht auf Histidin-Mangelmedium (His-) und zeigen keine α -Galaktosidase-Aktivität (Mel-). Wenn ein Köderprotein mit einem Protein der cDNA-Bibliothek interagiert, werden die einzeln nicht-funktionellen BD- und AD-Domänen verbunden, so dass ein funktioneller Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors an die „Upstream“-Aktivatorsequenz des Gal1-Promotors werden die *HIS3*- und *MEL1*-Reporter Gene aktiviert, so dass ein His+ (Wachstum auf Histidin-Mangelmedium) und Mel+- (Blaufärbung mit X- α -Gal Substrat) Phänotyp der Hefezelle resultiert. Die Aktivierung der Reporter Gene ist ein Nachweis einer möglichen Protein-Protein-Wechselwirkung, die jedoch durch unabhängige biochemische und zellbiologische Methoden verifiziert werden muss.

Für die cDNA-Durchmusterungen (2-Hybrid-Screen) wurden ein *Bait*-Protein („*Bait*“), das aus der N-terminal lokalisierten Gal4-BD und jeweils verschiedenen cytoplasmatisch lokalisierten Proteinen zusammengesetzt war, mit der Gesamtheit der exprimierten *Prey*-Proteine („*Prey*“) einer cDNA-Bibliothek, die an den C-Terminus der Gal4-AD-Domäne fusioniert wurden, in einem Hefewirtsstamm co-exprimiert. Nach Translation im Cytosol wurden das *Bait*-Protein und die *Prey*-Proteine durch Kernlokalisierungssignale (SV40) in den Kern der Hefezelle dirigiert.

2.6.1 Klonierung der Fusionsproteinkonstrukte

Für die Identifizierung unbekannter sowie zur Verifizierung vermuteter Protein-Protein-Interaktionen wurden cDNA-Sequenzen aus *Z. mays* entweder mit der DNA-Bindedomänen (BD) oder der Aktivierungsdomäne (AD) des GAL4-Transkriptionsfaktors aus *S. cerevisiae* in kommerziell erhältlichen Vektoren (pGADT7-Rec, pGBKT7) fusioniert.

2.6.1.1 Konstruktion der *Bait*-Proteine

Die mittels RT-PCR (s. 2.4.6) amplifizierte cDNAs der SUS-Isoformen (SUS1 GI:1351136; SH1, GI: 135060 und SuS3 GI: 22121989), der cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx) (GI: 22268404) und von Aktin (GI: 13220) sowie SnRK1 (SnrkI) (GI: 45378905) wurden zunächst ohne Vorgabe der Orientierung in Klonierungsvektoren inseriert. Durch erneute Amplifikation mit genspezifische Oligonukleotiden, die im 5`-Bereich zusätzlich palindromische Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme tragen, wurden N- und C-terminal divergente Schnittstellen in die PCR-Produkte eingeführt. Nach Restriktionsspaltung der erhaltenen Fragmente wurde die jeweilige cDNA in die korrespondierenden Schnittstellen des Vektors pGBKT7 subkloniert. Die *Bait*-Plasmide pGBKT7-53 und pGBKT7-Lam (Clontech) wurden als Kontrollvektoren bei den folgenden Analysen identisch verwendet.

2.6.1.2 Konstruktion der *Prey*-Proteine

Um diese Methode für eine Suche nach bislang unbekanntem Interaktionspartnern einzusetzen, kann eine Hybridprotein-Bank hergestellt werden, indem die gesamte cDNA an

die codierende Sequenz der Gal4-AD fusioniert wird. Die verwendete cDNA-Bibliothek aus anaerob gewachsenen Wurzel- und Sprossgewebe von *Z. mays* wurde von Anke Scholz geb. Thilo zur Verfügung gestellt. Die Isolierung von Gesamt-RNA, Synthese des ersten Stranges cDNA mit Oligo (dT)-Primern, Amplifikation doppelsträngiger cDNA durch LD-PCR (Long Distance-PCR), Anreicherung von DNA-Fragmenten mit mehr als 200 Basenpaaren, homologe Rekombination mit dem *SmaI*-linearisierten pGADT7-Rec-Vektor und Transformation in AH109-Hefezellen erfolgte nach Angaben des Herstellers (BD Clontech, Heidelberg). Die in AH109 vorliegende cDNA-Bibliothek umfasst ca. $1,2 \times 10^4$ verschiedene Klone und hat einen Titer von etwa 2×10^8 cfu/ml. Die Aufbewahrung erfolgte in YPDA Medium unter Zusatz von 25% (v/v) Glycerol bei -80°C .

2.6.2 Test auf Autoaktivierung des Fusionsproteinkonstruktes

Um das Gal4-basierte Hefe-2-Hybrid-System effizient und stringent für die Detektion von unbekanntem und vermuteten Interaktionen zwischen zwei Proteinen nutzen zu können, muss vor dem eigentlichen *Screen* sichergestellt werden, dass das Fusionsprotein, welches nach Transkription des BD-Konstruktes exprimiert wird, die Reportergene nicht unabhängig von einer Interaktion mit der AD aktiviert. Eine solche Autoaktivierung wird häufig für Transkriptionsfaktoren oder andere Köderproteine mit sauren, amphiphatischen Domänen beobachtet (RUDEN et al., 1991; RUDEN, 1992). Für den Test wurden die BD-Konstrukte (z.B. SuSy-pGBKT7) sowie die Negativ-Kontrolle (DNA-BD Vektor, pGBKT7) in beide Hefestämme (AH109 und Y187) transformiert (2.4.2). Die Transformanden wurden auf unterschiedlichen aminosäuredefizienten und X- α -Gal-haltigen SD-Medien SD/-Trp/X- α -Gal, SD/-Trp/-His/x- α -Gal, SD/-Ade/-Trp/X- α -Gal) bei 30°C kultiviert; ihre Phänotypen wurden anschließend analysiert. Das Köderprotein ist transkriptionell inaktiv und damit für einen *Screen* nutzbar, wenn die transformierten Kolonien einen *weißen* Phänotyp zeigen und *nicht* auf SD/-Trp/-His oder SD/-Ade/-Trp wachsen. Das Fusionsprotein ist hingegen aktiv, wenn die transformierten Zellen eine *blaue* Färbung aufweisen und auf den Medien SD/-Trp/-His oder SD/-Ade/-Trp wachsen. In diesem Fall ist ein Hefe-2-Hybrid-*Screen* sowie der direkte Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion nicht möglich, da die Aktivierung der Reportergene, z.B. der Galaktosidase, nicht durch eine Interaktion zweier Proteine hervorgerufen wurde.

2.6.3 Test des Fusionsproteinkonstruktes auf Toxizität

Einige Proteine, die mit der Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert sind, können toxisch auf die Hefezellen wirken und somit eine geringere Wachstumsrate oder gar ein Absterben der Kultur nach sich ziehen. Beim Test des Fusionsproteinkonstruktes auf Toxizität wird die Wachstumsrate von Hefekolonien, die mit dem *Bait*-Proteinkonstrukt oder dem *Bait*-Vektor Y187 transformiert wurden, verglichen. Je 50 ml Tryptophan-defizientes und Kanamycin-haltiges SD-Medium wurden mit einer transformierten Einzelkolonie (Y187[pGBKT7] und z.B. Y187[SuSy-pGBKT7]) angeimpft und bei 30°C für 16 bis 24 h im

Schüttler (250-270 Upm) aerob angezogen. Die Kulturen sollten eine $OD_{600} \geq 0,8$ erreicht haben. Falls der Wert viel geringer ist, kann das Fusionsprotein toxisch sein und ist somit wenig geeignet für einen *Screen*. Wenn das Fusionsprotein das Wachstum der Hefen anscheinend nicht hemmt, kann diese Vorkultur direkt zum Verschmelzen der Hefen („mating“) eingesetzt werden (2.6.4).

2.6.4 Verschmelzen der cDNA-Bank mit Fusionsproteinkonstrukten

Hefen kommen als haploide und diploide Zellen vor. Zwei haploide Zellen können sich nach Absonderung von Paarungsfaktoren zu einer diploiden Zelle vereinigen, sofern beide einen unterschiedlichen *Mating*- oder Paarungstyp (Mat a oder Mat α) besitzen. Die entstandene a/ α -Zelle enthält das gesamte genetische Material beider Ausgangszellen. Wurden mit *Bait*-Plasmiden transformierte Y187-Hefezellen (Mat α) und AH109-Hefezellen (Mat a), die die *Prey*-Plasmide tragen, verpaart, kann die Selektion der entstandenen diploiden Zellen durch Stoffwechsellautotrophien erfolgen. Die diploiden Hefezellen enthalten beide Plasmide (*Bait*- und *Prey*-Plasmid) und können beide Fusionsproteine mit den jeweiligen Domänen des Transkriptionsfaktors in nur einer Zelle konstitutiv exprimieren. Interagieren die exprimierten Hybridproteine (*Bait* und *Prey*) im Kern der Hefezelle miteinander, wird der Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert und die Reportergene (u.a. die α -Galaktosidase) werden exprimiert. Hierfür wurden die Zellen der 50-ml-Vorkultur aus dem Toxizitätstest (2.6.3) durch Zentrifugation (600g, 5 min) geerntet und das Pellet in 5 ml SD/-Trp Medium resuspendiert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt und sollte bei $\geq 1 \times 10^9$ Zellen/ml liegen. Diese Suspension wurde zum Verpaaren („mating“) verwendet, indem je ein aliquoter Anteil von 0,5 ml der transformierten AH109[pGADT7-Rec-Plasmide] (cDNA-Bibliothek in AH109-Hefezellen, 2.6.1.2) und Y187[pGBKT7-Plasmide] (2.6.1.2) in einem 1,5-ml-E-Cup vorsichtig gemischt und in einen 2-l-Kolben mit Schikane überführt wurden. Anschließend wurden 45 ml doppelt konzentriertes, selektives YPDA/Kan-Medium vorsichtig dazugegeben und durch leichtes Schwenken gemischt. Das 1,5 ml E-Cup der Mischkultur wurde mit etwa 1 ml Medium ausgespült und mit der restlichen Kultur vereinigt. Die Paarungskultur wurde bei 30°C unter leichtem Schwenken (30-40 Upm) für 20-24 h inkubiert. Nach 20 h wurde unter dem Lichtmikroskop (IX 70-Mikroskop, Olympus) ein Tropfen auf Zygotenbildung hin untersucht. Falls noch Zygotenbildung zu beobachten war, wurde die Kultur für weitere vier Stunden kultiviert, ansonsten erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (1.000g, 10 min). Der 2 l Kolben wurde zweimal mit 0,5 x YPDA/Kan nachgespült und mit dem Zellpellet im Zentrifugenröhrchen vereinigt, vorsichtig resuspendiert und nochmals bei 1.000g 10 min abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 10 ml 0,5 x YPDA/Kan aufgenommen, das Endvolumen bestimmt und für die Selektion diploider Hefezellen (2.6.5) auf aminosäuredefizienten SD-Agarplatten ausplattiert. Zur Kontrolle wurden Hefezellen, die die

Bait-Plasmide pGBKT7-53 bzw. pGBKT7-Lam trugen, in gleicher Weise zur Verpaarung eingesetzt.

2.6.5 Selektion diploider Hefezellen

Für die Selektion diploider Hefen nach dem Verschmelzen von Hefestämmen wurden je 100 µl einer 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 Verdünnung der geernteten Paarungskultur (2.6.4) auf SD/-Trp, SD/-Leu und SD/-Trp/-Leu-Agarplatten (Ø 100 mm) ausplattiert. Zusätzlich wurden je 200 µl des Ansatzes auf SD/QDO-Medium (SD/-His/-Trp/-Ade/-Leu) auf 150 mm-Agarplatten kultiviert. Die Platten wurden bis zum Erscheinen großer Kolonien (Ø >2 mm) bei 30°C bebrütet (4-6 Tage). Sämtliche Kolonien wurden auf SD/QDO/X- α -Gal Platten (Ø 100 mm) umplattiert und erneut bei 30°C inkubiert (3 - 8 Tage). Kolonien mit offensichtlicher α -Galaktosidaseaktivität (2.6.6) bzw. einer deutlichen Blaufärbung wurden auf SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal-Platten kultiviert. Abschließend wurden die Kolonien, die weiterhin eine intensive Blaufärbung und ein ungehemmtes Wachstum zeigten, auf vierfach selektive SD/QDO/X- α -Gal Platten umplattiert. Hefezellen, die nur ein schwaches Wachstum und ein weißes oder sogar rötliches Koloniebild zeigten, wurden im Zuge dieser stringenten Selektion verworfen. Blaue Kolonien wurden für eine Plasmidisolierung (2.4.4) zur Analyse des involvierten *Prey*-Plasmids in je 2 ml leucindefizientem SD-Medium (SD/-Leu oder SD/-Leu/-Trp) aerob angezogen.

2.6.6 α -Galaktosidase Assay

Im GAL4 basierendem 2-Hybrid-System ist der Nachweis der α -Galaktosidaseaktivität eine sensitive kolorimetrische Methode zur *in vivo* Detektion von positiven Protein-Protein-Interaktionen in Hefekolonien (Aho et al., 1997). Die katalytische Aktivität des Enzyms setzt die Expression des *MEL1*-Reportergens nach Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors im 2-Hybrid-System voraus. Hefekolonien mit positiven Protein-Protein-Interaktionen zeigen auf selektiven SD-Agarplatten unter Anwesenheit von X- α -Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- α -D-Galaktopyranosid) eine deutliche Blaufärbung. Das für α -Galaktosidase (auch Melibiose oder α -D-Galactoside-Galactohydrolase, EC 3.2.1.22) codierende *MEL1*-Gen gehört zur *GAL*-Genfamilie und ist in beiden verwendeten Hefestämmen (AH109, Y187) in der chromosomalen DNA lokalisiert. Abhängig von der *GAL4*-Aktivierung wird das Genprodukt in den periplasmatischen und extrazellulären Raum sekretiert, so dass dort extern zugesetztes Substrat, X- α -Gal, in Galaktose und einen blauen Indigo-Farbstoff hydrolytisch gespalten werden kann. Der große Vorteil dieses Reportersystems ist, dass die α -Galaktosidaseaktivität als Indikator für eine Protein-Protein-Interaktion direkt auf Agarplatten in einem bläulichen Hefekoloniebild sichtbar gemacht werden kann. X- α -Gal-Indikatorplatten wurden hergestellt, indem entweder X- α -Gal direkt auf eine selektive SD-Mediumplatte aufgetragen wurde, oder dem entsprechenden SD-Medium bei 55°C vor dem Gießen der Platten zugefügt wurde. X- α -Gal wurde aus einer Stammlösung (20 mg/ml in DMF) dem Medium mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Auf den

getrockneten Agarplatten wurden die zu untersuchenden Hefekolonien ausgestrichen und bis zum Sichtbarwerden einer Blaufärbung, meist vier bis sechs Tage, bei 30°C kultiviert. Anschließend können die Indikatorplatten für spätere Analysen bei 4°C gelagert werden, wobei sich die Blaufärbung generell verstärkt. Die Intensität der Blaufärbung wurde für jede Kolonie protokolliert.

2.6.7 Verschmelzungseffizienz und Anzahl der entstandenen Zygoten

Um die Verschmelzungseffizienz zu ermitteln, wurden die Kolonien, die auf den Platten SD/-Trp, SD/-Leu und SD/-Trp/-Leu Verdünnungsplatten (2.6.5) gewachsen waren ausgezählt (Platten sollten zwischen 30 - 300 Kolonien haben). Die Berechnung der lebensfähigen Kolonien pro Milliliter (cfu/ml) auf jedem SD-Medium erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{cfu}}{(\text{Vol. plattiert [ml]} \times \text{DF})} = \# \text{ Lebensfähige [cfu/ml]}$$

DF: Verdünnungsfaktor (dilution factor)

Dabei entspricht die # cfu/ml auf SD/-Leu der Lebensfähigkeit des Y187 Partners und die # cfu/ml auf SD/-Trp der Lebensfähigkeit des AH109 Partners während # cfu/ml auf SD/-Leu/-Trp die Lebensfähigkeit der diploiden Hefezellen angibt. Der Stamm mit der geringeren Lebensfähigkeit ist der begrenzende Partner der Verschmelzung. Für die Gewährleistung einer maximalen Ausbeute putativer Interaktoren im Banken-Screen sollte der AH109-Partner, der die cDNA-Plasmide trägt, der begrenzende Partner sein. Die Verschmelzungseffizienz wird in der Prozentzahl diploider Kolonien (% Diploide) angegeben und wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\frac{\# \text{ cfu/ml Diploide}}{\# \text{ cfu/ml begrenzender Partner}} \times 100 = \% \text{ Diploide}$$

2.6.8 Validierung von Interaktoren im Hefe-2-Hybrid-System

Zahlreiche Versuche im Hefe-2-Hybrid-System lieferten Ergebnisse, die eine Einteilung der isolierten Interaktoren nach falsch-positiven und putativ-relevanten Interaktoren gestattete. Bereits vor der Plasmidisolierung wurden Hefeklone, die zu einer Reporteragen-Aktivierung führten, daraufhin überprüft, ob eine Abhängigkeit dieses Phänotyps von der Expression des Beuteproteins bestand. Unterschiedliche Intensitäten der Blaufärbung auf X- α -Gal-haltigem Medium wurden ebenso protokolliert wie Inkubationszeiten bis zum Auftreten der Kolonien. Nach partieller Sequenzierung (2.5) der Bibliothek-cDNAs wurden Interaktoren aussortiert, die bekanntermaßen in 2-Hybrid-Systemen falsch positiv reagieren. Weitere Kontrollversuche zur Überprüfung der Spezifität der 2-Hybrid-Interaktion mit dem jeweiligen *Bait* erfolgten erst nach Isolierung der *Prey*- bzw. AD-Plasmide (2.4.4). in Form von Retransformationen in Hefen. AD-Plasmide wurden in Kombination mit dem ursprünglichen

oder mit einem anderen *Bait*-Plasmid retransformiert. Neben der Verifikation putativer Interaktionspartner, die durch vorangegangenes *Screenen* der cDNA-Bank identifiziert wurden, sollten Interaktionen, die aus alternativen Bindestudien sowie aus Literaturdaten naheliegend waren, *in vivo* bestätigt werden. Hierfür wurden *Bait*- und/oder *Prey*-Plasmide, die z.B. für die Hypervariable Region (HVR) der Cellulose Synthase (*CesA1*) oder Aktin aus *Z. mays* codierten, in die Hefestämme AH109 und Y187 transformiert (2.4.2). Durch das gezielte Verpaaren bzw. *Maten* (2.6.4) von Hefezellen, die lediglich die beteiligten Fusionsproteine für eine vermutete bzw. bereits identifizierte Protein-Protein-Interaktion exprimierten, sollte sichergestellt werden, dass die jeweilige Interaktion nicht auf experimentelle Artefakte zurückzuführen ist (z.B. *Bait*-Protein bindet an der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors und nicht am C-terminal fusionierten Protein, Bindung an Komponenten des Cytoskeletts durch z.B. hydrophobe Wechselwirkungen). Die Tests auf Toxizität (2.6.3), auf Autoaktivierung der Reportergene (2.6.2) sowie die gezielte Verschmelzung von Hefezellen, die bekannte *Bait*- und *Prey*-Plasmide tragen, erfolgte analog zum Verschmelzungsprotokoll für das *Screenen* einer cDNA-Bibliothek (2.6.4). Die Volumina aller Ansätze wurden auf ein Zehntel reduziert.

2.7 Arbeiten mit RNA

2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Gesamt-RNA wurde aus autotrophem und heterotrophem Maisgewebe gewonnen. Entsprechend der weiteren Verwendung wurden zwei divergente Methoden zur Isolierung angewandt. Für „Northern-Blot“-Analysen wurden größere Mengen Gesamt-RNA nach dem modifizierten Protokoll, US-Patent 5.973.137, aufgearbeitet, während für Anwendungen, bei denen hochreine RNA benötigt wurde, die Isolierung mit Hilfe eines Kits erfolgte.

2.7.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach US-Patent 5.973.137

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde nach dem RNA-Miniprep-Protokoll (US-Patent 5.973.137) von Gentra Systems (Minneapolis, USA) mit leichter Modifikation durchgeführt. Eine RNA-Isolierung durch Salzfällung anstelle einer Phenol/Chloroform-Extraktion eignet sich sehr gut für stärkehaltige Gewebe. Verschiedene Maisgewebe (Wurzeln, etiolierter und grüner Spross, Pulvini, Blatt, sich entwickelnder Kolben usw.) wurden unter flüssigem Stickstoff in gebackenen, eisgekühlten Mörsern zu einem feinen Pulver zermahlen und zu aliquoten Anteilen von je 50-100 mg in gekühlte 1,5 ml-E-Cups überführt. Dem noch gefrorenen Pflanzenmaterial wurde 600 µl Zellysepuffer bei RT zugeführt. Während des anschließenden Pottens (Potter-Evelhjem-Homogenizer; Braun, Melsungen) bei RT für 15-20 s sollten die Proben auftauen. Dieses Homogenat wurde mit 200 µl Protein-Präzipitationspuffer durch kurzes Vortexen gemischt und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Die lösliche Fraktion wurde von der unlöslichen durch Zentrifugation (20.000g, 5 min, 20°C;

Eppendorf Tischzentrifuge 5402) getrennt. Der lösliche, RNA-haltige Überstand (~700 µl) wurde in einem frischen Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen Isopropanol für 30-120 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (20.000g, 5 min, 20°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 300 µl 70-75% EtOH gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Glaspipette sorgfältig entfernt und das Pellet unter der Sterilbank kurz getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen, durch fünfminütige Inkubation bei 60°C im Thermomixer (750 Upm, Eppendorf) gelöst und letztmalig zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde entweder bis zur weiteren Analyse bei -70°C gelagert oder direkt für die Bestimmung des RNA-Gehaltes (2.4.5.2) und für „Northern-Blot“-Analysen (2.7.5) eingesetzt. Die erwartete Ausbeute liegt bei 20 µg RNA pro 50 mg Pflanzmaterial.

Zellysepuffer:

- 2% (w/v) SDS
- 68 mM (tri-)Na-Citrat
- 132 mM Citronensäure
- 10 mM EDTA (0,8 M, pH 8,0)
- 0,1% (v/v) DEPC

Mit H₂O auffüllen, bei 30°C für 2 h rühren. Der pH-Wert sollte ~3,5 betragen. Den Puffer 20 min steril autoklavieren.

Protein-Präzipitationspuffer:

- 4 M NaCl
- 17 mM (tri-)Na-Citrat
- 33 mM Citronensäure
- 10 mM EDTA (0,8 M, pH 8,0)
- 0,1% (v/v) DEPC

Mit H₂O auffüllen, bei 30°C für 2 h rühren. Der pH-Wert sollte ~3,5 betragen. Den Puffer 20 min steril autoklavieren.

2.7.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit

Für die Anreicherung von mRNA (2.7.2) sowie zur Synthese des ersten Stranges cDNA (2.4.6.2) wurde zunächst hochreine Gesamt-RNA mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen) aus *Z. mays* isoliert. Jeweils 100 mg Pflanzenmaterial wurde nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Die erhaltene Gesamt-RNA war von sehr guter Qualität. Die Ausbeuten lagen zwischen 15-30 µg/100 mg FW.

2.7.2 Isolierung von mRNA aus *Zea mays*

Die Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA (2.7.1) erfolgte mit dem Oligotex mRNA-Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Die RNA wurde zuvor einem separaten DNase-Verdau (2.7.3) unterzogen. Die mRNA wurde direkt zur Erststrangsynthese eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.7.3 DNase-Verdau der RNA-Proben

In einem Endvolumen von 10 µl wurden 2,5 µg RNA mit 2 U DNase I im zugehörigen Reaktionspuffer (MBI-Fermentas) gemischt und 30 min lang bei 37°C inkubiert. Der DNase-Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM, pH 8,0) und Erwärmung auf 65°C für 10 min gestoppt.

2.7.4 Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA für die „Northern“-Hybridisierung (2.7.5.3) erfolgte mit dem „Ready-To-Do DNA-Labeling Beads-Kit“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Als markiertes Nukleotid diente hierbei [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Bioscience, UK). Als Matrize für die Synthese wurden 100-250 ng cDNA eingesetzt. Eine anschließende Gelpermationschromatographie (2.8.4.7) trennte Mononukleotide, die während der Synthese nicht eingebaut wurden, von der radioaktiven DNA-Sonde ab. Die Sonde konnte, je nach Kalibrierungsdatum der verwendeten Radioaktivität, einige Tage bei -20°C gelagert werden.

2.7.5 RNA-Gel-Blot-Analyse („Northern-Blot“)

2.7.5.1 Auftrennung von RNA in Agarose-Formaldehydgelen

Agarose-Formaldehydgele (FA-Gele, RNA-Gele) wurden in einer H_2O_2 -behandelten, RNase-freien Gelkammer verwendet. 1% (w/v) Agarose wurde in einem gebackenen Kolben mit 80% (v/v) DEPC- H_2O aufgekocht, auf ca. 55°C abgekühlt, mit 10% (v/v) 10x MEN-Puffer sowie 10% (v/v) 37%-igem Formaldehyd versetzt und in einen RNase freien Gelträger (12,5 cm x 10 cm) gegossen. Die RNA-Proben (10-20 μg) wurden mit DEPC- H_2O auf ein Volumen von 10 μl verdünnt, mit 20 μl Auftragspuffer (+ 10 ng/ μl Etbr; Homidiumbromid) vermischt und vor dem Gelauftrag 10 min auf 65°C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte für 2-4 h bei 50-70 V in 1x MEN-Puffer. Nach dem Lauf wurden die RNA-Banden zur Beurteilung der gleichmäßigen Beladung und der Integrität der RNA auf dem UV-Leuchttisch betrachtet und mit Hilfe der Geldokumentationsanlage fotografiert.

10 x MEN-Puffer: 200 mM MOPS
 50 mM NaAc x $3\text{H}_2\text{O}$
 10 mM EDTA

Den pH-Wert auf 6,8 mit NaOH einstellen, mit 0,1% DEPC- H_2O versetzen, 2 h bei RT rühren, autoklavieren und anschließend abgedunkelt bei 4°C lagern.

Auftragspuffer: 15% (v/v) 10 x MEN-Puffer
 50% (v/v) Formamid
 25% (v/v) Formaldehyd (37%)
 10% (v/v) Bromphenolblau (in Glycerin gesättigte Lösung)

2.7.5.2 Kapillartransfer von RNA

Vor dem eigentlichen Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde das FA-Gel zum Entfernen des Formaldehyds zweimal für je 15 min in DEPC- H_2O gewaschen und für 15 min in zehnfach konzentriertem Transferpuffer (0,15 M Natriumcitrat, 1,5 M NaCl; pH 7,0) äquilibriert. Anschließend wurde die elektrophoretisch nach Größe aufgetrennte RNA durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran (Hybond N+; Amersham) übertragen, indem zunächst eine Glasplatte brückenartig quer über eine mit zwanzigfach konzentriertem Transferpuffer SSC (0,3 M Natriumcitrat, 3,0 M NaCl; pH 7,0) gefüllte, längliche Plastikschale gelegt wurde. Drei breite, angefeuchtete Streifen Filterpapier (Whatman 3MM)

wurden über die Glasplatte gelegt, so dass sie luftblasenfrei der Glasplatte anhafteten und beide Enden in den Transferpuffer ragten. Das FA-Gel wurde auf der bedeckten Glasplatte positioniert und mit der zugeschnittenen Nylonmembran sowie mit drei angefeuchteten Filterpapieren (Whatman 3MM) gleicher Größe bedeckt. Jede Lage wurde mit Hilfe einer Glaspipette vorsichtig angerollt, etwaige Luftblasen wurden auf diese Weise entfernt. Nach Abdecken der Papierränder mit Frapanfolie wurde der Aufbau mit einem dicken Stapel Zellstoff bedeckt und mit einer Glasplatte und einem Gewicht (0,5 kg) beschwert. Durch die Saugwirkung des Papierstapels wird der Transferpuffer aus der Schale durch das Gel gesogen. Die durch den Pufferstrom mitgeführte RNA bleibt aufgrund ihrer negativen Ladung an der positiv geladenen Nylonmembran haften. Der Vorgang wurde über ca. 5-16 h durchgeführt; anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung („crosslinking“, UV-Stratalinker; Stratagene, LaJolla, Californien) kovalent auf der Membran fixiert. Der fertige Blot wurde entweder sofort weiter bearbeitet oder in Klarsichtfolie bei -20°C gelagert.

2.7.5.3 Hybridisierung mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Zur Hybridisierung mit cDNA-Sonden wurde die Nylonmembran mit der RNA-Seite nach innen glatt und luftblasenfrei in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt und zur Absättigung unbesetzter Membranbindungsstellen mit 20 ml Churchpuffer (CHURCH und GILBERT, 1984) 1,5 h bei 65°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Die radioaktiv-markierte cDNA-Sonde (200 ng) wurde 5 min bei 95°C denaturiert und zur Herstellung der Hybridisierungslösung mit 20 ml Churchpuffer (65°C) gemischt. Nach Abgießen der Prähybridisierungslösung wurde der Blot mit Hybridisierungslösung über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde am darauf folgenden Morgen entfernt und überschüssige sowie unspezifisch gebundene Sonde durch drei Waschschriffe (je 20 min) mit je 50 ml Waschpuffer I (40 mM NaHPO_4 , 1 mM EDTA, 5% (w/v) SDS; pH 7,2) bei 65°C entfernt. Anschließend wurde die Membran aus der Rollerflasche entnommen und im weiteren Verlauf bei RT in flachen Kunststoffschalen auf einem Schüttelplateau bearbeitet. Auf 5-minütiges Überspülen mit 50 ml Waschpuffer II (40 mM NaHPO_4 , 1 mM EDTA, 1% (w/v) SDS; pH 7,2) folgte ein zweiter Waschschriff von mindestens 20 min. Der noch leicht feuchte Blot wurde nach Einschlagen in Frischhaltefolie in einer Filmkassette fixiert und einem Röntgenfilm (Kodak BioMax MS Film) exponiert. Die Exposition erfolgte bei -70°C . Die Expositionszeiten richteten sich nach der Stärke der erhaltenen Signale (2-6 Tage). Um die Nylonmembran für weitere Hybridisierungen mit anderen cDNA-Sonden erneut zu nutzen, wurde die gebundene Sonde von der Membran entfernt, indem der Blot in „Stripp“-Puffermedium (0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, 10% (w/v) SDS, pH 7,0) kurz aufgekocht und anschließend für 1 h bei RT inkubiert wurde.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Proteinbestimmung

2.8.1.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blue G-250 bei einer Wellenlänge λ von 595 nm im Spektralphotometer bestimmt. Als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgerade diente entfettetes Rinderserumalbumin (BSA).

2.8.1.2 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Die spektrophotometrische Bestimmung des Proteingehaltes nutzt die Absorptionskoeffizienten von aromatischen Aminosäure-Seitenketten bei $\lambda = 280$ nm. Idealerweise ergibt sich der Absorptionskoeffizient ϵ eines Proteins additiv aus dem Beitrag dieser Aminosäuren im Protein. Diese Methode wurde hauptsächlich für die Quantifizierung synthetischer Peptide und Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 20 kDa angewandt. Zur Berechnung wurden die Anzahl der entsprechenden Aminosäuren im Peptid bzw. Protein sowie deren Extinktionskoeffizienten benötigt. Zu beachten ist, dass sich in der Lösung keine UV-absorbierende Substanz befindet.

Die Absorption der Proben (100 μ l) wurde in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Als Messpuffer wurde 5 mM Tris-HCl, pH 8,0 der Firma Löwe Biochemika, München verwendet. Die Homepage www.expasy.ch liefert mit dem Programm „ProtParam“ die Möglichkeit, Absorptionskoeffizienten für jedes Protein berechnen zu lassen.

2.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.8.2.1 Molekulargewichtsbestimmung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) kann sowohl zur Überprüfung der Proteinzusammensetzung einer Probe dienen, als auch zur effektiven Bestimmung von Molekulargewichten. In einer denaturierenden (SDS-)PAGE ist die Wandergeschwindigkeit eines Proteins nur proportional zur Größe des Proteins, unabhängig von dessen intrinsischer Ladung. Die Wandergeschwindigkeit der Proteine steht in linearer Beziehung zum Logarithmus des Molekulargewichts ihrer Untereinheiten. Vorhandene Disulfidbrücken in Proteinen wurden durch Zugabe von β -Mercaptoethanol (β -ME) zunächst reduziert und die Proteine durch Erhitzen in der Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert. Die Auflösefähigkeit von SDS-Gelen ist abhängig vom Grad der Vernetzung des Polyacrylamids.

2.8.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970)

Für Polypeptidketten mit einem größeren Molekulargewicht als 10 kDa wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen in Anlehnung an LAEMMLI (1970) bei konstanter Feldstärke durchgeführt. Die 10-15%igen Polyacrylamid-Trenngele wurden dabei nach der Polymerisation mit 5%igen Sammelgelen überschichtet. In die

Sammelgele wurden Taschen definierten Volumens durch Kunststoffkämme eingefügt. Die Proteinproben wurde mit ein- bis sechsfach konzentriertem SDS-Gelladepuffer (0,05% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 62,5 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,7 M β -Mercaptoethanol) versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Probenauftrag erfolgte die Trennung der Proteine bei einer konstanten Spannung von 120 Volt. Es wurden vertikale Gele verwendet (Mini Protean II, BioRad).

Als Puffermedium diente SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 4 mM SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3). Die Anfärbung der Polypeptide nach der diskontinuierlichen Elektrophorese erfolgte durch Inkubation in Färbelösung (0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 9% (v/v) Essigsäure, 45,5% (v/v) MeOH, 45% $H_2O_{bidest.}$) für mindestens 30 min. Der Gelhintergrund wurde durch Inkubation des Gels für mehrere Stunden in Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 45% (v/v) MeOH, 45% $H_2O_{bidest.}$) entfernt. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels Proteinstandard-Gemischen (z.B. Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, MBI Fermentas).

Tabelle 2.6: SDS-Gel-Ansätze mit verschiedenen Acryl/Bisacrylamidanteilen.

	Trenngel (20 ml)			Sammelgel (5 ml)
	10%	12%	15%	5%
H_2O_{bidest}	9,6 ml	8,6 ml	7,1 ml	3,6 ml
40% Acrylamid/Bis-Acrylamid	5,0 ml	6,0 ml	7,5 ml	0,63 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 + 0,4% SDS	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	—
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 + 0,4% SDS	—	—	—	0,68 ml
10% APS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,05 ml
100% TEMED	8 μ l	8 μ l	8 μ l	5 μ l

2.8.2.3. Densitometrische Analyse der Konzentrationen von Proteinen

Die Färbungsintensität von angefärbten Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen wurde densitometrisch quantifiziert (SpectraMaxPlus; SOFTmax Pro Version 3.0, BioRad).

Die Daten wurden mit dem Computerprogramm „Quantity One“ (Version 1.00, Bio-Rad) bearbeitet. Die Verteilung von Färbungsintensitäten jeder Fraktion wurde anhand der Pixelauswertung graphisch ermittelt, die Peakflächen wurden durch Integration berechnet. Die Konvertierung in μ g bzw. nmol Protein erfolgte mittels proteinspezifischen Kalibrierungskurven. Die Stöchiometrie der Bindungen zwischen Aktin bzw. Tubulin und den cytosolischen Proteinbindedpartnern konnte aus dem Verhältnis der Peakflächen zu den jeweiligen molekularen Massen der Proteine ermittelt werden.

2.8.2.4 Harnstoff-Gelelektrophorese

Alkalische Harnstoffgele wurden verwendet, um die Unterschiede im Laufverhalten von rekombinantem SUS-Protein (SuSy-wt und C352S) nach Alkylierung von Sulfhydryl-

Gruppen (2.18) zu visualisieren. Hierfür wurden horizontale Gele (15 cm x 18 cm) verwendet. Trenngel, Sammelgel und Probenpuffer waren frei von SDS und enthielten 8 M Harnstoff. Sämtliche Puffer wurden stets frisch angesetzt. Die gefällten Proben wurden vor dem Gelauftrag mit Probenpuffer bei RT inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 20 h bei 4°C mit 200 Volt (10 mA). Die Färbung und Entfärbung wurde wie bei SDS-Gelen (Coomassie) (2.8.2.2) durchgeführt.

Trenngel (30 ml)	10%	7,5%
3 M Tris-HCl, pH 8,8	3,75l ml	3,75 ml
40% Acrylamid/Bis-Acrylamid	7,5 ml	5,625 ml
10% APS	225 µl	225 µl
100% TEMED	15 µl	15 µl

+8 M Harnstoff = 14,41g für 30 ml zugeben, lösen und mit H₂O auf 30 ml auffüllen.

Sammelgel (20 ml)	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	5 ml
40% Acrylamid/Bis-Acrylamid	1,875 ml
10% APS	375 µl
100% TEMED	15 µl

+8 M Harnstoff = 9,6 g für 20 ml zugeben, lösen und mit H₂O auf 30 ml auffüllen.

Probenpuffer für Harnstoffgele:

20 mM Tris-HCl, pH 6,8 + 8 M Harnstoff + Bromphenolblau (1 mg/ 10 ml Probenpuffer)
Die Proben (gefällt) werden in ca. 20 µl Probenpuffer aufgenommen.

Laufpuffer für Harnstoffgele:

3 g Tris + 14,4 g Glycin auf 1 l mit H₂O auffüllen (pH = 8,3)

2.8.3 Immunologische Methoden

2.8.3.1 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS-Gel bei 100 mA über Nacht im Nass-Transfer-Verfahren auf Immobilon-P-Membranen (PVDF Membran, BioRad) oder Nitrozellulosemembranen elektrotransferiert. Zur Optimierung des Proteintransfers wurden die Membranen und das Filterpapier in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) MeOH) 20 min inkubiert. PVDF-Membranen wurden vor dem Blotten für 1 in in MeOH inkubiert. Zur reversiblen Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Membranen in Ponceau-S Lösung 1 min bei RT inkubiert und anschließend mit H₂O_{bidest} gespült. Zur Suppression unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membranen nach kurzem Anfeuchten in TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blocking-Puffer (TBS mit 3% (w/v) BSA) inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (Tabelle 2.7) erfolgte für 1-4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in den angegebenen Verdünnungen. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit TBS wurde der Blot für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde je nach Detektionsmethode unterschiedlich mit Blockingpuffer verdünnt. Der resultierende Immunkomplex konnte mit sekundären Antikörpern, an die Peroxidase (HRP) oder

Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, detektiert werden (2.8.2.3 und 2.8.2.4). Wurden AP- oder HRP-konjugierte Primärantikörper verwendet, erfolgte die Detektion direkt.

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Beschreibung	Bezugsquelle & Referenz	Verdünnung
Primäre Antikörper			
Anti-SuSy	Antikörper gegen nativ gereinigte SUS (<i>Z. mays</i>), polyklonal aus Kaninchen	BioScience, Göttingen (D. Holtgräwe)	1:1.000 1:10.000
Anti-SuS3	Antikörper gegen rek. SuS3, polyklonal aus Kaninchen	Inno-Train, Spechbach (D. Holtgräwe)	1:10.000
Anti-SuS-ct	Antikörper gegen SuS-ct-Peptid, monoklonal aus Kaninchen	Huber, S.C., Raleigh	1:5.000
Anti-Ser-15	Antikörper gegen phosphoryliertes Serin am N-Terminus von SUS1, monoklonal aus Kaninchen	Huber, S.C., Raleigh	1:50.000
Anti-GAPDH-A.th	Antikörper gegen rek. GAPDH (<i>A. thaliana</i>), polyklonal aus Kaninchen	Inno-Train, Spechbach (B. Altmann)	1:5.000
pSer	Rabbit anti-Phosphoserin PAD Poly-Z-PS1	ZYTOMED, Berlin	1:5.000
Penta-His	Penta-His-HRP-Konjugat	Qiagen, Hilden	1:2.000
Biotin	Anti-Biotin-HRP-Konjugat, Clone BN-34, monoklonal aus Maus	Sigma-Aldrich, A0185	
Sekundäre Antikörper			
Anti-Rabbit-HRP	Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat aus Ziege	BioRad, # 170-6515	1:3.000 1:12.500
Anti-Rabbit-AP	Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat aus Ziege	Sigma-Aldrich A3687	1:30.000
Anti-Mouse-AP	Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat aus Ziege	Sigma-Aldrich A3562	1:10.000 1:30.000

2.8.3.2 Immunchemische Detektion durch Chemilumineszenz (ECL)

Das entsprechende (sekundäre) Antikörperkonjugat wurde 1:12.500 mit Blocking-Puffer verdünnt und 90 min bei RT mit der Membran inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde die Membran zweimal mit TBS-Puffer und zweimal mit TBST-Puffer (0,1% (v/v) Tween 20 in TBS) bei RT jeweils für 10 min auf einem Schüttler (150 Upm). Nach dem Waschen in PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM, KH₂PO₄, pH 7,4) erfolgte die Detektion von HRP-Konjugaten durch das Chemilumineszenzsubstrat „ECL™ Western Blotting Detection Reagents“ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) entsprechend der Anweisung des Herstellers. Zur Visualisierung wurden ausschließlich Filme, Entwickler und Fixierlösungen der Firma Kodak nach Herstellerangaben verwendet. Die Expositionszeiten betragen 0,5 bis 5 min.

2.8.3.3 Immunologischer Proteinnachweis durch Farbreaktionen

Alternativ zur ECL-Methode konnten Antikörperbindungen über eine Farbreaktion visualisiert werden. Die Enzyme, Alkalische Phosphatase (AP) und Meerrettich-Peroxidase (HRP), die als Antikörperkonjugat vorliegen, können mit relativ großer Geschwindigkeit ein zugegebenes

farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt umsetzen. Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität der beiden Enzyme muss die Detektion der Immunkomplexe mit unterschiedlichen Färbelösungen erfolgen. Dem jeweiligen Antikörperkonjugat entsprechend wurden die Membranen (Nitrocellulose oder PVDF) nach der Inkubation mit dem Antikörper (2.4.5) solange bei RT in AP- oder HRP-Färbelösung inkubiert, bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden. Durch Waschen der Membran in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurde die Farbreaktion gestoppt. Pro Membran (ca. 8,5 x 5,5 cm) wurden 20-30 ml Färbelösung verwendet.

AP-Färbelösung: 100 mM Tris-HCl, pH 8,8
100 mM NaCl
5 mM MgCl_2

Substrat der Färbelösung frisch zugeben

37,5 $\mu\text{g/ml}$ NBT in 70% DMF
150 $\mu\text{g/ml}$ BCIP in 100% DMF

HRP-Färbelösung: 20 ml 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
20 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 5 ml MeOH
15 μl H_2O_2 (37%)

2.8.3.4 „Strippen“ von Blotmembranen

PVDF-Blotmembranen, die bereits für eine Immuninkubation mit anschließender Detektion der Immunkomplexe mittels der ECL-Technik benutzt wurden, konnten für weitere Immuninkubationen mit anderen Primärantikörpern benutzt werden. Dazu wurden die Antikörperkomplexe mit Stripping-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7) von dem Blot entfernt. Die Membran wurde mit 50 ml Stripping-Puffer für 30 min bei 50°C unter Schwenken inkubiert. Nach zwei anschließenden Waschrufen bei RT mit PBS, wurden erneut für mindestens 60 min mit Blocking-Puffer (2.8.3.1) unspezifische Bindekapazitäten der Membran abgesättigt. Anschließend wurde eine neue Immuninkubation mit den gewünschten Primärantikörpern und der Detektion mit Hilfe des ECL-Systems durchgeführt. Dieses sogenannte „Strippen“ der Blotmembranen konnte mehrfach (bis zu 4 Mal) wiederholt werden.

2.8.3.5 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Für die Auftrags-Immunisierung eines Kaninchens zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen das SuS3-Protein aus *Zea mays* wurde das Antigen rekombinant in *E. coli*-Zellen produziert (2.8.4.1) und mittels Affinitätschromatographie (2.8.4.3) gereinigt. Etwa 500 μg gereinigtes und denaturiertes Protein wurde über ein SDS-PAGE aufgetrennt und gleichzeitig von etwaigen Metallionen befreit. Das SDS-Gel wurde für 20-60 min in 4 M Na-Acetat inkubiert. Dabei blieben die Proteinbanden klar, während proteinfreie Gelbereiche trübe wurden. Die korrespondierende SuS3-Proteinbande wurde ausgeschnitten, zu aliquoten Anteilen von je ca. 150 μg in E-Cups überführt und als Antigen zur Immunisierung gemäß dem „2-Monatsprotokoll“ durch die Firma Inno-Train (Kronberg/Taunus) einem Kaninchen

subcutanintra-dermal injiziert. Die erhaltenen Immunsereen der ersten, zweiten und dritten Blutung sowie das Präimmunsereum wurden hinsichtlich ihrer Immunreaktion durch Western-Blotting getestet. Ein polyklonaler Antikörper gegen nativ gereinigtes SUS-Protein stand aus meiner Examensarbeit zur Verfügung.

2.8.3.6 Adsorption unspezifischer Bindungsstellen polyklonaler Antiseren

Die durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen polyklonalen Antiseren wurden zur Erhöhung ihrer Spezifität mit Gesamtprotein aus *E. coli* adsorbiert. Das zur Adsorption unspezifischer Bindungsstellen eingesetzte Zellmaterial wurde zuvor hitzedenaturiert.

Verarmen des SuS3-Antiserums mit *E. coli*-Proteinen

Zur Erhöhung der Spezifität des Antiserums Anti-SUS3 wurde konzentriertes *E. coli*-Zelllysate einer 500 ml Kultur mit überexprimiertem SuS1-Protein sowie überexprimiertem pRSET-B-Plasmidkonstrukt als Verarmungskultur verwendet (2.8.4.1) Die Zellanzucht, Expressionsinduktion und Zellernte erfolgten wie unter 2. 8.4.2 beschrieben. Die erhaltenen Sedimente wurden in 50 ml PBS resuspendiert, die Proteine für 20 min hitzedenaturiert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 10.000g). Das Pellet wurde in 1 ml PBS mit 100 µM Pefabloc SC aufgenommen. Je 100 µl homogenisiertes Proteinpellet wurden mit 1 ml SuS3-Serum über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten die denaturierten Proteine mit den adsorbierten Antikörpern abzentrifugiert werden (10 min, 10.000g). In der löslichen Überstandsfraktion sollten lediglich die Antikörper gegen das Zielprotein SUS3 verbleiben. Derart verarmtes Serum wurde aliquotiert, teilweise mit Na-Azid (0,02%) versetzt und bei -20°C gelagert.

2.8.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um einen Enzym-gekoppelten Immunoassay (EIA), mit dessen Hilfe geringste Mengen an Antigenen oder Antikörpern quantifiziert werden können. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Antigenen und Antikörpern, die durch eine Enzym-katalysierte Chromogenumwandlung sichtbar gemacht wird. Das lösliche und farblose Chromogen wird zu einem löslichen und gefärbten Farbstoff umgesetzt, der sich photometrisch quantifizieren lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sogenannte indirekter ELISA in 96-Loch-Mikrotiterplatten (MaxiSorp™, Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Die in den zu untersuchenden Proben enthaltenen Antigene wurden an die feste Phase gebunden und mit primären Antikörpern inkubiert. Falls zwischen dem fixierten Antigen auf der Platte und dem Antikörper eine Bindung statt, wurde dieser ebenfalls an die Platte gebunden. Diese Reaktion wurde durch Inkubation mit einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper, dem Konjugat, nachgewiesen. Nach Substratzugabe katalysierte das am Sekundärantikörper gekoppelte Enzym (HRP oder AP) die mit einem Farbumschlag des farblosen Substrates verbundene Reaktion, welche in einem Photometer quantifiziert wurde. Als Festphase

wurden beschichtete Mikrotiterplatten (Nunc) verwendet. Dabei wurde das Antigen über Wechselwirkungen zwischen polaren Gruppen und dem Polystyren der Festphase gebunden.

ELISA-Optimierung

Für die Bestimmung der optimalen Antigenmenge zur Beschichtung von 96-Loch-Mikrotiterplatten sowie zur Ermittlung der geeigneten Verdünnungen von Antiserum (Negativ- und Positivserum) und Konjugat wurden alle drei Komponenten durch Schachbrett-Verdünnung (Abb. 2.2) gegeneinander titriert. Maximal zwei Reagenzien können durch Schachbrett-Verdünnung gegeneinander austitriert werden. Die Reagenzien wurden in verschiedenen Richtungen ggf. über die gesamte Platte in beliebigen Verdünnungsschritten verdünnt. Im ersten Schritt wurde ein Reagenz mit einer Mehrkanalpipette von Säule 1 zu Säule 11 verdünnt. Nach Inkubation und Entfernung des ersten Reagenz wurde das zweite Reagenz von Reihe A zu Reihe G verdünnt. In Säule 12 und Reihe H wurde nur Verdünnungspuffer bzw. Kopplungspuffer pipettiert (Kontrollen). Durch diese Art der Verdünnung konnte diejenige Kombination der gegeneinander titrierten Reagenzien bestimmt werden, bei der die höchste Extinktion bei gleichzeitig geringer Hintergrundfärbung gemessen wurde.

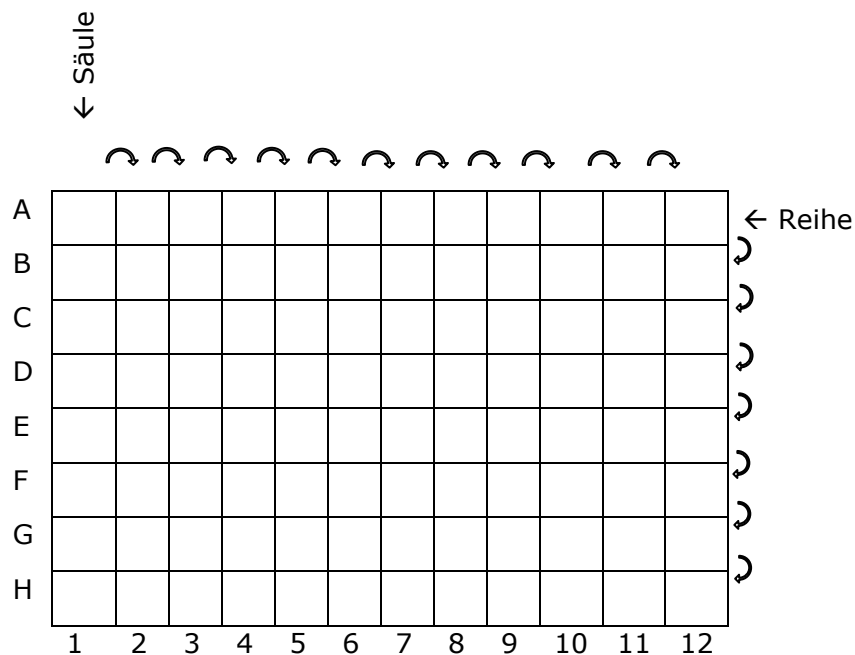


Abb. 2.2: Schachbrett-Verdünnung in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte.

Die Buchstaben A bis H bezeichnen die waagrecht verlaufenden zwölf Vertiefungen einer Reihe. Die acht senkrecht angeordneten Vertiefungen werden zu Säulen zusammengefasst und von 1 bis 12 durchnummeriert. Die Verdünnungsrichtung der zwei Reagenzien ist durch die Pfeile dargestellt.

Um unspezifische Reaktionen festzustellen, wurden bei den Vorversuchen verschiedene Kontrollen mitgeführt:

1. Antigen-Kontrolle: ohne Serum
2. Serum-Kontrolle: ohne Antigen
3. Konjugat-Kontrolle: ohne Antigen und ohne Serum
4. Substrat-Kontrolle: ohne Antigen, ohne Serum und ohne Konjugat

Titration von Antigen und Antiserum

Im Folgenden wird exemplarisch die Titration von SUS-Antigen und SUS-Antiserum dokumentiert. Das SUS-Antigen wurde in Verdünnungsschritten von 1:2 verdünnt. In die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden in die Säulen 1-8 je 100 µl Kopplungspuffer pipettiert. Die Säulen 9-12 blieben leer. Aus rekombinantem, affinitätsgereinigtem SUS1-Protein und Kopplungspuffer wurde eine Antigen-Stammlösung (0,2 µg/µl) hergestellt, von der je 100 µl (20 µg) in die acht Vertiefungen der Säule 1 pipettiert wurden. Nach Mischen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden mittels einer 8-Kanal-Mehrfachpipette jeweils 100 µl von der ersten Säule in die zweite Säule überführt. Die Probe wurde mit dem in dieser Säule vorgelegten Kopplungspuffer durchmischt und wiederum 100 µl Probe einer jeden Vertiefung in die acht Vertiefungen der dritten Säule pipettiert. Nach diesem Schema wurde das Antigen in Verdünnungsschritten von 1:2 bis zur sechsten Säule weiter verdünnt. Aus Säule 6 wurden 100 µl je Vertiefung verworfen. In Säule 7 und 8 wurde kein Antigen pipettiert. Die Säule 7 diente der Serum-Kontrolle und Säule 8 der Substrat-Kontrolle. Nach Kopplung der Proben über Nacht bei 4° und 3x fünfminütigem Waschen mit Waschpuffer (PBST) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 200 µl Blockierpuffer (3% BSA in PBST) je Vertiefung und 60-minütiger Inkubation bei 37°C abgesättigt. Das vor bzw. nach der Immunisierung des Kaninchens gewonnene Negativserum (NS bzw. Präimmunserum) bzw. Positivserum (PS bzw. 3. Immunserum) wurde analog zum Antigen über die Platte verdünnt. Dazu wurden erneut 100 µl Kopplungspuffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, wobei Reihe A und B und die Säulen 11-12 ausgespart wurden. Anschließend wurden je 200 µl einer 1:10 Verdünnung in die ersten sieben Vertiefungen von Reihe A pipettiert. 100 µl verdünntes Serum wurden direkt wieder entnommen, in Reihe B überführt und mit dem vorgelegten Puffer gemischt. Diese Verdünnung wurde bis zu Reihe G fortgeführt. Von den Vertiefungen dieser Reihe wurden jeweils 100 µl verworfen. In Reihe H wurde nur Kopplungspuffer pipettiert (= Antigen-Kontrolle). Nach Inkubation von 2 h bei 37°C wurden die Platten 3x mit PBST gewaschen; restlicher Puffer wurde durch Dekantieren und Ausklopfen entfernt und 100 µl des AP-konjugierten, Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers (1:30.000 verdünnt) wurde in die Vertiefungen gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. In Säule 8 wurde lediglich Kopplungspuffer gegeben (= Substrat-Kontrolle). Die Konjugat-Kontrolle erfolgte in den Vertiefungen H8 und H9. Die Platten wurden erneut 3x mit PBST und zur Äquilibration einmal mit Detektionspuffer gewaschen. In sämtliche Vertiefungen wurden 75 µl von der BCIP-Substratlösung pipettiert. Die Platten wurden für 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 75 µl Na-EDTA (2% Na-EDTA in H₂O) gestoppt und im ELISA-Mikrotiterplatten-Reader mit dem Programm SOFTmax-Pro 3.0 bei einer Wellenlänge von 630 nm ausgewertet. Durch die graphische Auftragung der Antigenmenge gegen das Absorptionssignal (optische Dichte)

konnte der lineare Bereich der Immunreaktion determiniert und eine Standardkurve des Serums generiert werden.

Kopplungspuffer:	0,795 g	Na ₂ CO ₃
	1,46 g	NaHCO ₃
In 500 ml H ₂ O lösen, ~ pH 9,6		
PBS: (pH 7,4)	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
PBST	0,01%	(v/v) Tween-20 in PBS
Detektionspuffer:	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
BCIP-Stocklösung:	50 mg/ml Bromo-Chloro-Indolylphosphat (BCIP) in 100% DMF	
Substratlösung:	35 µl BCIP-Stocklösung auf 10 ml Detektionspuffer	

2.8.3.8 Untersuchung von Co-Pelletierungsfractionen

Von den Pellet- und Überstandsfractionen der Aktin-Co-Pelletierungsversuche (2.10.2) wurden je 30 µl bzw. 50 µl mit Kopplungspuffer auf ein Volumen von 200 µl verdünnt. Die Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen („wells“) wurden zur Gewährleistung gleichmäßiger Leerwerte vor dem Beschichten im Reader analysiert. In die Vertiefungen der Platte wurden bis auf Säule 1 je 100 µl Kopplungspuffer vorgelegt. Die Beschichtung der Platten erfolgte, indem in die Säule 1 der Reihen A bis G je 200 µl der verdünnten Co-Pelletierungsproben pipettiert wurden. Die Säule 1 der Reihe H (H1) wurde mit 200 µl BSA-Lösung (1 µg/µl) befüllt. Jeweils 100 µl von der ersten Säule wurden in die zweite Säule pipettiert, mit dem vorgelegten Kopplungspuffer gemischt und wie unter 2.8.3.7 beschrieben bis Säule 11 sukzessive 1:2 verdünnt. Die Kopplung des Proteins an die Adsorptionsfläche erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach Waschen mit PBST (3x5 min) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 200 µl Blockierpuffer je Vertiefung und 60-minütiger Inkubation bei 37°C gesättigt. Nach gründlicher Entfernung des Blockierpuffers wurden die „Wells“ mit 100 µl Immuns Serum (Anti-SuSy 1:10.000 verdünnt) überschichtet und 2 h lang bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 100 µl des AP-konjugierten, anti-Spezies-IgG-Sekundärantikörpers zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die weiteren Wasch-, Äquilibrierungs- und Detektionsschritte erfolgten identisch zu 2.8.3.7. Für die Serum-Kontrolle wurden die Seren in Doppelansätzen in nicht mit Antigen beschichtete Vertiefungen pipettiert. Zusätzlich wurden Antigen- und Konjugat-Kontrollen in Doppelansätzen durchgeführt. Da die Extinktion der Substrat-Kontrolle in den Vorversuchen sehr gering war, wurde diese in den Hauptversuchen nicht mehr mitgeführt.

2.8.3.9 Sandwich-ELISA

Zur Verifizierung und Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurde der Sandwich-ELISA, als erweiterte Form des ELISAs angewandt. Potentielle Protein-Bindepartner können bei dieser Methode im Gegensatz zum Overlay nativ an eine Oberfläche gekoppelt werden. Die Reihe A einer Mikrotiterplatte wurde zunächst mit 10 µg Protein (Tubulin, Aktin, cGPx, HVR, SuSy-wt und BSA) in 200 µl Kopplungspuffer befüllt. Die Säule 12 wurde lediglich mit Kopplungspuffer ohne Protein befüllt. Die Belegung der einzelnen Säulen ist in Abb. 2.3 dargestellt. Die Vertiefungen der Reihen B-H wurden mit 100 µl Kopplungspuffer bestückt. Die Probenverdünnung erfolgte von Reihe A zu Reihe H immer im Verhältnis 1:2 wie unter 2.8.3.7 beschrieben. Die Proteinkopplung, das Waschen sowie die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte identisch zu 2.8.3.7. Anschließend wurden die Säulen 1 bis 5 und Säule 12 mit 100 µl SUS1-Proteinlösung (0,1 µg/µl in PBS) befüllt (Positivproben). In die Säulen 5-11 wurden zur Antigen-Kontrolle des ersten Bindepartners je 100 µl PBS ohne Protein pipettiert (Negativproben). Nach Inkubation für 2 Stunden bei RT wurde die Platte erneut gewaschen und blockiert. Die Inkubation dem primären und sekundären Antikörper (Anti-SuSy (1:10.000), goat anti-rabbit-IgG) sowie Entwicklung und Detektion der Farbreaktion erfolgte identisch zu 2.8.3.7. Aus der Differenz der OD der jeweiligen Positiv- und Negativprobe konnte das Bindeverhältnis ermittelt werden.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	Aktin (Kaninchenmuskel)	C3	C4	C5	C6	Aktin (Kaninchenmuskel)	C8	C9	C10	C11	C12
Tubulin (Rinderhirn)		BSA (Fraktion V)	cGPx (rec. Mais)	CesA-HVR (rec. Mais)	Tubulin (Rinderhirn)		BSA (Fraktion V)	cGPx (rec. Mais)	CesA-HVR (rec. Mais)	SuSy (rec. Mais)	Antiserum-Kontrolle
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Positivproben					Negativproben						

Abb. 2.3: Belegung der Mikrotiterplatte mit Positiv- und Negativproben des Sandwich-ELISAs.

2.8.4 Extraktion und Reinigung nativer und rekombinanter Proteine

2.8.4.1 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Für die Induktion der heterologen Expression verschiedener Proteine wurden die Konstrukte SuSy-wt (und Mutanten), SuS3-pRSET-B, cGPx-pRIBA1, GAPDH2-pet16b, EnoII-pRSET, Alf-IBA-3 und HVR-pRSET-C in *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen transformiert (2.4.1.1) und in einer 5 ml Vorkultur selektiv über Nacht angezogen. Selektives LB-Medium (50-500 ml) wurde mit 1% (v/v) Vorkultur angeimpft und bei 37°C aerob bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert. Die Expression der heterologen Proteine wurde durch Zugabe von 0,3–1 mM IPTG induziert. Nach der Induktion wuchsen die Bakterienkulturen bei 25-30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,6-2,0. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (5.000g, 4°C, 20 min). Das Zellpellet wurde direkt weiterverwendet oder bei -70°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Analysiert wurde die Expression über SDS-PAGE (2.8.2.2). Dazu wurden 1 ml-Aliquots von der Kultur während der Expression entnommen, pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in H₂O_{bidest} resuspendiert. Die mit SDS-Probenpuffer denaturierten Fraktionen wurden auf SDS-Gele aufgetragen.

2.8.4.2 Herstellung von Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Zur Herstellung des *E. coli*-Zellextraktes wurde das Zellpellet in 1/10 Volumen der Ausgangskultur LEW-Puffer mit Lysozym (1 mg/ml) und Pefabloc (100 µg/ml) aufgenommen, 30 min auf Eis und weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend folgten Sonifizierungsschritte auf Eis mit 2-5 x 60 s (50% Microtip). Der Zellextrakt wurde zwischen den Sonifizierschritten für 1 min auf Eis abgekühlt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden zentrifugiert (10.000g, 4°C 30 min). Für die Affinitätsreinigung löslicher rekombinanter Proteine (SuSy-wt, SuS3, cGPx, GAPDH, Enolase 2) sowie zur Analyse löslicher Zellproteine wurde der Überstand (geklärter Rohextrakt) verwendet. Das Pellet mit unlöslichen Zellbestandteilen und unlöslichen Proteinen in Einschlusskörpern wurde für die Reinigung von rekombinanter Cesa-HVR verwendet.

LEW-Puffer : pH 8,0 (NaOH)
 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl

2.8.4.3 Proteinreinigung über IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography)

Proteinreinigung über His-tag-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung heterolog in *E. coli* exprimierter Proteine, die mit einem Poly-Histidin-tag (His-tag) ausgestattet sind, erfolgte mit dem „Protino® Ni 2000 prepacked columns kit“ (Macherey & Nagel) sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen nach Herstellerangaben. Alternativ zu diesen Nickel-TED-Säulen wurden die Proteine über Nickel-NTA-Säulen (Qiagen) von Fremdproteinen abgetrennt.

Als Vorbereitung für die Chromatographie wurden die heterolog in den *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen exprimierte Proteine durch enzymatische Lyse der Bakterienzellwände und Sonifizierungsschritte freigesetzt (2.8.4.2). Der geklärte Rohextrakt wurde auf die mit Nickelsulfat beladenen und äquilibrierten Säulen gegeben. His-tag erweiterte Fusionsproteine wurden an spezifische Nickel-Bindestellen der Säulenmatrix gebunden, während andere Proteine und Verunreinigungen durch Waschschriffe entfernt werden konnten. Die Elution der His-tag-Proteine erfolgte mit Hilfe eines Imidazolgradienten in LEW-Puffer. Die einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Reinheit analysiert. Die Reinigungsschritte erfolgten bei 4°C. Die Reinigung von Proteinen aus Einschlusskörpern (HVR) erfolgte in Anwesenheit von 6 M Harnstoff in allen verwendeten Puffern.

Proteinreinigung über Strep-tag-Affinitätschromatographie

Die Proteinreinigung über Strep-tag-Affinitätschromatographie wurde mit dem „Two-Step Affinity Purification System“ (Qiagen) nach dem Qiagen-Protokoll „Batch Purification of His-Strep-tagged Proteins Using Strep-Tactin Superflow“ durchgeführt. Die Methode beruht auf Kopplung eines Proteins über die Strep-tag II-Sequenz an die Strep-Tactin-Matrix. Nach einigen Waschschriffen wird die Elution der Proteine durch die spezifische Konkurrenz durch Desthiobiotin ermöglicht. Dazu wurde geklärter Rohextrakt der cGPx-Expressionskultur mit 2 ml Säulenmatrix (*Strep-Tactin Superflow Resin Suspension*, Qiagen) vermischt und 1 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde die Suspension auf eine leere Säule übertragen. Nach Sedimentation und Waschen der proteinbeladenen Matrix wurde das spezifisch gebundene cGPx-Protein mit 6-8 x 0,5 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen und analysiert. Als Vorbereitung auf eine erneute Reinigung wurde die Matrix regeneriert. Durch den Einsatz von 4-Hydroxyazobenzyl-2-Carboxylsäure (HABA) wird das Desthiobiotin von der Säule gelöst und ausgewaschen.

2.8.4.4 Entfernen des His-tags von Fusionsproteinen durch Enterokinase

Die verwendeten pRSET-Expressionsvektoren verfügen über eine Enterokinase-Schnittstelle. Die hierfür codierende Sequenz ist N-terminal des His-tags und C-terminal der Klonierungsstelle lokalisiert, so dass Fusionsproteine nach der Expression und Affinitätsreinigung von der Polyhistidinsequenz befreit werden können. Um den Einfluss des His-tags auf katalytische sowie assoziative Eigenschaften der rekombinanten Proteine (Susy-wt und Mutanten, SuS3) zu untersuchen, wurde dieser mit Hilfe von rekombinanter Enterokinase (rEK) entfernt. Hierfür wurde das „Enterokinase Cleavage Capture Kit“ (Novagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation von je 1 mg SUS-Protein mit 25 U rEK erfolgte für 20 h bei 25°C. Nach dem Entfernen der rEK durch EKapture Agarose und Filtrationsäulen wurde die Effizienz des Enterokinaseverdauens mittels SDS-PAGE

überprüft. Kontrollproben wurden über den gleichen Zeitraum bei 25°C, jedoch ohne rEK, aufbewahrt.

2.8.4.5 Herstellung von Rohextrakt aus *Z. mays*

Verschiedene Pflanzengewebe (Wurzel, Spross und Blatt) wurden mit einer Rasierklinge geerntet, zerkleinert und in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Pro g Frischgewicht (FW) wurden 4 ml Puffer E (2.8.4.6) zugegeben. Nach dem Auftauen bei RT wurden die Proben in E-Cups überführt und zentrifugiert (4°C, 30 min, 10.000g). Der Überstand wurde direkt verwendet oder gegebenenfalls in einer SpeedVac-Zentrifuge durch Verdampfen (ca. 100 µl/h) eingeeengt.

2.8.4.6 Reinigung nativer Saccharose-Synthase aus *Zea mays*

Extraktion der löslichen Saccharose-Synthase

Für die Reinigung nativer Saccharose-Synthase (SUS) wurden lediglich junge, in der Wachstumsphase befindliche Blätter von 4-8 Wochen alten Maispflanzen verwendet (2.2). Diese nicht-grünen Blätter der Elongationszone waren als „Sink“-Gewebe anzusehen. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C unter Verwendung von entgasten und filtrierten (0,2 µm) Puffern durchgeführt. Maisgewebe mit einem Frischgewicht (FW) von 50-100 g wurden unter flüssigem Stickstoff zu feinem Puder gemörsert und mit zwei Volumina (v/w) Extraktionspuffer (Puffer E) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch vierlagigen Mull und zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) filtriert. Zur Sedimentation von Zelltrümmern wurde der Rohextrakt zentrifugiert (20 min, 10.000g, Sorvall, RC5B, Rotor SS34). Der Überstand (geklärter Rohextrakt) wurde durch Ultrazentrifugation (70 min, 100.000g, Kontron München, Beckman) in zwei Fraktionen aufgetrennt. Das Pellet enthielt die microsomale Membranfraktion sowie Komponenten des pflanzlichen Cytoskeletts. Der Überstand, die „lösliche Fraktion“, enthielt die nicht-membrangebundene, lösliche Saccharose-Synthase.

Puffer E:	100 mM	MOPS, pH 7,5,
	100 mM	Saccharose
	10 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	CaCl ₂
	1 mM	EDTA
	2 mM	DTT _{red}
	20 mM	NaF
	1 mM	PMSF
	1%	(v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, P9599)
	0,1 g/g FW	Polyvinylpyrrolidone (unlöslich)

Fraktionierung durch Ammoniumsulfat-Fällung

Zur ersten Anreicherung der Saccharose-Synthase sowie zur Vorfällung und Abtrennung von Fremdproteinen wurde die „lösliche Fraktion“ der Ultrazentrifugation unter ständigem Rühren auf Eis mit Ammoniumsulfat auf 25% der Sättigung (d.S.) eingestellt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 20.000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34) wurde die

Ammoniumsulfatkonzentration des Überstandes auf 40% d. S. erhöht. Das nach erneuter Zentrifugation sedimentierte Protein wurde in 15 ml Dialysepuffer (50 mM MOPS, pH 7,5, 50 mM Saccharose, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT_{red}) aufgenommen und zum Entfernen des Ammoniumsalzes zweimal für mindestens 1 h gegen je 1,5-2 l Dialysepuffer dialysiert.

Ionenaustausch-Chromatographie über Resource Q (FPLC)

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie werden die Proteine nach ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt. Die Proteinsuspension wurde zum Entfernen der während der Dialyse denaturierten Proteine erneut zentrifugiert (30 min, 20.000g) und vor dem Auftragen auf die Anionenaustauschersäule (FPLC/Resource Q, 15 ml, Merck) sterilfiltriert (0,22 µm). Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Dialysepuffer erfolgte der Probenauftrag über einen 10 ml „Sample-Loop“ mit einer Fließgeschwindigkeit von 2ml/min (Pharmacia LKB, Pump P-500). Mit 50 ml Puffer A (50 mM MOPS pH 7,5, 50 mM Saccharose, 2 mM DTT_{red}) wurden anschließend unspezifische Bindungen von der Matrix gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B (PufferA + 1 M NaCl) durch einen linearen Salzgradienten von 0-500 mM NaCl mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluss-UV-Detektor (BioRad) des Econo-Systems (BioRad). Fraktionen zu je 1,5 ml wurden im Fraktionssammler (Pharmacia LKB, RediFrac) aufgefangen. In den einzelnen Fraktionen wurde das Proteinmuster mittels SDS-PAGE (2.8.2.2) analysiert und die spezifische Aktivität der Saccharose-Synthase (2.9.1) bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Enzymaktivitäten wurden vereinigt, zum Entfernen des Salzes erneut dialysiert oder einer Gelpermeationschromatographie (2.8.4.7) unterworfen und zentrifugiert. Für nachfolgende Versuche wurde das teilgereinigte Protein mit Centricon YM-30 (Millipore; Bedford) eingengt und mit 20 mM NaF (Endkonzentration) versetzt.

2.8.4.7 Gelpermeationschromatographie über Sephadex G25

Zur Überführung von Nukleinsäuren oder Proteinen in ein anderes Puffermedium bei gleichzeitiger Entsalzung wurden Gelfiltrationssäulen Sephadex G-25 (Nap 5 und Nap 25, Pharmacia) eingesetzt. Äquilibrierung, Probenauftrag und Elution erfolgte nach Herstellerangaben.

2.8.4.8 Extraktion und Isolierung von Tubulin

Tubulin wurde durch mehrere Assemblierungs- und Disassemblierungszyklen aus dem cytosolischen Rinderhirnextrakt angereichert. Aus der angereicherten MAP-Mikrotubuli-Fraktion wurde Tubulin über eine anschließende Ionenaustausch-Chromatographie an einer Phosphocellulose-Säulenmatrix abgetrennt (in Anlehnung an MANDELKOW et al., 1985). Ein Kilogramm, unmittelbar nach der Schlachtung entnommene Rinderhirnhälften wurden auf Eis von Blutgefäßen und Hirnhaut befreit und in acht einzelnen Portionen in Eis eingebettet. Je 150 g wurden nach Zugabe von 105 ml Puffer PB einschließlich 1 mM ATP und 0,5 mM

GTP in einem Küchenmixer (Braun) auf höchster Stufe dreimal für je 15 s homogenisiert und anschließend zentrifugiert (GSA-Rotor, 23.400g, 4°C, 90 min). Der Überstand (cytosolischer Extrakt) wurde für die erste Mikrotubuli-Assemblierung unter Rühren mit 25% (v/v) Glycerin (Endkonzentration) und 0,5 mM GTP (Endkonzentration) versetzt. Danach wurde das Gemisch im Wasserbad bei 37°C für 40 min unter leichtem Schütteln inkubiert, um das dimere Tubulin zu Mikrotubuli zu polymerisieren bzw. assemblieren. Die Mikrotubuli wurden anschließend bei 37°C durch zweistündige Zentrifugation sedimentiert (48.000g, vorgewärmte Rotoren, Zentrifugen und Gefäße; Beckman-Rotor TI 45). Für die anschließende Disassemblierung, wurde der Überstand der Zentrifugation vorsichtig dekantiert und das Pellet auf Zellstoff leicht abgetropft. Die acht Sedimente wurden vereinigt und mit 150 ml eiskaltem Puffer PB einschließlich 1 mM GTP im Glashomogenisator (Wheaton) auf Eis resuspendiert. Anschließend wurde die Mikrotubuli-Probe für 40 min auf Eis disassembliert und die Lösung zentrifugiert (140.000g, 4°C, 30 min, vorgekühlter Rotor und Zentrifuge). Der Überstand wurde mit 0,5 Volumen Glycerin gemischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurde diesem Überstand GTP als Pulver mit einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt, die Suspension durch leichtes Schwenken gemischt und bei 37°C für 40 min assembliert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation (37°C, 45 min, 140.000g). Zu den sedimentierten Mikrotubuli wurden 15 ml des eiskalten CB-Puffer gegeben. Das gesamte Probenvolumen (25 ml) wurde mit 1 mM GTP (Endkonzentration) versetzt, mittels eines 15 ml-Glashomogenisators etappenweise resuspendiert, 40 min lang auf Eis inkubiert und letztmalig (30 min, 4°C, 140.000g) zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes (10% (v/v)) wurde als MAP-Mikrotubuli-Fraktion (= twice-cycled microtubuli protein) zu aliquoten Anteilen von je 100 µl in flüssigem Stickstoff überführt sowie für eine Proteinbestimmung nach BRADFORD (2.8.1.1) aufbewahrt. Für die weitere Reinigung des Tubulins wurde Phosphocellulose (P-11, Whatman) nach Herstellerangaben aktiviert. Die Phosphocellulose-Säule (PC-Säule) wurde mit 100 ml Gesamtvolumen Säulenmaterial gepackt. Zum Äquilibrieren des Ionenaustauschers wurde die Säule an die FPLC-Anlage (Pharmacia, Amersham) angeschlossen mit Puffer CB bei 4°C durchflossen (etwa 3 Säulenvolumina mit einer Flussrate von 1 ml/min). Die Tubulinprobe wurde mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia, Amersham) über den Superloop (Pharmacia) mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule sollte mit maximal 3 mg Protein je Milliliter Matrix beladen werden. Nach Einziehen der Probe in das Säulenmaterial wurde mit Puffer CB bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Im Gegensatz zu Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) bindet Tubulin unter diesen Pufferbedingungen nicht. Die MAPs sind negativ geladen und binden auf der Säule am Phosphat. *In vivo* neutralisieren sie das Tubulin und ermöglichen so die Polymerisation. Da die MAPs keine feste Bindung am Phosphat eingehen und immer wieder mit der Phosphocellulose assoziieren und dissoziieren, ist für eine saubere Trennung der MAPs vom monomeren Tubulin eine lange Säule notwendig. Mit einem Fraktionssammler wurden

Fractionen zu je 2 ml aufgefangen. Die Identifizierung der Hauptfraktionen erfolgte über eine Proteinbestimmung (2.8.1.1) von je 1 μ l Fraktion (10 μ l einer 1:10 Verdünnung). Die Fraktionen mit einem Proteingehalt von mehr als 5 mg/ml wurden vereinigt und nach Zugabe von 5% (v/v) 20x BRB80-Puffer und 0,1 mM GTP (Endkonzentration) in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE (2.8.2.2) kontrolliert.

Puffer PB :
100 mM MES-NaOH, pH 6,6
0,5 mM $MgCl_2$
2 mM EGTA
0,1 mM EDTA
1 mM β -ME (frisch zugeben)

Puffer CB:
100 mM PIPES-KOH, pH 6,8
0,2 mM $MgCl_2$
1 mM EGTA

Puffer 20X BRB80: 600 mM PIPES-KOH, pH 6,8
16 mM $MgCl_2$

2.9 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.9.1 Enzymaktivitäten der Saccharose-Synthase (SUS)

SUS-Aktivitätstests wurden mit gereinigtem nativem und rekombinatem Protein sowohl für die Syntheserichtung, als auch in Richtung der Saccharosespaltung durchgeführt. Die K_m - und V_{max} -Werte für variierende Substrate wurden mittels Standard-Enzymtests ermittelt und nach der Methode von „Lineweaver-Burk“ bzw. „Michaelis-Menten“ bestimmt.

2.9.1.1 Messung der Saccharose-Syntheseaktivität

Die Saccharose-Spaltungsaktivität von SUS wurde mit leichten Modifikationen nach der Methode von ASHWELL (1957) quantifiziert. Für die Aktivitätsmessungen wurden ausschließlich entgaste und mit Stickstoff überschichtete Puffer verwendet. Der Aktivitätsnachweis gliedert sich, je nach Anwendung, in zwei bis drei Phasen. Für den Nachweis einer möglichen Redoxmodifikation wurde den beiden elementaren Phasen (2. und 3.) eine optionale Phase (1.) vorgeschaltet.

1. Vorinkubationsansatz (optional): 30 min Vorinkubation des Enzyms bei RT mit Redoxkomponenten
2. Synthese-Aktivitätsansatz (NDP-Glc + Fru = Saccharose)
3. Detektion des Syntheseproduktes, Saccharose, mittels einer Eichgerade

Das SUS-Protein wurde gegebenenfalls mit variierenden Konzentrationen (0-50 mM) von reduzierenden (DTT_{red} , GSH) bzw. oxidierenden Reagenzien (DTT_{ox} , GSSG) im Vorinkubationsansatz (50 mM MOPS, pH 7,8) versetzt. In verschiedenen Ansätzen wurde das Enzym entweder nur reduziert bzw. oxidiert oder zur Untersuchung der Reversibilität zunächst reduziert (oder oxidiert) und anschließend oxidiert (oder reduziert). Im Synthese-

Aktivitätsansatz (55 μl) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1-3 μg (in 20 μl Volumen) des (ggf. vorinkubierten) Enzyms gestartet. Die Reaktion wurde auf exakt 10 min Inkubation bei 25°C determiniert und durch Erhöhung des pH-Wertes (70 μl 30% KOH) sowie durch Hitzedenaturierung (10 min, 99°C) gestoppt. Das Syntheseprodukt, die Saccharose, wurde durch eine kolorimetrische Messung quantifiziert. Dem Standardansatz von 145 μl wurden 1 ml Anthronlösung zugegeben und bei 40°C für 20 min inkubiert. Entsprechend der gebildeten Saccharosemenge, zeigten die Anthron-Saccharoseproben einen Farbumschlag von gelb zu grün. Die Extinktionsmessung erfolgte innerhalb von 30 min am Photometer (Uvikon) bei einer Wellenlänge von 620 nm. Mit Hilfe einer Saccharose-Eichreihe (0-2 mM) wurde die Menge entstandener Saccharose quantifiziert und die spezifische Aktivität [μmol Saccharose/(min*mg)] determiniert. Für die Null- und Kontrollwerte wurde KOH zum Synthese-Ansatz gegeben, bevor die Reaktion durch das Enzym gestartet wurde. Durch die Erhöhung des pH-Werts fand hier keine Reaktion statt.

Standard Synthese-Aktivitätsansatz (55 μl):

25 μl Synthese-Assaypuffer	(50 mM MOPS, pH 7,5; 12 mM MgCl_2 ; 0,5 mM EDTA)
20 μl UDP-Glucose	(70 mM Glucose in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$)
10 μl Fructose	(70 mM Fructose in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$)

Zur Bestimmung von kinetischen Parametern (K_m -Wert, V_{max} -Wert) wurden variierende Endkonzentrationen verschiedener Substrate (0-25 mM NDP-Glucose bzw. 0-10 mM Fructose) im Syntheseansatz angeboten. Ein weiterer variabler Parameter war die Zugabe von Redoxkomponenten im Synthese-Aktivitätsansatz.

Anthron-Lösung:

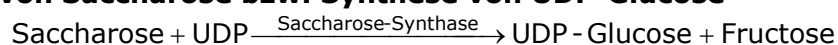
20 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
86 ml	Schwefelsäure (96-98%)
0,15 g	Anthron (Sigma)

Die Anthron-Lösung wurde unter Rühren (ca. 1 h) auf Eis stets frisch angesetzt.

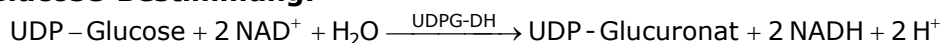
2.9.1.2 Messung der Saccharose-Spaltungsaktivität

Unter physiologischen Bedingungen im *Sink*-Gewebe katalysiert die Saccharose-Synthase vornehmlich die Spaltung von Saccharose in Anwesenheit in je ein Mol UDP-Glucose und Fructose. Die katalytische Aktivität in Richtung der Saccharosespaltung wurde durch einen zweistufigen gekoppelten Enzymtest bestimmt.

(a) Spaltung von Saccharose bzw. Synthese von UDP-Glucose



(b) UDP-Glucose-Bestimmung:



Die spezifische Spaltungsaktivität SUS-Protein wurde über die Menge an gebildeter UDP-Glucose pro Minute und mg Protein ermittelt. Das Enzym UDP-Glucose-Dehydrogenase setzt

die gebildete UDP-Glucose mit 2 NAD⁺ zu UDP-Glukuronsäure und 2 NADH + H⁺ um. Pro Mol UDP-Glucose werden zwei Mol NADH gebildet. Die Bildung von NADH aus NAD⁺ kann spektrophotometrisch bei 334 nm anhand eines Extinktionsanstiegs quantifiziert werden.

Spaltung von Saccharose

Für Standardmessungen wurde der 150 µl Inkubationsansatz auf 25°C temperiert. Durch Zugabe von 2,4 µg SUS-Protein in einem Volumen von 90 µl Puffer C wurde die Spaltungsreaktion gestartet. Die Ansätze mit einem Endvolumen von 240 µl wurden bei 25°C für exakt 10 min inkubiert. Terminiert wurde die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms (10 min, 100°C). Um während der Inkubation entstandene UDP-Glucose von denaturiertem Protein zu trennen, wurden die Proben für 10 min bei 4°C mit 11.000g zentrifugiert. Durch die zeitliche Limitierung auf 10 min wurde die von WOLOSUIK und PONTIS (1974) für die Spaltungsreaktion nachgewiesene Produktinhibition durch UDP-Glucose und Fructose ausgeschlossen und gleichzeitig eine Substratlimitierung vermieden.

Puffer C: 50mM MOPS, pH 7,5

Inkubationsansatz:

(150 µl)

- 60 µl Puffer C
- 30 µl Effektoren (14,4 mM MgCl₂, 0,3 mM CaCl₂ in Puffer C)
- 30 µl UDP-Lösung (8 mM UDP in Puffer C)
- 30 µl Saccharose-Lösung (0,8 M Saccharose in Puffer C)

Das phenolische Glykosid Arbutin (4-Hydroxyphenyl-D-glucoopyranosid) wurde den Kontrollansätzen mit einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Arbutin gilt als für die Saccharose-Synthase spezifischer, streng kompetitiver Inhibitor mit einem K_i-Wert von $1,6 \times 10^{-4}$ bei einer Konzentration von 5,5 mM. Die katalytische Aktivität in Richtung der Saccharosespaltung wird durch Arbutin zu 80-95% inhibiert, während die Saccharose-6-Phosphat-Synthase und die Invertase nicht gehemmt werden (SLABNIK et al., 1968).

UDP-Glucose-Bestimmung

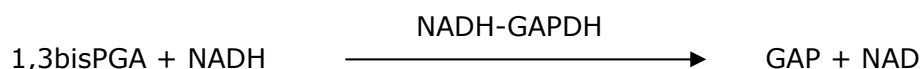
Die Menge an gebildeter UDP-Glucose wurde durch die Reaktion mit UDP-Glucose-Dehydrogenase (UDPG-DH, Calbiochem) quantifiziert, indem spektrophotometrisch die Reduktion von NAD⁺ zu NADH bei einer Wellenlänge von $\lambda = 334$ nm verfolgt wurde. In einer Küvette wurden 900 µl Messpuffer (2 mM NAD⁺, 5 mM MgCl₂, 200 mM Glycin, pH 8,9) mit 100 µl Probenüberstand bzw. für den Leerwert mit 100 µl Reaktionspuffer des entsprechenden pH-Wertes gemischt. Gemessen wurde die absolute Extinktionsänderung (ΔE) nach Start der Reaktion mit 5-10 mU UDPG-DH innerhalb von 3-5 h. Über den molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{334\text{nm}}$ von NADH ($6,18 \times 10^6$ cm²/mol; bei 25°C, BERGMAYER, 1974) und das Gesamtvolumen des Ansatzes konnte die entstandene Menge UDP-Glucose pro min und mg Protein nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden. Stöchiometrisch werden pro Molekül UDP-Glucose zwei Moleküle NAD umgesetzt.

Nachweis von Fructose

Die Substratspezifitäten der SUS-Isoformen hinsichtlich der Verwertung von Nukleotiden (GDP, ADP, UDP, UTP) wurden über die Bildung von Fructose in einem zweistufigen Testsystem nachgewiesen. Hierfür wurde der standardisierte Inkubationsansatz für die Spaltung von Saccharose lediglich bezüglich des angebotenen Nukleotids modifiziert. Alternativ zu UDP wurden entweder 0-20 mM ADP, GDP oder UTP als Substrat im Aktivitätsansatz angeboten. Inkubationszeiten sowie die Hitzedenaturierung und Zentrifugation wurden identisch zum Standardprotokoll durchgeführt. Der Nachweis der Saccharose-spaltung erfolgte über die Quantifizierung der entstandenen Fructose. In einer Küvette wurden 930 μ l Puffer H (100 mM MOPS, pH 7,5, 2 mM ATP, 1 mM NAD(P)) mit 50 μ l denaturiertem Aktivitätsansatz gemischt; die Extinktion bei 334 nm wurde als Nullwert notiert. Der enzymatische Nachweis von Hexosen wurde durch Zugabe von 20 μ l Enzymmix (1 U Hexokinase (HK), 1 U Phosphoglucoisomerase (PGI), 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), Boehringer) gestartet. Über die ermittelte Extinktionsänderung bei 334 nm und den molaren Extinktionskoeffizienten von NAD(P)H wurde die spezifische Aktivität von SUS in Abhängigkeit der jeweiligen Substrate errechnet.

2.9.2 Bestimmung der GAPDH-Aktivität

Die Enzymaktivität wurde in Richtung der 1,3bisPGA-Reduktion in Anlehnung an die Methode von CERFF (1982) gemessen, wobei die Oxidation von NAD pro Zeiteinheit im Spektralphotometer (Eppendorf 1001) bei einer Wellenlänge λ von 334 nm und 25°C verfolgt wurde. Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{334\text{nm}}$ für (NAD(P)H beträgt bei 334 nm $6,18 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (BERGEMEYER, 1974). Die spezifische Aktivität der rekombinanten GAPDH aus *A. thaliana* wurde in U/ml oder U/mg Protein umgerechnet, wobei ein Unit (U) als Umsatz von einem μ mol Substrat pro Minute definiert ist.



Testansatz GAPDH:
(Endvolumen 1 ml)

100 mM	Tris-HCl, pH 7,8
4,5 mM	3PGA
2 mM	ATP
8 mM	MgSO ₄
1 mM	EDTA
0,32 mM	NADH
1,8 U	PGK

Das Substrat 1,3bisPGA wurde im Testansatz durch PGK aus 3PGA und ATP synthetisiert (10 min bei RT). Die Messung wurde durch Zugabe von NAD(H)-GAPDH in einer Küvette gestartet. Um eine unkontrollierte Oxidation des Enzyms durch Sauerstoff zu verhindern, wurden alle Puffer entgast und die Test- und Inkubationsansätze mit Stickstoff überschichtet. Die Berechnung der GAPDH-Aktivität erfolgte mit folgender Formel:

$$1/\tan \alpha \times \frac{(\text{Verd.} \times \text{Verst})}{(6,18 \times 1E (\text{cm}))} \times \text{cm/min} = \text{U/ml Probe}$$

Verd. = Verdünnungsfaktor: $x \mu\text{l K\ddot{u}vette} / x \mu\text{l Probe}$

Verst. = Verstärkung z.B. 0,25

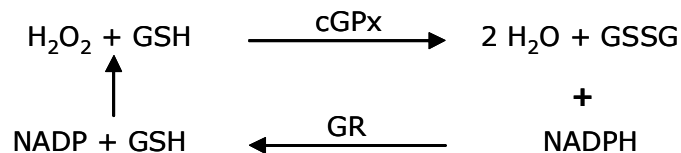
6,18 = molarer Extinktionskoeffizient (ϵ)

1 E = Schreiberbreite in cm für eine Extinktionseinheit z.B. 25 cm

cm/min = eingestellte Schreibergeschwindigkeit

2.9.3 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Der Nachweis der katalytischen Aktivität der Glutathion-Peroxidase (cGPx, EC 1.11.1.9) wurde gemeinsam mit Kerstin Schipper (Universität Osnabrück) in Anlehnung an DROTAR et al. (1985) durchgeführt. Der Aktivitätstest beruht auf der Reaktion von GSH mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu GSSG und H_2O . Das gebildete GSSG konnte mit Hilfe von Glutathion-Reduktase (GR) in einem gekoppelten Enzymtest kontinuierlich durch Extinktionsabnahme bei Produktion von NADP nachgewiesen werden.



Gekoppelter Enzymtest. Mit Hilfe des Enzyms GR kann das von GPx gebildete GSSG durch eine Extinktionsabnahme bei 334 nm nachgewiesen werden.

Die Enzym-Aktivitäten wurden an gereinigter rekombinanter cGPx aus Mais (2.2.) in jeweils sechs verschiedenen Ansätzen bestimmt. H_2O_2 , als Oxidans, wurde dem Ansatz zuletzt zugefügt und startete somit die Reaktion. Die Ansätze enthielten entweder alle für die Reaktion erforderlichen Bestandteile oder waren bezüglich einer Komponente defizient.

Messansatz:	50 mM KPi , pH 6,5
(1 ml)	2 mM EDTA
(+/-)	2 mM GSH
(+/-)	0,1 mM NADPH
(+/-)	2,5 U GR
(+/-)	0,09 mM H_2O_2
(+/-)	100 μg cGPx

1 M KPi -Puffer (pH 6,5): Titration von 1 M K_2HPO_4 , pH 11 gegen 1 M KH_2PO_4 , \sim pH 3,8

Die verschiedenen Ansätze, mit einem Gesamtvolumen von je 1 ml, wurden direkt in einer Küvette gemischt. Im Spektralphotometer wurde die Extinktionsänderung bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ kontinuierlich mindestens 10 min lang verfolgt. Die spezifische cGPx-Aktivität (U/mg) wurde aus der ermittelten Steigung der aufgezeichneten Schreiberkurven und dem molaren Extinktionskoeffizienten von NAD(P)H berechnet. Pro einem H_2O_2 -Substratmolekül entstehen zwei NADP-Moleküle.

2.9.4 Bestimmung der Enolase-Aktivität

Das glykolytische Enzym Enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC 4.2.1.11) katalysiert die Umsetzung von 2-PGA (2-Phosphoglycerat) zu PEP (Phosphoenolpyruvat). Die Messung der katalytischen Aktivität des rekombinanten Enolase-Proteins erfolgte in Anlehnung an FORSTHOEFEL et al. 1995. Gemessen wird die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge 334 nm von NADH bei 25°C. In einer Küvette wurden 970 µl Messpuffer mit 2,5 µl PK (0,8U/µl; Pyruvatekinase) und 2,5 µl LDH (0,8U/µl; Lactatdehydrogenase) gemischt und auf 25°C temperiert. Der Messansatz wurde mit 0,5 µg bis 2 µg gereinigter Enolase in einem Volumen von 20 µl komplettiert. Im Photometer wurde ein linearer Vorlauf abgewartet. Initiiert wird die Reaktion durch Zugabe von 2 mM 2-PGA Endkonzentration in einem Volumen von 5 µl. Die Berechnung erfolgte wie für die Aktivitätsbestimmung der GAPDH. Für gereinigte Enolase wurde eine katalytische Aktivität von 40-55 U/mg ermittelt.

Messpuffer für Enolase-Aktivität:

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
0,14 mM	NADH
25 mM	MgCl ₂
100 mM	KCl
1,3 mM	ADP

2.10 *In vitro*-Polymerisation von Aktin und Tubulin

2.10.1 *In vitro*-Polymerisation von Aktin

Für Studien zur Assoziation verschiedener pflanzlicher Proteine (SUS, GAPDH, Aldolase und Enolase) sowie zur Binde- und Bündelaktivität synthetischer Peptide wurde kommerziell erhältliches Aktin (AKL95; Cytoskeleton, Denver, USA bzw. Tebu, Offenbach) verwendet. Ein aliquoter Anteil von 1 mg Aktin wurde in 500 µl eiskaltem LSB-Puffer aufgenommen und nach Herstellerangaben mindestens 60 min unter gelegentlichem Durchmischen der Probe zur Depolymerisation auf Eis inkubiert. Um die Probe von Saccharose zu befreien, wurde das depolymerisierte Aktin einer Gelpermeationschromatographie (2.8.4.7) oder einer Dialyse (>2 h) bei 4°C gegen LSB-Puffer unterzogen. Zum Entfernen der Nukleationskerne wurde die Aktin-Lösung 1 h bei 4°C mit 150.000g zentrifugiert (Beckman TL-100, Rotor: TLA- 100.1). Dabei pelletierte das nicht depolymerisierte Aktin (F-Aktin). Der Überstand der Ultrazentrifugation enthielt monomeres Aktin (G-Aktin) und wurde für die Aktinbindeversuche eingesetzt. Der Proteinbestimmung der Aktinlösung erfolgte nach BRADFORD (2.8.1.1).

2.10.2 Co-Polymerisation von Saccharose-Synthase mit Aktin

Gereinigte, native oder rekombinante SUS wurde über Gelpermeationschromatographie oder Dialyse entsalzt und in LSB-Puffer überführt. Das denaturierte und unlösliche SUS-Protein wurde durch Zentrifugation (60 min, 4°C, 150.000g) pelletiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde nach BRADFORD (1976) quantifiziert. Gegebenenfalls wurde das lösliche Enzym mittels Ultrafiltrationszentrifugation (Centricon YM-30, Millipore; Fugisep,

Intersep; Centricon 30 K, Amicon) auf einen Proteingehalt ca. 0,8 µg/µl eingengt. Dem jeweiligen Versuchsansatz entsprechend wurden 0,1-1 nmol SUS-Protein und 0,3-0,5 nmol Aktin mit (und ohne) verschiedenen Mono-, Di- und Trisacchariden, Zuckeralkoholen, Thiolreagenzien und Metaboliten in variierenden Konzentrationen bei 4°C in 1,5 ml E-Cups pipettiert und mit LSB-Puffer auf 98-196 µl Endvolumen eingestellt. Die Aktinpolymerisation wurde durch Zugabe von 3-4 µl Polymerisationsinduzierer (PI) gestartet. Anschließend erfolgte die Inkubation und die eigentliche (Co-)Polymerisation der Proben für 30-120 min bei 20°C-25°C im Wasserbad. Für den Nachweis des (De-)Polymerisationsgrades mittels SDS-PAGE wurden die Proben durch sequentielle Zentrifugationen bei 20°C mit verschiedenen Geschwindigkeiten fraktioniert. Bei der optionalen, ersten Zentrifugation mit 10.000g bei 20°C in der Tischzentrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5402) pelletierte quervernetztes oder in lockeren Maschen angeordnetes (gebündeltes) F-Aktin zu einem farblosem Pellet mit gelartiger Konsistenz. Im Überstand dieser Zentrifugation befanden sich depolymerisierte Aktinmonomere sowie unverzweigte Aktinfilamente. Diese ungebündelten F-Aktinfäden pelletierten bei der zweiten Zentrifugation mit 150.000g bei 20°C (TLA-100.1), während auch bei dieser Zentrifugation G-Aktin im Überstand verblieb. Zur quantitativen Analyse wurden die Pellets in einem definierten Volumen LSB-Puffer resuspendiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels ELISA und SDS-PAGE analysiert. Aktinmengen von etwa 1,6 µg (0,04 nmol) können deutlich durch Coomassie-Färbung visualisiert werden.

LSB-Puffer (Low salt buffer):

5 mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,2 mM	CaCl ₂
0,2 mM	ATP
(0,5 mM	DTT _{red})*

Polymerisationsinduzierer (PI):

20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
(50x)	2 M KCl
	100 mM MgCl ₂
	50 mM ATP
	(50 mM DTT _{red})*

- Bei Untersuchungen zum Einfluss von Redoxkomponenten wurde kein DTT_{red} im LSB-Puffer und Polymerisationsinduzierer verwendet.

Saccharose-Stammlösung: 1 M Saccharose in 5 mM Tris-HCl, pH 7,5

2.10.3 Co-Polymerisation und Bestimmung der katalytischen Aktivität

Der Einfluss der Aktinbindung auf die katalytische Aktivität der Saccharose-Synthase wurde durch leichte Modifikation der Standard-Co-Polymerisation (2.10.2) untersucht. In den Versuchsansätzen (200 µl) wurden 20 µl 10x LSB mit 25 µl Effektoren (20 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂ in 50 mM MOPS, pH 7,5), 40 µl Nukleotiddiphosphatlösung (5-240 mM UDP, ADP oder GDP in 50 mM MOPS, pH 7,5) sowie 40 µl Saccharose-Stammlösung (0-1 M Saccharose) mit und ohne Arbutin (10-30 mM Endkonzentration) gemischt. Die Zugabe von 0,05-1 nmol SUS-Protein und 1-2 nmol Aktin erfolgte bei 4°C. Die Aktinpolymerisation und Aktinassoziation sowie die Saccharosespaltung wurde durch Zugabe von 3 µl 50x PI und

Inkubation bei 25°C gestartet. Nach 10 min Inkubation wurden 100 µl der Probe für 5 min bei 99°C denaturiert; dann wurde die entstandene UDP-Glucose oder Fructose bestimmt (2.9.1). Die verbleibenden 100 µl wurden zentrifugiert (150.000g, 20°C, 1 h). Pellet- und Überstand-Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Blue gefärbt und analysiert (2.8.2).

2.10.4 Co-Polymerisation synthetischer Peptide mit Aktin

Die Co-Polymerisation synthetischer Peptide mit Aktin erfolgte weitestgehend analog zu 2.10.2. Die synthetischen Peptide (Tab. 2.8) wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit einer Konzentration von 1 mg/ml vollständig gelöst und anschließend für 1 h bei 100.000g in der Airfuge (Beckman) zentrifugiert. Die Aktivität der synthetischen Peptide, F-Aktin zu bündeln, wurde durch differenzielle Zentrifugation (10.000g und 100.000g) und anschließende Quantifizierung der Aktinhalte in den einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.8.2.2.) untersucht. In 1,5 ml E-Cups wurde G-Aktin (0,5 nmol) und synthetisches Peptid (0,1-10 nmol) in molaren Verhältnissen von 1:0,2 bis 1:20 gemischt und mit LSB auf ein Volumen von 96 µl eingestellt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 2 µl PI (50 x) in einem Endvolumen von 100 µl gestartet. Die Co-Polymerisation erfolgte bei 30°C über einem Zeitraum von 1 h. Um die gebündelte Aktinfraktion zu erhalten, wurde der Co-Polymerisationsansatz mit 10.000g 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde zum Pellettieren des filamentösen Aktins (F-Aktin-Fraktion) anschließend in der Airfuge 60 min bei RT mit 162.000g (92.500 Upm) zentrifugiert. Die Pelletfraktionen wurden je in einem Volumen von 60 µl resuspendiert, (40 µl H₂O und 20 µl 3x SDS-Probenpuffer), während das Volumen des Überstandes etwa 100 µl betrug und mit 50 µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt wurde. Alle Proben wurden mittels 10% SDS-PAGE analysiert. Die verwendeten synthetischen Peptide wurden freundlicher Weise von Prof. Steven C. Huber (North Carolina State University, Raleigh, NC, USA) hergestellt.

Tabelle 2.8: Zu Co-Polymerisationsversuchen eingesetzte, synthetischen Peptide.

Name	Sequenz	Länge	MW[Da]
SS19	MGEAGDRVLSRLHSVR _{NH2}	17mer	1839,4
SS22	IAEYNNAIPEAEREKLD _{NH2}	18mer	2102,5
SS20	RPSLSKSIIGNVQF _{NH2}	14mer	1488,9
NR28	QFLNRHLSSKLFHDK _{NH2}	15mer	1869,5
SS26	LNDIRLSLALQGALRKAEHLSTLQAD _{NH2}	28mer	3147,5
SS23	ADTPYSEFHHRFQELGLE _{NH2}	18mer	2175,6
SS 9	RFQELGLEKGGWDTAKRVK _{NH2}	19mer	2217,8
SuSpH	CHILRVPFRTENGIVRKWISR _{NH2}	21mer	2563,4
SS12	GIVRKWISRFEVWPYL _{NH2}	16mer	2048,6
SS18	GVVRNWDMMCHVWEY _{NH2}	15mer	1908,2
SS10	TDDVAHEIGELANPK _{NH2}	15mer	1607,9
SS21	DRVKNLTGLVELYGRNKR _{NH2}	18mer	2130,7
SuSCT	CKYVSNLERRETRRYLEMLYA _{NH2}	21mer	2676,4

2.10.5 Aktinbindeversuche mit präpolymerisiertem Aktin

Für die Experimente wurden 98 µl depolymerisiertes Aktin (2.9.1.) einer Proteinkonzentration von 0,82 µg/µl auf Eis mit 2% (v/v) PI vorsichtig gemischt. Aus diesem „Batch“ wurden jeweils aliquote Anteile zu je 15 µl in 1,5 ml E-Cups überführt und während einer Präinkubationzeit von 30 min bei 30°C zu F-Aktin polymerisiert. Anschließend wurden 15 nmol synthetischer Peptide (Tab. 2.8), die zuvor mit 1x LSB und 2 µl 25x PI auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt worden waren, zu den F-Aktinproben gegeben. Die Postpolymerisation erfolgte bei 30°C für 30 min im Wasserbad. Unmittelbar vor der nachfolgenden ersten Zentrifugation wurde den Proben 25 µl LSB/PI-Gemisch zugefügt, um ein Endvolumen von 100 µl für die Zentrifugationen zu erhalten. Die erste Zentrifugation erfolgte für 30 min bei RT mit 10.000g. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde in Airfuge-Röhrchen überführt und erneut für 1 h bei RT mit 162.000g zentrifugiert. Die beiden Pelletfraktionen wurden in einem Volumen von 100 µl resuspendiert. Zur semiquantitativen Bestimmung der Akttingehalte wurden je 1/3 der Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine/Peptide mit Coomassie-Blue angefärbt. Alternativ wurden die F-Aktinproben mit dem die Aktinfilamente stabilisierenden Oktapeptid, Phalloidin [63 nM Endkonzentration] versetzt und mit verschiedenen Konzentrationen der synthetischen Peptide vorsichtig gemischt. Postpolymerisation, differentielle Zentrifugation und Ergebnisdokumentation erfolgten identisch zu den oben beschriebenen Versuchsansätzen.

2.10.6 Wettbewerbsversuche zur Aktinbindung

Kompetitionsstudien zur Assoziation von nativ gereinigtem SUS-Protein und synthetischen Peptiden mit Aktinfilamenten wurden in drei zeitlich verschiedenen Varianten durchgeführt. In einem Volumen von 50 µl wurde zunächst 0,5 nmol G-Aktin in Anwesenheit von 200 mM Saccharose analog zu 2.10.5 für 30 min zu F-Aktin präpolymerisiert. Anschließend wurde entweder zunächst das Aktin mit den synthetischen Peptiden inkubiert, bevor der finale Bindeansatz mit SUS-Protein supplementiert und erneut inkubiert wurde, oder die Vorinkubation erfolgte mit dem SUS-Protein und die Supplementation mit den synthetischen Peptiden. Als dritte Alternative wurde zunächst SUS-Protein mit dem jeweiligen Peptid vorinkubiert und als Gemisch dem Assoziationsansatz zugefügt. Die Vorinkubationen erfolgten jeweils für 30 min bei 20°C, während der finale Ansatz für 60 min inkubiert wurde. Die synthetischen Peptide (5 nmol) sowie SUS-Protein (0,25 nmol) wurden jeweils mit 1 µl 25x PI und einfach konzentriertem LSB-Puffer auf ein Volumen von 25 µl eingestellt. Das Mischen der Proben erfolgte mit abgeschnittenen Pipetten, um den Einfluss von Scherkräften zu minimieren. Abschließend wurden die Proben durch Zentrifugation (1 h, RT, 162.000g) in Pellet und Überstand getrennt. Für die Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde die Pelletfraktion in 60 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert, während 40 µl des Überstands mit 20 µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt und denaturiert wurden. Versuche zum

kompetitiven Assoziationsverhalten von SUS-Protein, GAPDH und Aldolase wurden derart durchgeführt, dass 0,1 bis 1 nmol SUS-Protein mit 0,1 bis 1 nmol GAPDH oder Aldolase auf Eis gemischt wurden. Anschließend wurden die Ansätze mit LSB-Puffer und mit oder ohne Saccharose (100 mM Endkonzentration) auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Depolymerisiertes G-Aktin (0,5 bis 1 nmol) wurde in einem Volumen von 35 µl dem Ansatz zugeführt. Die Co-Polymerisation wurde durch Zugabe von 15 µl 10x PI und Überführen der Proben in einen auf 20°C temperierten Thermoblock initiiert. Nach Co-Polymerisation (30 min) wurden die Proben wie oben beschrieben durch Zentrifugation in Pellet und Überstand getrennt und einer SDS-PAGE unterzogen.

2.10.7 Assemblierung von Mikrotubuli

Das gereinigte Tubulin (2.8.4.8) enthält neben dem assemblierungsfähigen Protein einen Anteil polymerisationsinaktiver Tubulinmonomere. Für die Polymerisation von Mikrotubuli in Co-Assemblierungsversuchen wurde die polymerisationsfähige Fraktion von der inaktiven Fraktion getrennt. Hierfür wird das PC-Tubulin aus dem flüssigen Stickstoff auf Eis aufgetaut und in Anwesenheit von (1/100 (v/v) Taxol-GTP) bei 37°C polymerisiert. Anschließend wird die aktive Tubulinfraktion von der inaktiven durch Ultrazentrifugation (Beckman, TLA 100.1, 60 min, 37°C, 80.000 Upm) getrennt. Die polymerisierten Mikrotubuli pelletierten, während inaktive Monomere im Überstand verblieben. Das assemblierungsfähige Tubulin wurde mit eiskühlem BRB80 Puffer (2.8.4.8) depolymerisiert, auf einen Proteingehalt von 0,1 µg/µl eingestellt und bei -70°C gelagert oder alternativ direkt für die Co-Assemblierungsversuche eingesetzt.

2.10.8 Co-Assemblierung von Mikrotubuli und cytosolischen Proteinen

Die Co-Assemblierung wurde in einem Probenvolumen von 100-500 µl durchgeführt. Die Endkonzentration von Tubulin betrug 0,55-1 µM. Die Konzentration der Proteine im Assemblierungsansatz variierte für die rekombinanten Proteine GAPDH, SuS1 (SuSy-wt) und Aldolase je nach Versuchsansatz in einem molaren Verhältnis zu monomerem Tubulin von 10:1 bis 1:100. Die Co-Assemblierung erfolgte für 30 min bei 22°C in BRB80 Puffer mit 1 mM GTP und 5-10 µM Taxol (Endkonzentration). Unmittelbar vor der anschließenden Zentrifugation wurde ggf. ein aliquoter Anteil der Polymerisationsproben für die Bestimmung der katalytischen Aktivität (2.9) der Enzyme GAPDH und SUS entnommen. Die restliche Probe wurde zur Sedimentation der Mikrotubuli und assoziierter Enzyme zentrifugiert (60 min, 22°C, >150.000g). Der Überstand dieser ersten Zentrifugation nach Assemblierung wurde in E-Cups überführt und mittels Aktivitätstests, ELISA und SDS-PAGE analysiert. Das Pellet (PI) dieser Zentrifugation wurde vorsichtig in 100 µl Puffer G resuspendiert. Die Hälfte des resuspendierten Assemblierungs-Pellets wurde zur Bestimmung von Enzymaktivitäten sowie zur ELISA- und SDS-PAGE-Analyse eingesetzt, die andere Hälfte für 45 min auf Eis depolymerisiert und in Abständen von je 15 min sorgfältig

gemischt. Anschließend erfolgte die Sedimentation kälte-stabiler Mikrotubuli und assoziierter Enzyme durch Zentrifugation (60 min, 4°C, 150.000g). Der Überstand dieser zweiten Zentrifugation (Ü2) hatte ein Volumen von ~50 µl. Analog hierzu wurde das Pellet der zweiten Zentrifugation (P2) in 50 µl Puffer G resuspendiert. Je 10 µl der Proben Ü2 und P2 wurden für die Bestimmung der katalytischen Aktivität eingesetzt; je 20 µl wurden für die SDS-PAGE und die ELISA-Quantifizierung verwendet. Für Konkurrenzstudien zwischen rekombinantem SUS1-Protein (SuSy-wt) und Aldolase um die Bindung an Mikrotubuli wurden 12,5 µg SuSy-wt mit oder ohne 5,5 µg Aldolase sowie mit oder ohne 5,5 µg Tubulin in einem Volumen von 100 µl wie oben beschrieben co-assembliert. Die gesamte Probe wurde für 1 h bei 22°C mit >150.000g durch ein Saccharosekissen (40% Saccharose in PB-Puffer) mit 5 µM Taxol zentrifugiert. Das resultierende Pellet und der Überstand wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die denaturierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Gelspots densitometrisch quantifiziert (2.8.2.3). Rekombinante Aldolase wurde von Anke Scholz, Universität Osnabrück, zur Verfügung gestellt.

Puffer G: 100 mM MES-NaOH, pH 6,4
1 mM EGTA
0,1 mM GTP
3 mM β-ME oder 5 mM DTT_{red} (frisch zugeben)

2.11 *In vitro*-Phosphorylierung mit radioaktivem ATP

Um Hinweise zu erhalten, ob die neu identifizierte SUS-Isoform SuS3 ebenso wie die SUS1-Isoform N-terminal posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert werden kann, wurde ein Phosphorylierungsassay mit radioaktivem ATP durchgeführt. Des Weiteren wurde die *in vitro*-Phosphorylierung eingesetzt, um den Einfluss einer Phosphorylierung auf die Bindung von SUS an Aktinfilamente *in vitro* zu untersuchen. Phosphoryliert wurde durch die CDPKI und CDPKII (calcium-dependent protein kinase) aus *Z. mays* mit radioaktiv-markiertem [γ -³²P]-ATP als Substrat. Diese calciumabhängigen Kinasen eluierten bei der Ionenaustausch-Chromatographie über Resource Q (2.8.4.6) in getrennten Fraktionen im Bereich von ~12-35% Puffer B, was einer NaCl-Konzentration von 120-350 mM entsprach.

2.11.1 *In vitro*-Phosphorylierung von synthetischen Peptiden

Für die *in vitro*-Phosphorylierung wurden synthetische Peptide, die entweder der N-terminalen Aminosäuresequenz der Proteine SUS1 und SUS3 entsprechen oder (als Kontrolle) zu der Phosphorylierungsstelle der SPS (EC 2.4.1.14) aus Spinat korrespondieren, durch Steven C. Huber (NCSU, Raleigh†) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Peptide sind in Tabelle 2.9 aufgeführt. Zunächst wurden die Peptide mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml in 2 mM ungepufferter Tris-Lösung aufgenommen und zu aliquoten Anteilen von je 500 µl bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Der pH-Wert der Peptidlösungen lag zwischen 7,0 und 7,5. In gekühlten Reaktionsgefäßen wurden 32 µl Peptidpuffer mit CaCl₂ (50 mM MOPS, pH 7,5, 200 µM CaCl₂, 0,1 µg/µl Peptid)

zugefügt. Der Phosphorylierungsnachweis erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Immundetektion mit phospho-spezifischen Antikörpern (Tabelle 2.7).

2.12 Dephosphorylierung von Proteinen mit Alkalischer Phosphatase

Phosphatasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Phosphorsäure-Estern katalysieren. Die Alkalische Phosphatase (AP, EC. 3.1.3.1.), deren Aktivitätsoptimum im alkalischen pH-Bereich liegt, kann an Proteinen die Phosphatreste von phosphoryliertem Serin, Threonin oder Tyrosin abspalten. Da Phosphationen die AP inhibieren, dürfen die Proteine nicht in einem Phosphatpuffer vorliegen. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde in Anlehnung an LESAGE et al. (1996) durchgeführt. Für die Phosphatasebehandlung wurden je 10 µg Protein in 20 µl Phosphatasepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin, 0,2% (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT_{red}, 1 mM MgCl₂, 200 µM ZnSO₄) aufgenommen und 1-4 h bei 37°C mit 20 U AP (2000 U/ml, Sigma) inkubiert. Die Kontrollproben wurden in 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) mit Phosphataseinhibitoren angereichert (5 mM NaF, 10 mM Natriumpyrophosphat, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA) und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe 5 µl 6x SDS-Proben-Puffer (2.8.2.2) sowie durch Schockfrieren abgestoppt. Die Analyse der Proben erfolgte immunologisch unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper (Tabelle 2.7).

2.13 Quantifizierung des Glutathiongehaltes durch „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC)

Gehalte an Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiertem (GSSG) Form in verschiedenen Maisgeweben wurden unter Einsatz der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) in Zusammenarbeit mit Sabrina Jung (Universität Osnabrück) quantifiziert. Der hier angewandte Trennmechanismus beruht auf einer Verteilungs-Chromatographie (Reversed Phase, RP). Es wurde sowohl frei löslich vorliegendes, als auch an Protein gebundenes GSH nach reduktiver Freisetzung bestimmt. Die Probenvorbereitung basierte auf einer Derivatisierung für die nachfolgende HPLC-Bestimmung mit Fluoreszenzdetektion. Der Probenansatz wurde geteilt und ein aliquoter Anteil zur Messung des reduzierten Glutathions unmittelbar derivatisiert. Das zweite Aliquot wurde vor der Derivatisierung zunächst einem Alkylierungsschritt unterworfen und hieraus die Summe von reduziertem und oxidiertem Glutathion bzw. das GSSG/GSH-Verhältnis bestimmt. Qualitative Aussagen über den Analyten konnten aus der Retentionszeit eines chromatographischen Signals (Peak) getroffen werden, während die Quantifizierung unter Verwendung einer externen Kalibrierung, durch Aufnahme stoffspezifischer Kalibrierkurven mit sechs Lösungen unterschiedlicher bekannter Konzentrationen am GSH erreicht wurde. Im linearen Bereich des Detektors war die Peakfläche proportional zu der aufgetragenen Stoffmenge.

2.13.1 Apparativer Aufbau

In der vorliegenden Arbeit wurde eine HPLC-Apparatur bestehend aus einem Shimadzu System, zwei LC-10 AD VP-Hochdruckpumpen und einem SCL-10 A VP-Controller verwendet. Die Injektion von Probenanteilen (10 µl, 25 µl und 50 µl) erfolgte mit dem SIL-10-Autosampler. Als unpolare, stationäre Phase diente die HPLC-Säule Supelcosil™ LC-18 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm, Octadecylphase auf Kieselgelbasis, Supelco). Die Temperierung auf 25°C erfolgte mit einem CTO-10 AS VP-Thermostatenofen. Als mobile Phase wurden Laufmittel A (10% MeOH, 0,25% Essigsäure, 89,75% H₂O_{bidest}, pH 4,3) und Laufmittel B (90% MeOH, 0,25% Essigsäure, 9,75% H₂O_{bidest}, pH 3,9) verwendet. Die Fluoreszenz von Glutathion mit gebundenem mBBr wurde mit einem RF-10 A_{XL}-Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge (Ex.) von 380 nm detektiert. Die Quantifizierung der GSH-/GSSG-Gehalte anhand externer Kalibrierkurven wurde durch die Shimadzu Class VP 5.0 Software unterstützt.

2.13.2 Kalibrierung der HPLC

Für eine Berechnung der in den Proben enthaltenen GSH-/GSSG-Konzentrationen erfolgte zunächst eine Kalibrierung des Testsystems mit variierenden GSH- und GSSG-Konzentrationen (0,01 -0,66 nM). Für die GSH-Standardansätze wurden 25-100 µl einer 0,1 mM GSH-Stammlösung mit H₂O_{bidest} auf ein Volumen von 180 µl gebracht. Anschließend wurden 240 µl CHES-Puffer (200 mM CHES-KOH, pH 9,3) und 50 µl 40 mM DTT_{red} dazugegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (60 min) wurden 20 µl Thiolyte-Lösung (30 mM Thiolyte[®]-MB Reagenz (Calbiochem, Monobromobimane Reagenz zur Fluoreszenzmarkierung von Thiolen) in Acetonitril) zur Derivatisierung zugegeben und 15 min lichtgeschützt inkubiert. Durch Zugabe von 260 µl 10%iger Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt und gleichzeitig stabilisiert. Für die GSSG-Standardansätze wurden 25100 µl einer 0,05 mM GSSG-Lösung mit 155-80 µl H₂O_{bidest}, 240 µl CHES-Puffer und 20 µl NEM (10 mM) zur Alkylierung vorhandener SH-Gruppen für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 50 µl DTT (40 mM) für 60 min bei RT reduziert. Die Derivatisierung durch Thiolyte[®]-MB Reagenz sowie das Abstoppen der Reaktion erfolgte analog zu den GSH-Standardansätzen. Die Kalibrierung erfolgte durch Injektion verschiedener Volumina (10– 0 µl) der erstellten externen Standardansätze.

2.13.3 Vorbereitung der Gewebeproben

Die Glutathion-Quantifizierung erfolgte mit je 50-100 mg frisch gemörsertem Pflanzenmaterial unterschiedlicher Gewebetypen und Entwicklungsstadien. Für die Extraktion wurden je 50 mg gefrorenes Maisgewebe mit 500 µl 2%iger Perchlorsäure in einem Reaktionsgefäß auf Eis gemischt und aufgetaut. Der essentiell saure pH-Wert wurde mittels pH-Papier überprüft, die Proben kurzzeitig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und erneut im Eisbad aufgetaut. Nach zwei Sonifizierungsschritten von je 30 s auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (Eppendorf 5402; 4°C, 30 min, 15.800g). Das Pellet wurde für die

Isolierung und Bestimmung des proteingebundenen Glutathions kühl aufbewahrt (2.13.4) Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl gesättigter Kaliumkarbonatlösung (K_2CO_3) versetzt. Der Niederschlag wurde erneut 5 min mit 15.800g unter Kühlung zentrifugiert. Die Bestimmung der GSH-/GSSG-Gehalte erfolgte aus der Überstandsfraktion analog zu den Standardproben der Säulenkalibrierung (2.13.2). Inkubationsansätze für die GSH- bzw. GSSG-Bestimmung sind in Tabelle 2.10 aufgeführt. Vor der Probeninjektion wurden die Ansätze 10 min bei 15.800g zentrifugiert. Unlösliche Partikel sedimentierten und der geklärte Überstand entsprach den Reinheitskriterien der HPLC-Apparatur.

Tabelle 2.10: Inkubationsansätze für die GSH- bzw. GSSG-Bestimmung.

(a) GSH-Bestimmung (Endvolumen 750 µl)

240 µl	200 mM CHES-KOH, pH 9,3	
180 µl	Probe	
50 µl	40 mM DTT _{red}	60 min bei RT reduzieren
20 µl	30 mM Thiolyte-Lösung	15 min bei RT lichtgeschützt derivatisieren
260 µl	10% Essigsäure	

(b) GSSG-Bestimmung (Endvolumen 750 µl)

240 µl	200 mM CHES-KOH, pH 9,3	
180 µl	Probe	
20 µl	10 mM NEM	10 min bei RT alkylieren
50 µl	40 mM DTT _{red}	60 min bei RT reduzieren
20 µl	30 mM Thiolyte-Lösung	15 min bei RT lichtgeschützt derivatisieren
240 µl	10% Essigsäure	

2.13.4 Bestimmung von proteingebundenem GSH

Das vollständig vom Überstand befreite Sediment der homogenisierten, Perchlorsäuregefällten und zentrifugierten Gewebeprobe (2.13.3) wurde zweimal mit je 900 µl Ether gewaschen. Unter dem Abzug wurden die Überstände vorsichtig dekantiert und zum Abdampfen des verbleibenden Ethers etwa 5 min lang aufbewahrt. Das Proteinpellet wurde in 250 µl CHES (200 mM, pH 9,3) aufgenommen und mit 5 µl DTT_{red} (1 M) sowie 245 µl H_2O_{bidest} versetzt, durch Sonifikation gelöst und 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 17 µl 60%iger Perchlorsäure wurde der pH-Wert überprüft und der Ansatz zentrifugiert (4°C, 10 min, 15.800g). Der Überstand wurde mit 10 µl gesättigter K_2CO_3 neutralisiert sowie erneut zentrifugiert. Vom Überstand wurden 180 µl entsprechend dem Protokoll für die Bestimmung von „freiem“ GSH weiterverarbeitet (2.13.3).

2.13.5 Injektion und Elution der Analyte

Nach umfangreichen Voruntersuchungen (durchgeführt von Sabrina Jung) erwies sich ein „binärer Gradient“ als geeignet, die Analyte (GSH und GSSG) aufzutrennen und darzustellen (Abb. 2.4). Nach dem Äquilibrieren der Supelcosil™ LC-18-Säule erfolgte der Probenauftrag zum Zeitpunkt 0 min. Eluiert wurden die Analyte mit steigender MeOH-Konzentration der mobilen Phase. Die Flussrate betrug konstant 1,0 ml/min.

RP-HPLC-Säulenprogramm

Zeit [min]	Konzentration Laufmittel B	
∞ - 0	4%	Säulenäquilibration
0	4%	Probeninjektion durch Autosampler
0 - 6	4% - 18%	Elution nicht retardierte Substanz
6,01	100%	
6 - 8,5	100%	Elution retardierter Substanz
8,5 - 16	100% - 0%	

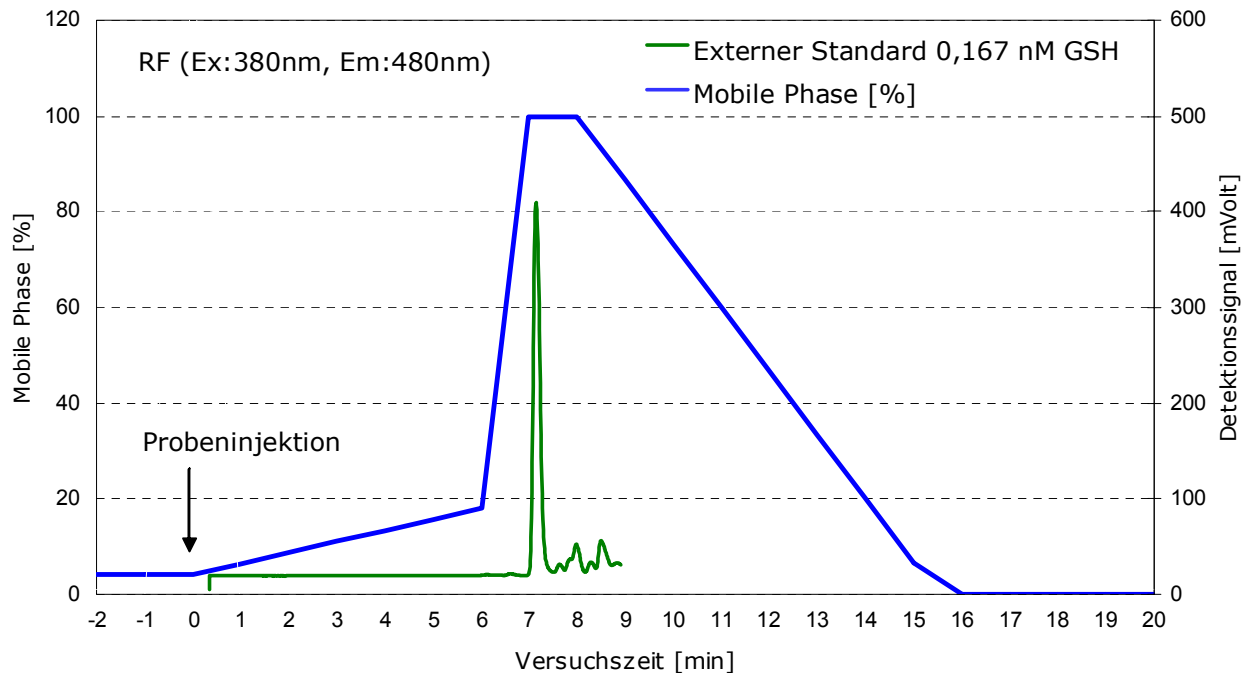


Abb. 2.4: Schematische Darstellung eines Chromatogramms. Reduziertes Glutathion erzeugt nach einer bestimmten Retentionszeit am Fluoreszenzdetektor ein deutliches Signal. (Original Chromatogramme der Kalibrierung befinden sich im Anhang.)

2.14 Affinitätschromatographie interagierender Proteine

Dieser biochemische Ansatz zur Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen beruht auf der spezifischen Bindung eines „tag“-erweiterten Fusionsproteins an eine Affinitätsmatrix. Proteine ohne „tag“ sollten hingegen nicht binden und ausgewaschen werden, es sei denn, sie binden spezifisch an das „tag“-erweiterte Fusionsprotein. Interagierende Proteine können abschließend gemeinsam eluiert und analysiert werden.

2.14.1 SUS-GPx-Bindeversuch

Die im Hefe-2-Hybrid-Screen detektierte, putative Interaktion zwischen cytosolischer Glutathion-Peroxidase und SUS wurde unter Verwendung der rekombinanten Proteine cGPx und SuSy-wt untersucht. Über eine Strep-Tactin-Säule gereinigte (2.8.4.3) und gegen LEW-Puffer (2.8.4.2) dialysierte cGPx-Proteinlösung (5 ml, 0,3 µg/µl) wurde mit 1 ml *Strep-Tactin Superflow Resin Suspension* versetzt und durch 60 minütiges Schwenken bei 4°C an die Matrix gekoppelt. Diese Suspension wurde in ein Säulenröhrchen überführt und mit 4 x 4 ml LEW-Puffer gewaschen. Über Nickel-Chelat-Säule (2.8.4.3) gereinigtes und

dialysiertes rekombinantes SUS-Protein (5 ml SuSy-wt mit 0,15 µg/µl) wurde sukzessive auf die Säule gegeben. Alternativ erfolgte eine Kopplung des mit Strep-tag-Protein beladenen Säulenmaterials mit dem potentiellen Bindeprotein SuSy-wt im *Batch-Verfahren*, indem beide Proteine sowie die Affinitätsmatrix gemeinsam mindestens 60 min bei 4°C geschwenkt und in ein Säulenröhrchen überführt wurden. Es folgten erneute Waschschrte mit 4 x 4 ml LEW-Puffer. Danach wurden die über Strep-tag gebundenen Proteine (zusammen mit den Bindeproteinen) schrittweise mit 8 x 0,5 ml *Strep-Tactin Superflow* Elutionspuffer eluiert. Zur Kontrolle der unspezifischen SuSy-wt-Bindung an die *Strep-Tactin Superflow* wurde die Affinitätschromatographie ebenfalls unter Abwesenheit des Bindepartners cGPx durchgeführt. Der beschriebene Versuch wurde analog mit einer Nickel-Chelat-Säule wiederholt. Das His-tag-Fusionsprotein, SuSy-wt, wurde zunächst an die Säulenmatrix gekoppelt. Nach den Waschschrten wurde rekombinantes cGPx-Strep-tag-Fusionsprotein auf die Säule gegeben und nach weiteren Waschschrten wurden die gebundenen Proteine mit einem Imidazolgradienten (2.8.4.3) eluiert. Parallel wurde eine Chromatographie unter identischen Bedingungen durchgeführt, jedoch unter Abwesenheit von SuSy-wt. Sämtliche Säulendurchflüsse und Eluate wurden aufgefangen und aliquote Anteile wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-Gele wurden z.T. angefärbt und/oder für den immunologischen Nachweis durch Western-Blotting (2.8.3.1) eingesetzt.

2.14.2 Affinitätschromatographie mit Rohextrakt

Hierfür wurde die Hypervariable Region (HVR) der Cellulose-Synthase (CesA1) als rekombinantes Polypeptid mit His-tag (HVR-pRSET) an eine Ni-Chelat-Säulenmatrix gekoppelt. In einem zweiten Ansatz wurde cGPx wie unter 2.14.1 beschrieben an eine *Strep-Tactin Superflow-Matrix* gekoppelt. Beide Protein-Säulen, sowie zwei korrespondierende Kontrollsäulen wurden durch Waschschrte mit LEW-Puffer von unspezifischen Bindungen befreit. Rohextrakt aus etiolierten, aeroben Maiskeimlingen wurde wie unter 2.8.4.5 hergestellt. Je 5 ml des Rohextraktes mit einem Proteingehalt von 0,8 µg/µl wurden auf die Proben- und Kontrollsäulen gegeben. Die in der mobilen Phase befindlichen Proben wurden chromatographisch aufgetrennt und erhielten die Möglichkeit, an das zuvor immobilisierte Protein zu binden. Die Ni-Chelat-Säulen wurden sowohl mit als auch ohne Probe mit je 5 Säulenvolumen (5 ml) Waschpuffer (LEW-Puffer zuzüglich 10 mM Imidazol) durchspült, die *Strep-Tactin-Säulen* mit LEW-Puffer. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte entsprechend über einen Imidazolgradienten (150 mM, 300 mM, 450 mM und 1 M) mit je 2 ml Elutionsvolumen oder mit 4 x 0,5 ml *Strep-Tactin Superflow* Elutionspuffer. Die Proteinzusammensetzung jeder Fraktion wurde durch Auftrennen von je 25 µl Fraktionsvolumen mittels SDS-PAGE (12-15%) und anschließender Proteinfärbung sowie Western-Blotting analysiert. Als primärer Antikörper fungierte der Anti-SuS-ct in einer Verdünnung von 1:5000.

2.15 Protoplastenisolierung

Sämtlich Lösungen und Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Von steril angezogenen, ca. 3-4 Tage alten, etiolierten Maiskeimlingen wurden die oberen 2 mm des Apikalmeristems mit einer scharfen Rasierklinge entfernt. Für die Protoplastenisolierung wurden die folgenden 2 bis 3 cm von etwa 50 jungen Keimlingen mit einer sterilen Rasierklinge unter Grünlicht in 10 ml gekühltes Osmotikum (0,6 M Mannitol, 10 mM MES-KOH, pH 5,6) geernet. Das Gewebe wurde in 0,2-0,5 mm dicke Scheibchen zerteilt und für 30 min zur Präplasmolyse im Osmotikum inkubiert. Nach Absaugen des Osmotikums wurden 20 ml Enzymlösung dazupipettiert, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und 16 h lang bei 25°C im Dunkeln unter leichtem Schwenken (70 Upm) inkubiert. Nach Kontrolle der Protoplastenfreisetzung (Lichtmikroskop) wurde die Suspension durch eine Stahlsiebkombination (125 μm und 63 μm Maschenweite) filtriert, und die Siebe wurden zweimal mit 10 ml CaCl_2 -Lösung nachgespült. Anschließend wurden die Protoplasten in Schraubdeckelröhrchen überführt und 5 min bei 60g und 10°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml Inkubationsmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Inkubationsmedium aufgenommen, vorsichtig auf 20 ml Percoll-Lösung geschichtet und nochmals für 10 min zentrifugiert. Die vitalen Protoplasten sammelten sich in der Interphase zwischen Inkubationsmedium und Percoll- Lösung, während sich tote Zellen am Boden des Gefäßes absetzten. Intakte Protoplasten wurden mit einer weithalsigen Pipette abgenommen, in ein neues Schraubdeckelröhrchen überführt und mit dem vierfachen Volumen an Inkubationsmedium versetzt. Die Proben wurden erneut sedimentiert (5 min, 60g) und in 1,5 ml MaMg-Lösung resuspendiert. Die Anzahl der isolierten Protoplasten wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Enzymlösung:
(nach SHEEN, 1991)

- 10 mM MES-KOH, 7,5
- 2% (w/v) Cellulase (Onozuka R-10, Serva)
- 0,1% (w/v) Pectolyase Y23 (Macerozyme R-10, Serva)
- 1% (w/v) Driselase (Sigma)
- 0,1% (w/v) BSA
- 1 mM CaCl_2
- 15 mM β -ME

Inkubationsmedium:

- 5 mM MES-KOH, 5,6
- 0,5 M Sorbitol
- 10 mM KCl
- 1 mM CaCl_2
- 20 mM Glucose

Percoll-Lösung: 20% (v/v) Percoll in Inkubationsmedium

MaMg-Lösung:
(pH 5,6)

- 0,6 M Mannitol
- 15 mM MgCl_2
- 0,1% (w/v) MES

2.16 Transformation etiolierter Protoplasten

Für transiente Transformation wurde eine Konzentration von $3,5 \times 10^6$ Protoplasten/ml in MaMg-Lösung eingestellt. Für jedes Konstrukt (SuSy-GFP, pGFP2) wurden 20 µg Plasmid-DNA (1 µg/µl in TE-Puffer) in einer Petrischale (5 cm) vorgelegt, 300 µl Protoplasten-Suspension zugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 500 µl PEG-Lösung aus einigen Zentimetern Abstand zu den Protoplasten getropft und 30 min im Dunkeln inkubiert. Durch schrittweise Zugabe von 5 x 1 ml Inkubationsmedium in Zeitintervallen von 5 min wurde die PEG-Lösung verdünnt. Die Suspension wurde in Schraubdeckelröhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 60g, 10°C). Die Protoplasten wurden in 2 ml B5_M-Medium aufgenommen, im Dunkeln bei RT mindestens 18 h lang inkubiert und im Fluoreszenz- und konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht.

PEG-Lösung:

0,5 M Mannitol
0,1 M Ca(NO₃)₂*4 H₂O
0,1% (w/v) MES

mit 0,1 N KOH auf pH 7,2 einstellen, 100 ml dieser Lösung mit 40g PEG 6000 versetzen

B5_M- Medium:

(pH 5,7 mit KOH)

3,2 g/l Gamborg-Medium, komplett
0,6 M Glucose
0,1 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid (2,4-D)

2.17 *In vitro* und *in situ*-Glutathionylierung

Der Einfluss von Glutathionylierung auf diverse Enzymaktivitäten wurde vor allem im tierischen System eingehend untersucht (GILBERT, 1984). Verschiedene glykolytische Enzyme wurden erstmals in *A. thaliana* als glutathionylierbar beschrieben (ITO et al., 2003). Der Nachweis der putativen Glutathionylierung der Saccharose-Synthase erfolgte (immunologisch) mit Hilfe von biotinyliertem GSH (BioGEE, glutathione ethyl, biotin amide; Molecular Probes). Hierzu wurden isolierte Protoplasten als *in situ*-System oder rekombinantes SUS1-Protein als *in vitro*-System verwendet. Sämtliche Puffer wurden frisch zubereitet und vor Verwendung entgast. Die vitalen Protoplasten (2.15) wurden mit osmolarem Puffer (0,6 M Mannitol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,9) auf eine Konzentration von 1×10^6 Protoplasten/ml eingestellt. Die Thiolreagenzien Diamide, H₂O₂ und β-ME wurden als 100 mM Stammlösung in 50 mM Tris-HCl, pH 7,9 angesetzt. Der pH-Wert der Lösungen lag bei 8,0-8,2. BioGEE wurde in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) mit 0,5 mM Endkonzentration resuspendiert. Protoplastensuspension (400 µl) wurden zunächst mit 50 µM BioGEE für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Kontrollansatz wurden parallel 100 µl Protoplastenlösung mit Tris-Puffer, aber ohne BioGEE, inkubiert. Das zellpermeable Konjugat erhielt während dieser Inkubationszeit die Möglichkeit in das Cytosol der Protoplasten einzutreten. Anschließend wurde die Probe in vier Ansätze aufgeteilt. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation (2 min, 60g) sedimentiert; der Überstand wurde zum Entfernen des BioGEEs möglichst vollständig abgenommen. Die vier Ansätze wurden

mit osmolarem Puffer auf ein Volumen von 95 μ l gebracht und anschließend mit 5 mM (Endkonzentration) Diamide, H_2O_2 und β -ME oder nur Tris-Puffer in einem Volumen von 100 μ l 60 min lang bei RT inkubiert. Von jedem Ansatz wurden 20 μ l für Aktivitätsmessungen entnommen. Die verbleibenden 80 μ l wurden mit 20 μ l 6x SDS-Probenpuffer ohne β -ME oder DTT_{red} versetzt, für den Aufschluss der Protoplasten 2x15 s sonifiziert und bei 99°C für 5 min denaturiert. Unlösliche Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (10.000g, 10 min) abgetrennt; der resultierende lösliche Proteinextrakt wurde für die Analyse mittels Western-Blotting und Proteinfärbung verwendet. Alternativ wurde im *in vitro*-System rekombinantes, dialysiertes SUS1-Protein in vier Ansätzen an Protino® Ni 2000-Säulen gekoppelt und mit 6 ml 5 mM Diamide, 10 mM β -ME oder nur LEW-Puffer (Macherey & Nagel) beladen. Nachdem die Matrix vollständig vom Puffer durchtränkt war, wurden die Säulen verschlossen und für 30 min bei RT inkubiert. Die Durchlaufraktion (DL) sowie alle folgenden Wasch- und Elutionsschritte wurde aufgefangen. Anschließend wurde mit 2x2 ml LEW-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml 50 μ M BioGEE in LEW sowie nur 2 ml LEW (Kontrollsäule) wurden die Säulen erneut verschlossen, für 30 min inkubiert und mit 2x2 ml LEW zum Entfernen des ungebundenen BioGEEs gewaschen. Die Elution des SuS1-Proteins erfolgte in fünf Schritten mit je 2 ml Elute-Puffer (Macherey & Nagel). In allen Fraktionen wurde der Proteingehalt sowie die spezifische Spaltungsaktivität des Enzyms bestimmt. Aliquote Anteile wurden mittels 10% SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blue-Färbung und Western-Blotting hinsichtlich der Verträglichkeit von Säulenprotokoll und Thioreagenzien und der immunologischen Detektion inkoperierten BioGEEs analysiert.

2.18 Alkylierung von Sulfhydryl-Gruppen

Die Methode dient der Analyse inter- und intramolekularer Disulfidbrücken und Sulfhydrylgruppen. Die Alkylierung erfolgte entweder mit der negativ geladenen Jodessigsäure (IAA; $H_2C-COOH$) oder dem ungeladenen Jodacetamid (IAM; IH_2C-CN_3OH). Das Optimum der Reaktion liegt bei pH 7,5. Bei pH 8,0 läuft die Alkylierung noch exakt ab, aber in kürzerer Zeit als bei pH 7,5. Die Alkylierung läuft bei zu niedrigem pH-Wert im Ansatz gar nicht ab, bei einem pH-Wert über 8,0 wird die Alkylierung unspezifisch. Mit der Ein-Schritt-Alkylierung können intermolekulare Disulfidbrücken und Sulfhydrylgruppen detektiert werden. Dafür wurden 100 μ g rekombinantes SUS-Protein zehn Minuten lang in Reduktionspuffer (8 M Harnstoff, 20 mM DTT_{red} , 100 mM Bicin-KOH, pH 8,0) bei RT inkubiert. Dabei wurde das Protein entfaltet und reduziert. Anschließend wurde die Probe in fünf aliquote Anteile aufgeteilt. Jedes Aliquot wurde 15 min lang bei RT in Gegenwart unterschiedlicher IAA/IAAM-Verhältnisse alkyliert. Die 1,5-fache Konzentration an IAA/IAAM gegenüber der DTT_{red} -Konzentration sollte sicherstellen, dass nicht nur das DTT_{red} , sondern auch sämtliche Sulfhydrylgruppen von SUS alkyliert wurden; auch die, die nach der Reduktion der Disulfidbrücken entstanden sind. SUS-Protein wurde in Gegenwart von fünf

verschiedenen IAA/IAM-Konzentrationsverhältnissen alkyliert. Nach der Alkylierung wurden die fünf Proben einer Harnstoff-Gelelektrophorese (2.8.2.4) unterzogen, um die Ladungszustände des Proteins zu detektieren. Ein Gemisch aus allen fünf Proben wurde zusätzlich elektrophoretisch aufgetrennt.

Ansatz	IAA (mM)	IAM (mM)
1	60	0
2	45	15
3	30	30
4	15	45
5	0	60

Alternativ wurde das Protein mit und ohne vorherige Reduktion durch DTT_{red} mit IAA alkyliert und in einer Harnstoff-Gelelektrophorese analysiert.

2.19 Fluoreszenz-Spektroskopie

SUS-Protein wurde mit LSB-Puffer (2.10.2) auf eine Proteinkonzentration von 0,065 µg/µl eingestellt und zusätzlich gegen LSS-Puffer bei 4°C dialysiert und zentrifugiert (20 min, 20.400g). Durch Komplettierung der Proteinlösung mit 10 mM DTT_{red} oder DTT_{ox}, 50 mM GSH oder GSSG, oder 100 mM Saccharose wurden Proben generiert, die Hinweise auf einen Einfluss von Oxidations- und Reduktionsmitteln sowie von Metaboliten auf die Konformation des SUS-Proteins geben sollten. Der LSB-Puffer mit und ohne Redox-Reagenzien und Metabolit wurde als Referenz für die spektroskopischen Messungen verwendet und dokumentiert. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden sterilfiltriert und entgast. Die Messungen wurden mit 100 µl Proben-Volumen in verschließbaren Quarz-Küvetten bei 25°C durchgeführt. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden an dem Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer) aufgezeichnet. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm wurden die Fluoreszenzemissionsspektren von 305-530 nm aufgezeichnet. Die Emissionsspaltbreite betrug 5 nm. Zu jeder Probe (SUS-Proteinlösung) sowie zu jedem Puffer wurde ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen. Die Spektren wurden nicht zur Korrektur miteinander verrechnet, so dass nur unkorrigierte relative Fluoreszenzintensitäten (RF) gemessen wurden.

3 Ergebnisse

Die Saccharose-Synthase (SUS) (EC 2.4.1.13), als ein zentrales Enzym des pflanzlichen Kohlenhydratstoffwechsels, ist an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Neben der Bereitstellung von UDP-Glucose als unmittelbares Substrat für die Synthese von Cellulose und Callose (SALNIKOV et al., 2003; SUBBAIAH und SACHS, 2001) oder als Vorstufe für die Bildung von Stärke (ASANO et al., 2002) sowie der Bereitstellung von Fructose für einen ATP-sparenden Respirationsweg weisen verschiedene Arbeiten auf ein weites Spektrum an apparenten und transienten Assoziationen des Enzyms an Membranen und/oder Aktin hin (WINTER et al., 1997; WINTER et al., 1998; WINTER und HUBER, 2000; KOMINA et al., 2002, HARDIN et al., 2004).

Die subzelluläre Lokalisation bzw. Kompartimentierung des eigentlich cytosolischen Proteins scheint ein entscheidender Regulationsmechanismus zu sein. Die Isoformen werden gewebespezifisch bevorzugt exprimiert, ebenso scheint die Lokalisation vom jeweiligen Entwicklungsstatus der Pflanze und ihrer einzelnen Organe abhängig zu sein. Ferner wird der reversiblen Proteinphosphorylierung von SUS eine Beteiligung an der Regulation der Lokalisation und enzymatischen Aktivität postuliert. Um weiteren Aufschluss über die komplexe physiologische Funktion der Saccharose-Synthase zu erhalten, müssen strukturelle und kinetische Eigenschaften der einzelnen Isoformen klar definiert und in einem Modell integriert werden.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die kinetischen Eigenschaften von SUS-Isoformen einiger Organismen sehr ähnlich, andere wiederum sehr verschieden sein können. Damit einher geht die Unstimmigkeit über die Existenz Isoform-spezifischer Funktionen. Untersuchungen von SUS-Mutanten aus Mais führten zu der These, dass die SH1-Isoform vornehmlich mit der Stärkesynthese in Verbindung steht, während die SUS1 eine Rolle bei der Bereitstellung von Substraten für die Cellulosesynthese spielt.

Eine Möglichkeit zur Klärung der Rolle der einzelnen Saccharose-Synthase-Isoformen bietet die Herstellung und Analyse rekombinanter Proteine. Daher werden in dem folgenden Ergebnisteil zunächst die katalytischen und assoziativen Eigenschaften von heterolog exprimierten SUS-Isoformen aus Mais in Abhängigkeit von Metaboliten und posttranslationalen Modifikationen untersucht. In einem anschließenden Kapitel werden Versuchsansätze zur Identifizierung der Aktinbindestelle im SUS-Protein beschrieben.

Isoform-spezifische Interaktionspartner von SUS, die an der Regulation der Aktivität und subzellulären Lokalisation beteiligt sein könnten, sollten mit dem Hefe-2-Hybrid-System als *in vivo* Methode identifiziert und mit biochemischen Methoden verifiziert werden. Aufgrund der Aktinbindefähigkeit von SUS und der in Mais noch lückenhaften Informationen über Aktinbindepoteine (ABPs) wurde zusätzlich mit dem 2-Hybrid-System eine cDNA-Bank nach ABPs durchmustert. Die gefundenen Interaktionen wurden zum Teil verifiziert.

3.1 Klonierung und Expression von Saccharose-Synthase-Isoformen

Die Nomenklatur der Saccharose-Synthasen aus Mais ist nicht eindeutig. In der Literatur wird die Gesamtheit der Isoenzyme uneinheitlich mit „SUS“, „SuSy“ oder „SS“ abgekürzt. Um Unklarheiten zu vermeiden, werden die in dieser Arbeit verwendeten Gen- und Proteinnamen jeder Isoform entsprechend zur Übersicht in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Synonyme der Saccharose-Synthase Isoformen.

Isoform	Genname	Proteinname	
SUS1	<i>SS2, Sus1</i>	SUS1, SS2, SuSy	Sucrose-UDP-Glycosyltransferase 2
SH1	<i>ss1, Sh1, sh1</i>	SH1, SS1, Shrunken 1	Sucrose-UDP-Glycosyltransferase 1
SuS3	<i>SuS3, Sus3</i>	SuS3	Sucrose-UDP-Glycosyltransferase

3.1.1 Isolierung von SUS-cDNAs mittels RT-PCR

Für die Analyse der katalytischen und assoziativen Eigenschaften der rekombinanten SUS-Proteine sowie für die Verwendung der Isoformen als *Bait*-Proteine im 2-Hybrid-System (vgl. 3.5) wurden zunächst die korrespondierenden cDNAs durch RT-PCR amplifiziert und in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert.

Als DNA-Template für die jeweilige RT-PCR dienten zuvor revers-transkribierte mRNAs aus Wurzel- und Sprossgewebe aerob und anaerob kultivierter Maispflanzen. Der verwendete RT-Primer Poly-dT₍₁₈₋₂₃₎ ermöglichte, dass nahezu alle synthetisierten Erststrang-cDNAs in voller Länge vorlagen. Unter Verwendung von hochreiner mRNA aerober Maiskeimlinge konnte mittels RT-PCR die kodierende DNA-Sequenz des SUS1-Proteins (SuSy) mit dem Primern *SuSyEcoRI*_fw und *SuSyBamHI*_rev amplifiziert werden (Abb. 3.1.1, Spur 1). Wurde revers-transkribierte RNA aus anaerobem Gewebe als Template verwendet, konnte lediglich eine schwache Bande in der erwarteten Größe von 2,4 kb im Agarosegel visualisiert werden (Spur 2). Die Negativkontrolle (RNA-Template ohne reverse Transkription) stellte sicher, dass keine Kontamination mit genomischer DNA vorlag.

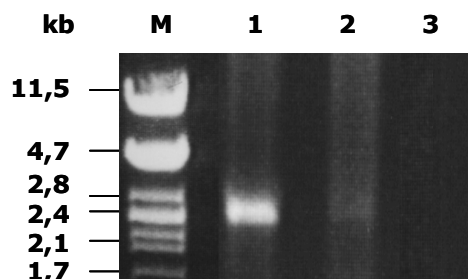


Abb. 3.1.1: Agarosegelelektrophorese zur Analyse des RT-PCR-Produktes von SUS1.
M: Lambda DNA/*Pst*I, 2; Spur 1: aerobe RNA; Spur 2: anaerobe RNA; Spur 3: aerobe RNA ohne Synthese des ersten Stranges cDNA (Reverse Transkription).

Die für die Shrunken-1-Isoform (SH1) kodierende Sequenz konnte hingegen mit den Primern *SH1EcoRI*_fw und *SH1BamHI*_rev nicht aus der mRNA aerober Gewebe über RT-PCR amplifiziert werden. Da die SUS-Gene, die durch Verarmung an Kohlenhydraten

hochreguliert werden, gleichzeitig unter Sauerstoffmangel bzw. anaeroben Bedingungen induziert werden, wurde spezifisch mRNA aus anaerob und etioliert kultivierten Wurzeln und Keimlingen isoliert. Die Verwendung der Wurzel-RNA und der Keimlings-RNA als Template für die RT-PCR führten zur Amplifikation des SH1-DNA-Fragments (Abb. 3.1.2).

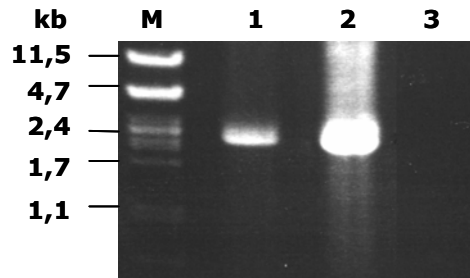


Abb. 3.1.2: Agarosegelelektrophorese zur Analyse des RT-PCR-Produktes von SH1.
M: Lambda DNA/*Pst*I, 24; Spur 1: anaerobe Wurzel-RNA, Spur 2: anaerobe Keimlings-RNA, Spur 3: anaerobe RNA ohne Synthese des ersten Stranges cDNA (Reverse Transkription).

Die putative SuS3-Isoform wurde im Hefe-2-Hybrid-System sowohl als Interaktionspartner der SUS1-Isoform als auch der SH1-Isoform identifiziert (vgl. 3.5.3). Eine Präferenz für eine dieser Isoformen konnte hierdurch nicht ermittelt werden.

Die RT-PCR mit der Primerkombination *SuS3Bgl2-fw* und *SuS3EcoRI-rev* konnte Amplifikate auf anaerober und aerober Keimlings-RNA erzielen, wobei hier die Präferenz auf RNA aus anaerobem Gewebe lag (Abb. 3.1.3).

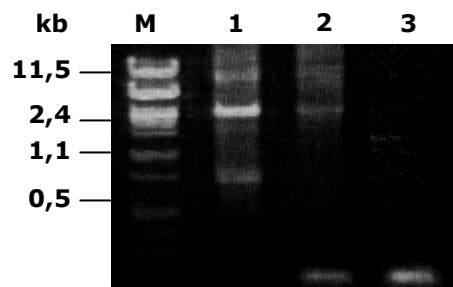


Abb. 3.1.3: Agarosegelelektrophorese zur Analyse des RT-PCR-Produktes von SuS3.
M: Lambda DNA/*Pst*I, 24; Spur 1: anaerobe Keimlings-RNA; Spur 2: aerobe Keimlings-RNA; Spur 3: anaerobe RNA ohne Synthese des ersten Stranges cDNA (Reverse Transkription).

Die in der Agarosegelelektrophorese bei ca. 2,4 kb dominierenden Banden jeder Isoform wurden aus den Gelen eluiert, als Zwischenkonstrukte in den Vektor pDrive kloniert und vollständig sequenziert.

3.1.2 Herstellung der *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Expressionskonstrukte

Die bei der RT-PCR (vgl. 3.1.1) verwendeten Primerkombinationen fügten den Fragmenten N- und C-terminal Erkennungssequenzen für divergente Restriktionsendonukleasen ein.

Diese wurden für die gerichtete Subklonierung der cDNA-Sequenzen in den Vektor pGBKT7 genutzt. Die erhaltenen Plasmidkonstrukte, SuSy-pGBKT7, Sh1-pGBKT7 und SuS3-pGBKT7 sind unter 3.5.3 schematisch dargestellt.

Für die Expression von SUS-Protein in *E. coli* wurden die Vektoren pRSET-A und -B verwendet, die das exprimierte Protein mit einem N-terminalen 6xHis-*tag* fusionierten. Dieser His-*tag* ermöglichte die affinitätschromatographische Reinigung der Proteine über Ni-Chelat-Säulen sowie die Detektion mit His-*tag*-spezifischen Antikörpern. Zuvor wurde mittels PCR eine Schnittstelle im 5'-Bereich vor dem Start-ATG derart generiert, dass das nachfolgend kodierte Protein im gleichen Leseraster mit dem His-*tag* am N-Terminus vorlag. Am 3'-Ende wurde hinter dem jeweiligen Stoppcodon eine *Eco RI*-Schnittstelle eingefügt, damit die gesamten kodierenden Sequenzen gerichtet in die entsprechend linearisierten Vektoren kloniert werden konnten. Die kodierende DNA-Sequenz des SUS1-Proteins (SuSy) lag in dem Expressionsvektor pREST-A vor (Plasmidkonstrukt: SuSy-wt). Zur Expression verwendete Klone wurden nach Restriktionskontrolle stets durch vollständige Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

3.1.3 Heterologe Expression und Reinigung der Saccharose-Synthase-Isoformen

Als Grundlage für weitergehende *in vitro*-Untersuchungen wurden die Proteine SUS1 und SuS3 mit Hilfe der Plasmide SuSy-wt und SuS3-pRSET-B in *E. coli* exprimiert (Abb. 3.1.4, *links*). Das monomere SUS1-Protein hat eine Länge von 816 Aminosäuren und ein theoretisches Molekulargewicht von 92,94 kDa. Die Sequenz des SuS3-Proteins umfasst 809 Aminosäuren, die ein errechnetes Molekulargewicht von 91,93 kDa je Untereinheit ergeben. Die rekombinanten Proteine enthielten neben den proteineigenen Aminosäuren zusätzlich die Sequenzerweiterung des 6xHis-*tags* und der Enterokinaschnittstelle. Damit ergab sich für die heterolog exprimierte Proteine ein um ca. 3,82 kDa erhöhtes Molekulargewicht. Die dominierenden Banden im Bereich von 97 kDa sollten demnach dem SUS-Protein entsprechen. Die rekombinanten SUS-Proteine waren löslich. Eine Proteinreinigung über His-*tag*-Affinitätschromatographie erzielte eine für biochemische Analysen ausreichende Reinheit der exprimierten Proteine (Abb. 3.1.4, *rechts*). Die Identität der exprimierten und gereinigten Proteine wurde durch Enzym-Assays überprüft (vgl. 3.2). Es wurden Proteinausbeuten von bis zu 8,5 mg pro Liter *E. coli*-Kultur erreicht. Die rekombinant exprimierten Proteine waren bei Lagerung bei 4°C nur wenige Tage stabil; sie denaturierten schnell, was sich durch Unlöslichkeit bzw. Ausfallen der Proteine bemerkbar machte. Versuche mit den Proteinen mussten innerhalb einer kurzen Zeitspanne durchgeführt werden, weil auch eine Lagerung bei -70°C in 50%-Glycerol zu starken Aktivitätseinbußen führte. Wegen des ständigen Bedarfs an gereinigtem Protein wurden im Abstand weniger Tage neue Expressionen und Reinigungen von SuSy-wt und SuS3 unternommen.

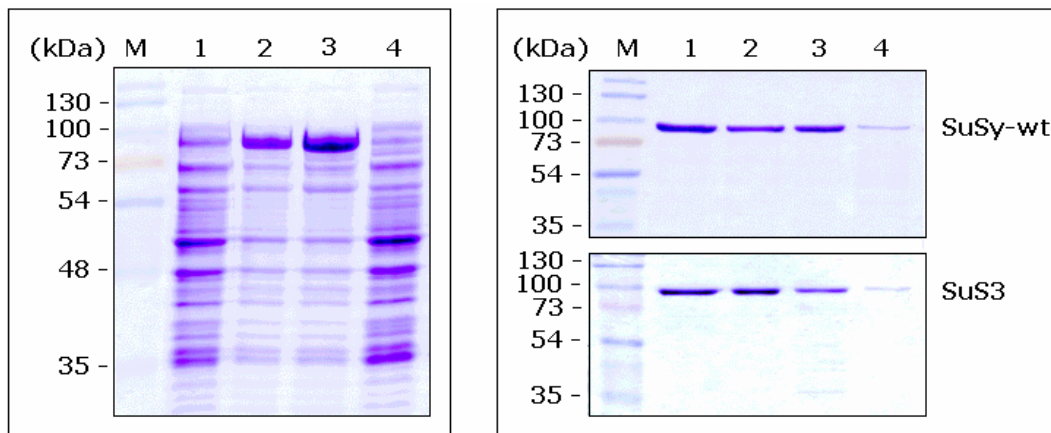


Abb. 3.1.4: Expression und Reinigung der heterolog exprimierten SUS-Proteine.

(links) Gesamtzellprotein nicht induzierter (Spur 1 und 4) und mit IPTG induzierter (Spur 2 und 3) *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen wurden in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Spur 1 und 2 zeigen SuSy-wt-Protein, Spur 3 und 4 korrespondieren zum SuS3-Protein. (rechts) Elutionsprofil der Protino[®]Ni-Matrix. Die Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Fraktionen 1 und 2 wurden für die weiterführenden biochemischen Experimente eingesetzt.

Sämtliche Expressionskonstrukte, die die kodierende Sequenz für die SUS-Isoform SH1 enthielten, führten zu keiner ausreichenden Proteinexpression in *E. coli*-Zellen. Optimierungsversuche hinsichtlich der Anzuchtbedingungen, z.B. Temperatur, aerobes und anaerobes Wachstum, Verwendung divergenter Vektorsysteme und *E. coli*-Stämme, blieben erfolglos.

3.2 Biochemische Charakterisierung rekombinanter SUS-Isoformen

Üblicherweise schließt sich nach der Isolierung und Klonierung der cDNA eines putativ kodierten Proteins dessen biochemische Charakterisierung an. Primärsequenzanalysen aller drei Isoformen zeigten, dass die theoretischen isoelektrischen Punkte (pI) sehr ähnlich sind. pI SuS3 = 6,14, pI SUS1 = 6,03 und pI SH1 = 5,96. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Isoformen zeigen sowohl innerhalb der Saccharose-Synthase-Domäne als auch in der Glycosyltransferase-Domäne die gleichen Homologie- und Identitätswerte. Die Identität der SuS3-Sequenz beträgt 68% zu SUS1 und 70% zu SH1, während SUS1 und SH1 zu 80% identisch sind. Die SuS3-Isoform weist höhere Homologien zu bekannten Saccharose-Synthasen dikotyler Pflanzen auf als zu den Isoformen aus Mais und anderen monokotylen Pflanzen (vgl. Anhang).

3.2.1 Katalytische Eigenschaften der Isoenzyme

Zunächst wurde die Primärsequenzanalyse bestätigt, indem gezeigt wurde, dass das heterolog erprimierte SuS3-Protein die katalytische Aktivität einer NDP-Glucose:D-Fructose-2- α -D-Glycosyltransferase besitzt (Abb. 3.2.1). Das bis dahin putative SuS3-Protein katalysiert *in vitro* die reversible Reaktion von Saccharose in Nukleotidphosphat-Glucose (NDP-Glu) und Fructose. Daraufhin wurde die im 2-Hybrid-Screen (vgl. 3.5.3) erhaltene

mRNA-Sequenz mit einer Länge von 2837 bp bei GenBank eingereicht. Der GenBank-Eintrag AY124703 umfasst den offenen Leserahmen von 2430 bp sowie 120 Nukleotide im 5'-untranslatierten Bereich und den 3'-untranslatierten Bereich einschließlich des Polyadenylierungssignales.

Da die rekombinanten Proteine SuSy-wt und SuS3 im gleichen Vektorsystem kloniert und exprimiert wurden, wird die biochemische Charakterisierung im Folgenden vergleichend dargestellt. Die Ergebnisse beziehen sich jeweils auf mindestens drei unabhängige Messungen. Die hier unter Standardbedingungen ermittelten V_{\max} -Werte weichen z.T. von den in anderen Kapiteln beschriebenen V_{\max} -Werten ab. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die Affinitätsreinigungen mit verschiedenen Nickel-Chelatoren (Ni^{2+} -NTA und Ni^{2+} -TED) durchgeführt wurden, was in Enzymchargen mit unterschiedlichen Grundaktivitäten resultierte. Zum anderen korrelierte die katalytische Spaltungsaktivität erheblich mit dem Redoxstatus (vgl. 3.4).

Die Saccharose-Spaltungsaktivität der Isoenzyme

Die Kinetik der enzymkatalysierten Saccharose-Spaltung beider rekombinanten Isoenzyme SuSy-wt und SuS3 hatte hyperbolischen Charakter (Abb. 3.2.1). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit lag mit 3,57 U/mg für SuSy-wt und 2,54 U/mg für SuS3 in der gleichen Größenordnung. Ebenso waren die Affinitäten der beiden Isoenzyme für das Substrat Saccharose mit K_m -Werten von 30-60 mM nicht sehr verschieden.

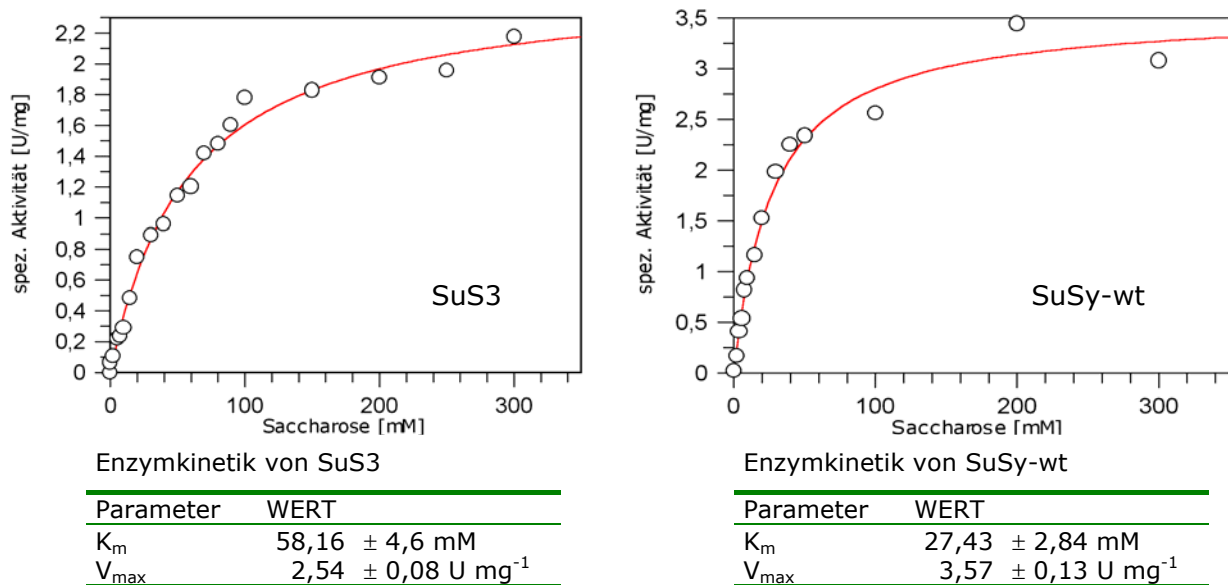


Abb. 3.2.1: Kinetik der Saccharose-Spaltreaktion von SUS-Isoenzymen.

SuS3 (*links*) und SuSy-wt (*rechts*). Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von Saccharose (0-300 mM), 1 mM UDP, 1 µg SuS3 oder SuSy-wt in 50 mM MOPS, pH 6,5, T= 25°C. Produktquantifizierung (UDP-Glc) über gekoppelten enzymatischen Test mit UDPG-DH. 1 U SUS entspricht der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1 µmol UDP-Glc pro Minute katalysiert.

pH-Optimum der enzymatischen Aktivität

Mit Hilfe der Isoelektrofokussierung gelang WOLOSUIK und PONTIS (1971) erstmals die Isolierung von zwei Isoenzymen (Form A und B) aus Artischocke. Form A und B eluierten bei einem pH-Wert von 5,5 bzw. 5,9. Die Substrataffinität der beiden Isoformen für Saccharose erwies sich als sehr variabel (Form A $K_m = 56$ mM; Form B $K_m = 200$ mM).

Weitere Arbeiten zeigten für die Isoenzyme der SUS Unterschiede in den pH-Optima der Synthese- und Spaltreaktion von Saccharose und in den kinetischen Konstanten. Die drei SUS-Isoenzyme aus Erbsenkeimlingen unterschieden sich in ihren pH-Optima, Temperaturstabilitäten und Substratspezifitäten (SUNG und SU, 1977). BUCZYNSKI et al. (1993) isolierten aus Zuckerrohr mit Hilfe von Immunaффinitätschromatografie zwei Isoenzyme, die sich in den kinetischen Parametern, insbesondere in Richtung der Synthese von Saccharose deutlich unterschieden. Der Vergleich der pH-Optima für die Saccharose-Spaltreaktion der rekombinanten Mais-Isoformen zeigte, dass SuS3 ein breiteres pH-Optimum besitzt als SuSy-wt (Abb. 3.2.2). Versuche zur Funktionalität der kürzlich identifizierten Isoform im sauren Milieu verliefen negativ. Es ist somit nicht davon auszugehen, dass die SuS3-Isoform als Pendant zur Saccharose-spaltenden, sauren Invertase anzusehen ist.

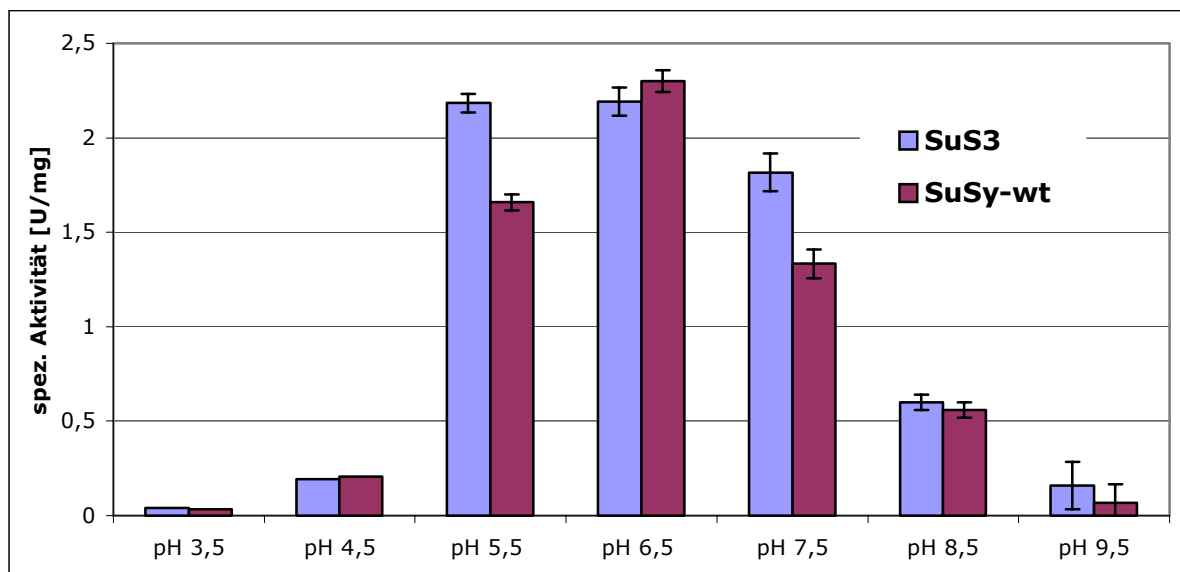


Abb. 3.2.2: pH-Optima der Saccharose-Spaltreaktion von SUS-Isoformen.

Spezifische Aktivität bei verschiedenen pH-Werten (3,5 - 9,5), 200 mM Saccharose, 1 mM UDP, 1 µg SuS3 oder SuSy-wt in 50 mM gepuffertem NaOAc/MES/Tris oder CHES, T= 25°C. UDP-Glc-Produktquantifizierung über gekoppelten enzymatischen Test mit UDPG-DH.

Substratspezifität der Isoenzyme

Kristallstrukturdaten, die wichtige Informationen zur Substratbindung, Substraterkennung und zum enzymatischen Reaktionsmechanismus liefern könnten, stehen derzeit für die Saccharose-Synthasen noch nicht zur Verfügung. Es wurde jedoch gezeigt, dass das Fehlen von 19 Aminosäuren am C-Terminus der Saccharose-Synthase aus Sojabohne zum Verlust der katalytischen Aktivität führt (ZHANG et al., 1999). Auch das katalytische Zentrum für die

Synthese von Saccharose ist nur wenig eingegrenzt. Durch einen Aminosäureaustausch im katalytisch aktiven Zentrum könnte die Substratspezifität verändert sein. SuS3 enthält in der hochkonservierten Region (P-297 bis Y-305) pflanzlicher Saccharose-Synthasen und Saccharose-Phosphat-Synthasen (SPS) einen Austausch an der Position 303 (Isoleucin statt Valin). SPSs haben hier ein Lysin als polare AS. Es wird spekuliert, dass die Anwesenheit einer neutralen Aminosäure an dieser Position in den Saccharose-Synthasen einer der Faktoren ist, der die Selektivität für Fructose gegenüber Fructose-6-Phosphat als Glycosyl-Akzeptor beeinflusst (SALVUCCI et al., 1995). Analysen der angrenzenden Region (I-272 bis L-319) in SuS3 zeigten keine signifikanten Homologieabweichungen zu bekannten Saccharose-Synthasen.

Hinsichtlich der Substratspezifität zur Bildung von UDP-Glucose unterschieden sich die rekombinanten SuS-Proteine nicht. Verschiedene Mono-, Di- und Trisaccharide wurden zur Bestimmung der Substratspezifität eingesetzt. Determiniert wurde die Bildung von UDP-Glucose unter Anwesenheit von UDP und folgender Zucker bzw. Zuckeralkohole: Arabinose, D(+)-Glucose, D(-)-Galactose, Fructose, Lactose, Maltose, Mannose, Palatinose, Raffinose, Ribose, Saccharose, Trehalose, Xylose, Sorbitol und, Myo-Inositol. Beide Proteine waren, wie erwartet, spezifisch für das Substrat Saccharose (Abb. 3.2.3) und zeigten zusätzlich eine geringe Affinität für Palatinose.

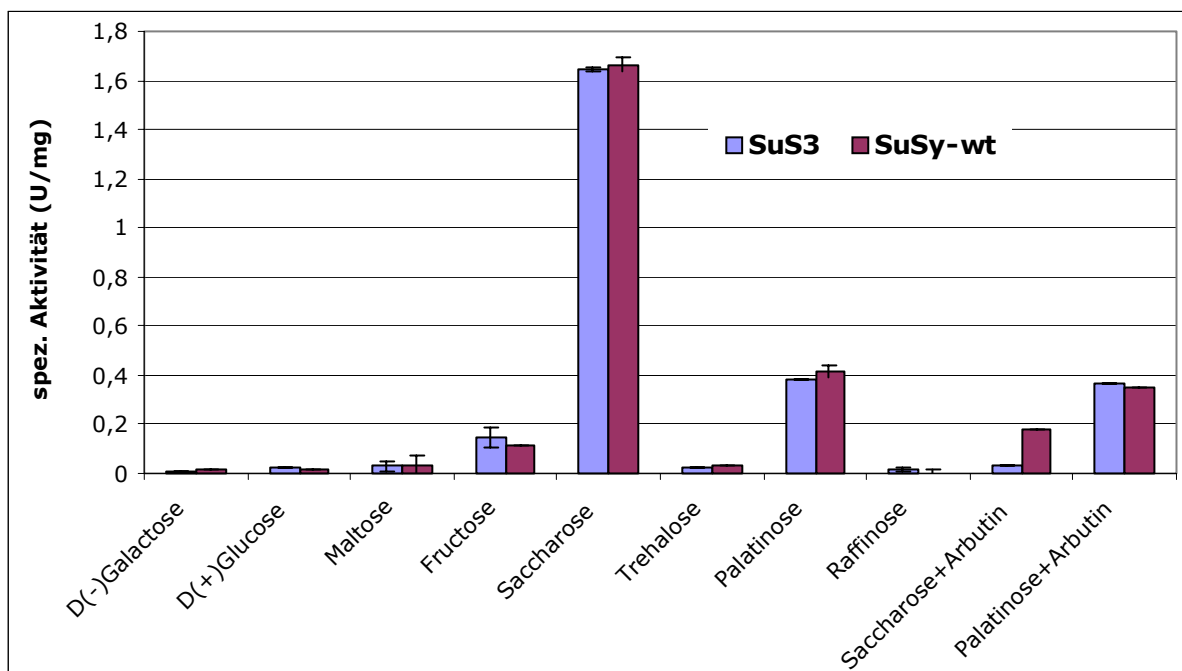


Abb. 3.2.3: Substratspezifität der SUS-Isoformen zur Synthese von UDP-Glucose.

Spezifische Aktivität in Gegenwart von 200 mM Mono-, Di- oder Trisacchariden, 1 mM UDP, \pm 10 mM Arbutin, 1 μ g SuS3 oder SuSy-wt in 50 mM MOPS-NaOH, pH 7,0, T= 25°C. Produktquantifizierung (UDP-Glc) über gekoppelten enzymatischen Test mit UDPG-DH.

Das phenolische Glykosid Arbutin, als für die Saccharose-Synthase spezifischer, streng kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von $1,6 \times 10^{-4}$ (vgl. 2.9.1.2), wurde den Kontrollproben mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die Spaltung von Saccharose konnte bei rekombinanter SuS3 und Susy-wt durch Arbutin inhibiert werden,

während die Verwertung von Palatinose in Anwesenheit von Arbutin nahezu unbeeinflusst blieb. Eine Autokatalyse von UDP und Palatinose zur Synthese von UDP-Glucose wurde in enzymfreien Kontrollansätzen nicht beobachtet. In der Literatur ist bislang noch ungeklärt, ob Arbutin an der Bindungstasche für das Nukleotid oder für die Fructose bindet. Bekannt ist jedoch, dass SPS und Invertase durch Arbutin nicht gehemmt werden (SLABNIK et al., 1968).

NDP als variabler Parameter

BAROJA-FERNANDEZ et al. (2003) zeigten, dass die Saccharose-Synthasen aus Kartoffel und Gerste eine signifikante Menge an ADP-Glucose für die Synthese von Stärke synthetisieren. Die K_m -Werte für ADP und UDP waren unter sättigenden Saccharose-Konzentrationen sehr ähnlich, während der V_{max} -Wert für UDP 1,5-fach höher war als für ADP. Stark verändert war die Affinität zu Saccharose in Anwesenheit von ADP und UDP. Für die Saccharose-Synthasen aus Mais wird postuliert, dass die SH1 Isoform vornehmlich Substrat für die Stärkesynthese liefert, während die SUS1-Isoform Substrat für die Zellwandsynthese synthetisiert. Um die SuS3-Isoform ggf. einem dieser Stoffwechselwege zuzuordnen zu können, wurden die kinetischen Parameter der rekombinanten Proteine bei variierenden Nukleotidphosphaten bestimmt (Tabelle 3.2). Determiniert wurde die entstandene Fructose. Die Nukleotidphosphat-Präferenz beider Enzyme nahm von UDP über ADP zu GDP ab. Beide Isoformen zeigten die höchste Affinität zu Saccharose und den höchsten V_{max} -Wert in Anwesenheit von UDP. Ebenso vermochten sie aber auch signifikante Mengen Saccharose unter Anwesenheit von ADP zu spalten. Während bei der SuS3-Isoform der K_m -Wert nur um gut 11% erhöht war, zeigte die rekombinante SUS1-Isoform (SuSy-wt) einen 4-fach höheren K_m -Wert. Unter sättigenden Konzentrationen an Saccharose lag die ADP- und UDP-abhängige Umsatzrate der SUS1-Isoform im Vergleich zu SuS3 jedoch jeweils höher. Die Spaltreaktion unter Anwesenheit aller getesteten Nukleotidphosphate konnte durch Arbutin zu 88-95% inhibiert werden.

Tabelle 3.2: NDP-Spezifität der SUS-Isoformen bei der Saccharose-Spaltreaktion.

Kinetischen Daten der Spaltreaktion bei variierenden Saccharose-Konzentrationen (0-300 mM).

Konstantes Substrat	SuS3		SuSy-wt	
	K_m [mM]	V_{max} [U mg ⁻¹]	K_m [mM]	V_{max} [U mg ⁻¹]
UDP [1 mM]	58,16 ± 4,6	2,54 ± 0,08	27,43 ± 2,84	3,57 ± 0,13
ADP [1 mM]	65,5 ± 3,7	1,09 ± 0,02	112,1 ± 33,71	2,21 ± 0,09
GDP [1 mM]	166,02 ± 26,47	0,65 ± 0,08	187,85 ± 31,94	0,6 ± 0,08

Saccharose-Synthese-Reaktion

Die in *E. coli* exprimierten Proteine SuS3 und SuSy-wt zeigten neben der vermutlich *in vivo* begünstigten Saccharose-Spaltungsaktivität auch in der Gegenrichtung katalytische Aktivität. Die Substratspezifität der Synthesereaktion wurde mit Nukleotidphosphat-Glucosen als variablen Parametern bestimmt. Die Fructose wurde mit einer Endkonzentration von 9,3 mM als sättigender, konstanter Parameter angenommen.

Der Nachweis der Enzymreaktion erfolgte durch die Determinierung des Syntheseproduktes Saccharose wie unter 2.9.1.1 beschrieben. Saccharose-Eichgeraden konnten durch die Formel $y = 1,3302x + 0,0088$ beschrieben werden. Für die lineare Regression wurde ein Wert von $R^2 = 0,9997$ erhalten. Beide Proteine zeigten in diesem Einsubstratmodell einen hyperbolischen Kurvenverlauf (Abb. 3.2.4). Zur Berechnung der kinetischen Daten wurde die Michaelis-Menten-Gleichung und der Lineweaver-Burk-Plot eingesetzt.

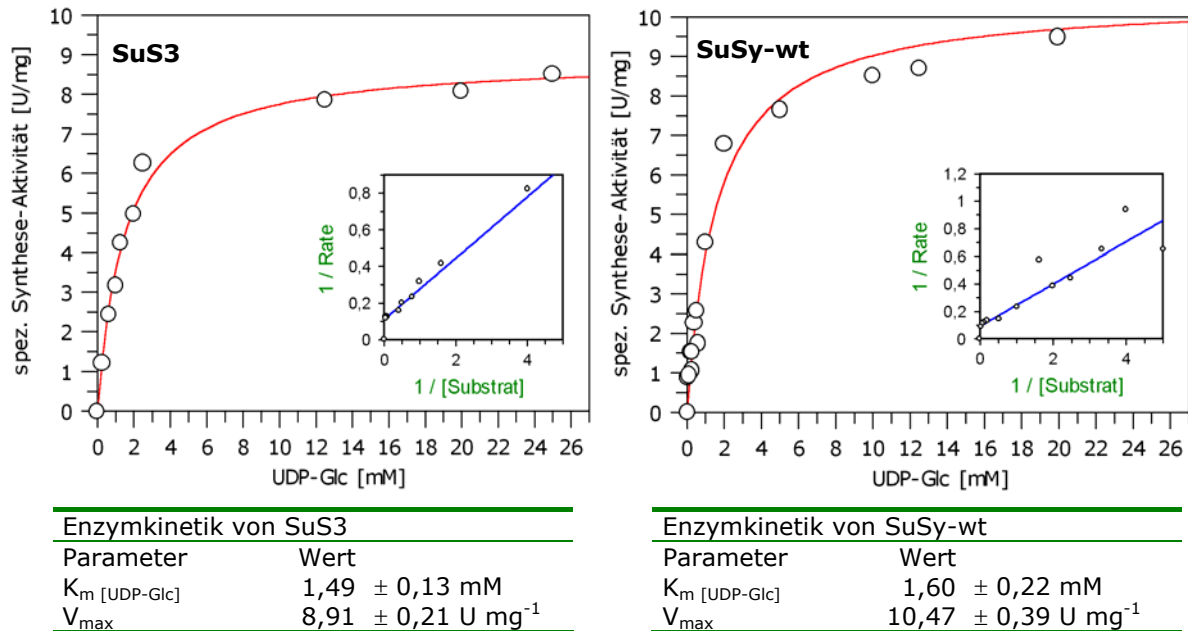


Abb. 3.2.4: Kinetik der Saccharose-Synthesereaktion von SUS-Isoformen.

SuS3 (*links*) und SuSy-wt (*rechts*). Spezifische Aktivität bei variierenden UDP-Glc-Konzentrationen (0-25 mM), konstant 9,3 mM Fructose, 1 μ g SuS3 oder SuSy-wt in 50 mM MOPS, pH 7,5, T= 25°C (Standard Synthese-Aktivitätsansatz). Quantifizierung der synthetisierten Saccharose durch „Anthrone-Methode“ (2.9.1.1).

Für die beiden rekombinanten Proteine ergaben sich die niedrigsten K_m -Werte und gleichzeitig die höchsten V_{max} -Werte bei Anwesenheit von UDP-Glucose als Substrat. Die Substratpräferenz beider Saccharose-Synthasen lag eindeutig bei UDP-Glucose. Die K_m - und V_{max} -Werte von SuSy-wt und SuS3 lagen in der gleichen Größenordnung. Verschiedene Autoren geben für SUS1 aus Kartoffel K_m -Werte (UDP-Gluc) von 0,6 mM (JAARMA und RYDSTRÖM, 1969) bis 5,9 mM (SLABNIK et al., 1968) an. Eine Produktinhibition durch UDP konnte für SuSy-wt und SuS3 nicht beobachtet werden. Durch den Zusatz von alkalischer Phosphatase wurde in Kontrollversuchen UDP dem Gleichgewicht entzogen. Eine infolgedessen beschleunigte Reaktion konnte nicht beobachtet werden. Die Nukleotidzucker, ADP-Glucose und GDP-Glucose konnten zwar *in vitro* ebenfalls von beiden rekombinanten Enzymen zur Saccharose-Synthese verwendet werden, jedoch waren die kinetischen Parameter signifikant verändert. Für SuSy-wt nahm die Affinität von UDP- über ADP- bis zu GDP-Glucose ab. Für SuS3 war die Selektivität für ADP- und GDP-Glucose weniger eindeutig (Tabelle 3.3). In Kartoffel wurden 10- bis 20-fach höhere Gehalte an UDP-Glucose als an ADP-Glucose gemessen. Die im Einsubstratmodell ermittelten K_m -Werte für ADP- und GDP-

Glucose beider Mais-Proteine lagen demnach fernab von physiologischen Bedingungen. Untersuchungen zur Kinetik und Substratspezifität des Akzeptorsubstrats (Fructose, Fructose-6-Phosphat oder z.B. das Saccharose-Analogon 1-Desoxy-1-fluorofructose) wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 3.3: Kinetische Charakteristika der Synthesereaktion von SuS3 und SuSy-wt.

Substrat	SuS3		SuSy-wt	
	K_m [mM]	V_{max} [U mg ⁻¹]	K_m [mM]	V_{max} [U mg ⁻¹]
UDP-Glc	1,49 ± 0,13	8,91 ± 0,21	1,60 ± 0,22	10,47 ± 0,39
ADP-Glc	12,83 ± 2,78	2,81 ± 0,19	11,33 ± 2,46	5,65 ± 0,51
GDP-Glc	9,63 ± 2,87	1,77 ± 0,18	21,48 ± 6,42	3,61 ± 0,54

3.2.2 Nachweis der Proteinphosphorylierung

Zusätzlich zur transkriptionalen Regulation wurde für SUS1-Protein aus Mais *in vivo* die Phosphorylierung durch eine Ca²⁺-abhängige Proteinkinase (CDPK, EC 2.7.1.37) in einer hochkonservierten, N-terminalen Sequenz gezeigt (HUBER et al., 1996). Diese posttranslationale Modifikation scheint an der Regulation der Enzymaktivität und/oder Lokalisation beteiligt zu sein (HUBER et al., 1996; WINTER et al., 1997; WINTER und HUBER, 2000). Die Konsensussequenz (hochkonservierte Erkennungssequenz) ist für diese Proteinkinase spezifisch. Der phosphorylierte Serinrest (Ser-15) wird von der Peptidsequenz RVL SRLHS¹⁵VRER umgeben, die mehrere positiv geladene Aminosäuren vor und hinter dem Serinrest enthält.

LOOG et al. (2000) zeigten die Substratspezifität der CDPK aus Maiskeimlingen im Vergleich zu anderen Ca²⁺-abhängigen Proteinkinasen, wie z.B. der Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) aus Säugetieren durch Peptidphosphorylierung. Unterschiedliche Peptidlängen mit und ohne Aminosäureaustausche an allen Positionen durch hydrophobe (Leu, Ala) und geladene (Arg, Glu) Aminosäuren wurden untersucht. Als Minimalpeptid, entsprechend der SUS1-Sequenz, wurde die Sequenz LARLHSVRER identifiziert. Das Konsensussequenz-Motif der CDPK-1 wurde mit A/L₋₅X₋₄R₋₃X₋₂X₋₁SX₊₁R₊₂Z₊₃R₊₄ spezifiziert. Dabei bezeichnet „X“ Positionen mit keiner strikten Aminosäurevorgabe und „Z“ eine Position, an der kein weiterer bzw. zusätzlicher Argininrest toleriert wird. Dieses Motif ist ähnlich zum analogen Motif der PKC von Säugetieren (K/RXXS/TXK/R), jedoch sehr verschieden zum Konsensusmotif RRXS/TX der PKA.

Sequenzvergleiche ergaben, dass der N-Terminus des SuS3-Isoenzym, ebenso wie das SUS1-Protein, einen Serinrest und die Konsensussequenz der CDPK enthält (Abb. 3.2.5).

SUS1	1	MGEGAG-DRVL <u>S</u> RHL <u>S</u> VRERIGDSL ^{SAHPNELVAVFTRLK} NL	41
SuS3	1	---MSAPK--LDRNP <u>S</u> IRDRVEDTLHAHRNELVALLSKYVNK	37
		* * * : * : * : * : : * * * * * : : : *	

Abb. 3.2.5: Sequenzalignment vom N-Terminus der SUS-Isoformen SUS1 und SuS3 aus Mais. Rot gekennzeichnet sind die Serinreste, die gemäß dem CDPK-Konsensusmotif phosphoryliert werden können, * = identische AS, : = homologe AS.

Aufgrund der Hinweise zur potenziellen Phosphorylierungsstelle am Ser-11 in SuS3 wurden Peptidphosphorylierungen in den Laboren von Steven C. Huber (NCSU, Raleigh †) durchgeführt. Die eingesetzten Peptide, SS4 und SS29, wurden durch Steven C. Huber synthetisiert und umfassten die N-terminalen Sequenzbereiche der Isoenzyme SUS1 und SuS3 aus Mais. Als calciumunabhängig, durch ZmPKIII (oder SnRK1) phosphorylierbares Kontrollpeptid wurde S158 eingesetzt. Das Peptid S158 entspricht der Sequenzumgebung des phosphorylierbaren Serinrestes (Ser-158) der Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) aus Spinat (Tab. 3.4). Calciumabhängig kann diese SPS-Phosphorylierungsstelle auch durch die monomere 45 kDa CDPK phosphoryliert werden (McMICHAEL et al., 1995a, 1995b; HUANG und HUBER, 2001).

Tabelle 3.4: Vergleich der umgebenden Aminosäuren relativ zum phosphorylierbaren Serin der CDPK-Konsensussequenz und der synthetischen Peptide.

Peptid	Position der AS relativ zum phosphorylierten Serin														
	P ₋₅	P ₋₄	P ₋₃	P ₋₂	P ₋₁	P ₀	P ₊₁	P ₊₂	P ₊₃	P ₊₄					
Konsensusmotif	A/L	X	R	X	X	S	X	R	Z	R					
SS4	R	V	L	S	R	L	H	S	V	R	E	R	I	G	D
SS29	A	P	k	L	D	R	N	P	S	I	R	D	R	V	
S158	K	G	R	M	R	R	I	S	S	V	E	M	M	K	

Die *in vitro*-Phosphorylierung wurde unter Verwendung von kinasehaltigen FPLC-Fraktionen und Zugabe von $\gamma^{32}\text{P}[\text{ATP}]$ sowie synthetischem Peptid in calciumhaltigen oder calciumdefizienten Puffern durchgeführt (vgl. 2.11.1). Die calciumabhängige oder -unabhängige Peptidphosphorylierung wurde mittels Flüssigszintillation bestimmt. Anhand von Kontrollpeptiden als Substrat wurde zunächst das FPLC-Elutionsprofil der endogenen Maiskinasen (CDPK-1, CDPK-2 und ZmPKIII) bestimmt (Abb. 3.2.6).

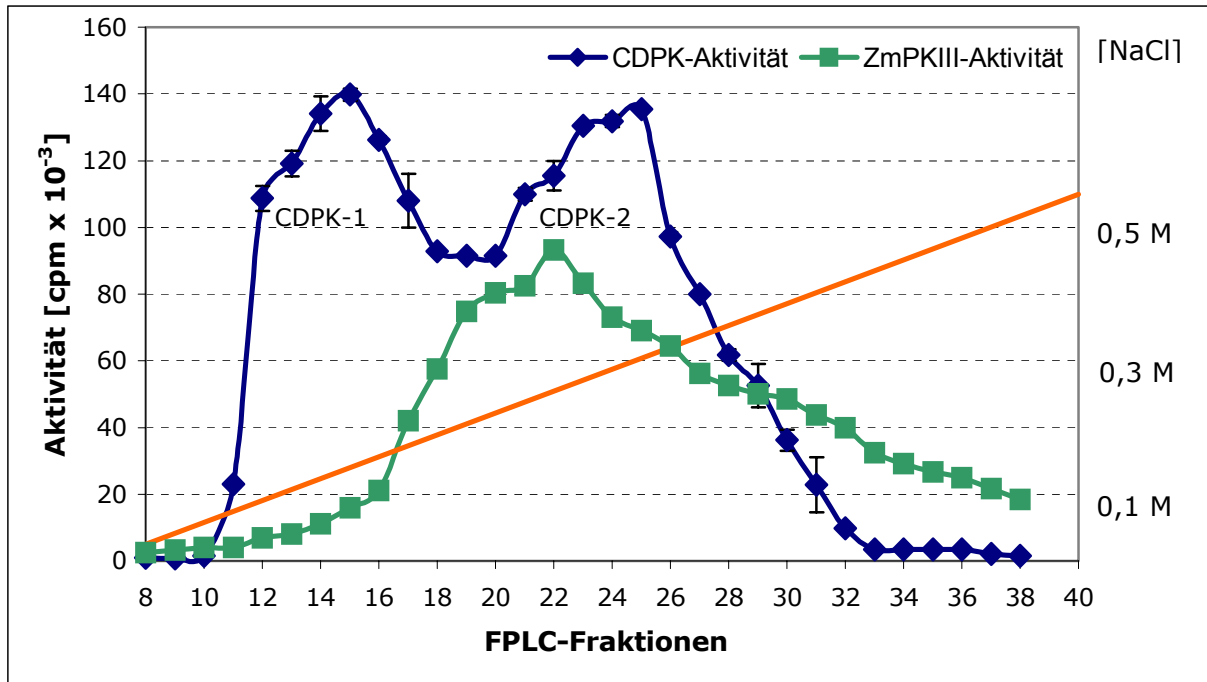


Abb. 3.2.6: FPLC-Elutionsprofil der Maiskinasen.

Phosphoryliert wurde durch die CDPK-1 und CDPK-2 (Calcium dependent protein kinase) aus *Z. mays* mit radioaktiv-markiertem [γ -³²P]-ATP als Substrat. Diese calciumabhängigen Kinasen eluierten als aktive Monomere (ca. 45 kDa) bei der Ionenaustausch-Chromatographie über Resource Q (vgl. 2.8.4.6) in getrennten Fraktionen im Bereich von ~12-35% Puffer B, was einer NaCl-Konzentration von 120-350 mM entsprach. Die ZmPKIII (oder SnRK1) co-eluierte als Enzymkomplex (150 kDa) hauptsächlich mit der CDPK-2.

Die Quantifizierung der katalytischen SUS-Aktivität in den einzelnen Chromatographie-Fractionen zeigte, dass die Fraktionen mit höchster CDPK-1-Kinaseaktivität gleichzeitig die höchste Saccharose-Spaltungsaktivität besaßen. SDS-PAGE-Analysen von je 10 μ l FPLC-Fraktion bestätigten die quantitative Anreicherung von nativem SUS-Protein in den Fraktionen 13-17 (Abb. 3.2.7), die mit der Enzymaktivität positiv korrelierte.

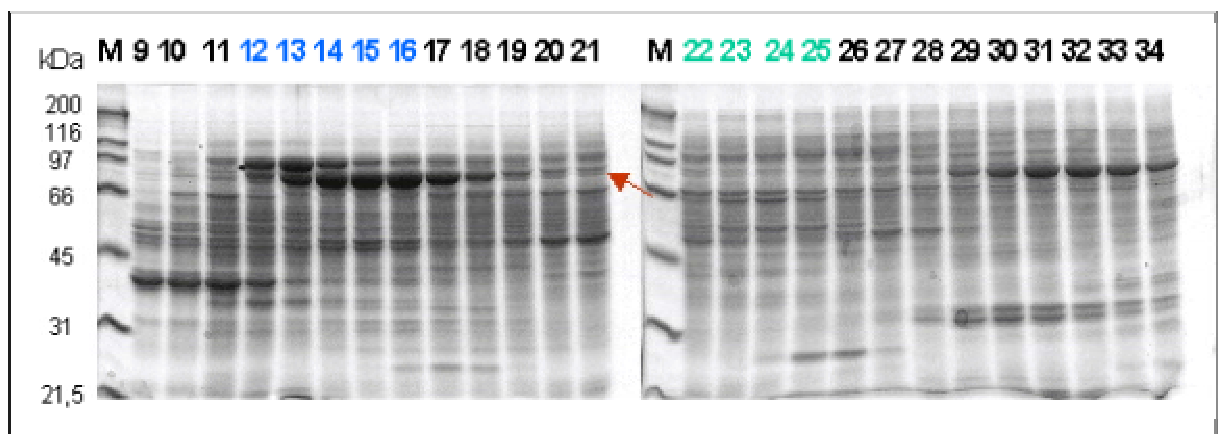


Abb. 3.2.7: SDS-Gelelektrophorese des FPLC-Elutionsprofils zur Anreicherung von Kinasen.

FPLC-(Anionenaustausch) zur Anreicherung von CDPK-1, CDPK-2 und nativem SUS. Konzentrierter und fraktionierter Proteinextrakt aus Mais wurde auf eine FPLC-ResourceQ-Säule gegeben. Gebundene Proteine wurden durch einen linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die Fraktionen wurden bezüglich Saccharose-Synthase- und Kinaseaktivität untersucht.

Die Quantifizierung von inkorporiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zeigte, dass die Peptide SS4 und SS29 *in vitro* als Substrat für maisendogene Kinasen fungieren können (Abb. 3.2.8). Das Muster der SS29- und SS4-Phosphorylierung in Relation zu den kinasehaltigen FPLC-Fractionen war vergleichbar. Die Amplitude des eingebauten ATPs war hingegen im Falle des SUS1-analogen SS4-Peptids deutlich höher als für SS29.

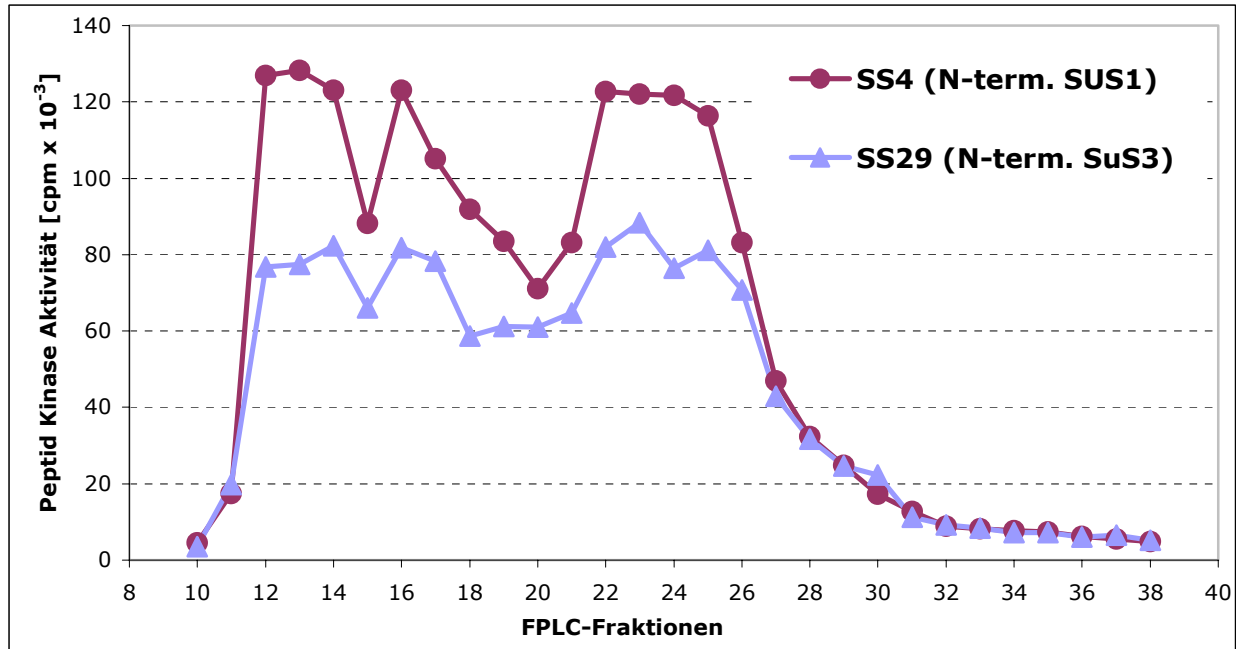


Abb. 3.2.8: Calciumabhängige Phosphorylierung N-terminaler Peptide divergenter Saccharose-Synthase-Isoformen. Peptidphosphorylierung von SS4 und SS29 wurden durch kinasehaltige FPLC-Fractionen (Abb. 3.2.7) unter Anwesenheit von Calcium und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ für 10 min durchgeführt. Determiniert wurde die Inkorporation von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ von je 30 μl pro 40 μl Ansatz.

Das Phosphorylierungsmuster korrelierte weitgehend mit dem FPLC-Elutionsprofil der CDPKs (Abb. 3.2.6). Das starke Absinken des Signals in Fraktion 15 ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Dominanz des co-eluierten SUS-Proteins zurückzuführen. Das native Protein konkurrierte mit dem synthetischen Peptidsubstrat, ging jedoch nicht im entsprechenden Maße eine Bindung mit der P81-Matrix ein. Diese erste Phosphorylierung wurde unter Anwesenheit von Calcium durchgeführt. Um zu spezifizieren, für welchen Kinasetyp das SS29 Peptid als Substrat dienen kann, wurde die Phosphorylierung in An- und Abwesenheit von Calcium durchgeführt. Als Kontrollpeptid wurde S158 eingesetzt, welches calciumunabhängig durch die ZmPKIII phosphoryliert werden kann. EGTA wurde den calciumdefizienten Proben zugesetzt, um das inhärente Calcium der Proben zu komplexieren. Die Quantifizierung des inkorporierten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATPs}$ in Relation zu den FPLC-Proben zeigte eine deutliche calciumabhängige Peptidphosphorylierung der Substrate SS4 und SS29 durch die CDPK-1. Im Elutionsbereich der CDPK-2 und ZmPKIII waren die Signale unter Anwesenheit von Calcium 3-4-fach höher als unter Abwesenheit. Die Präferenz lag auch hier, wenngleich weniger deutlich, auf dem calciumabhängigen Phosphorylierungsmodus. Die Signalamplituden der SS4- und SS29-Phosphorylierung lagen in diesem Versuchsansatz jeweils in der gleichen Größenordnung.

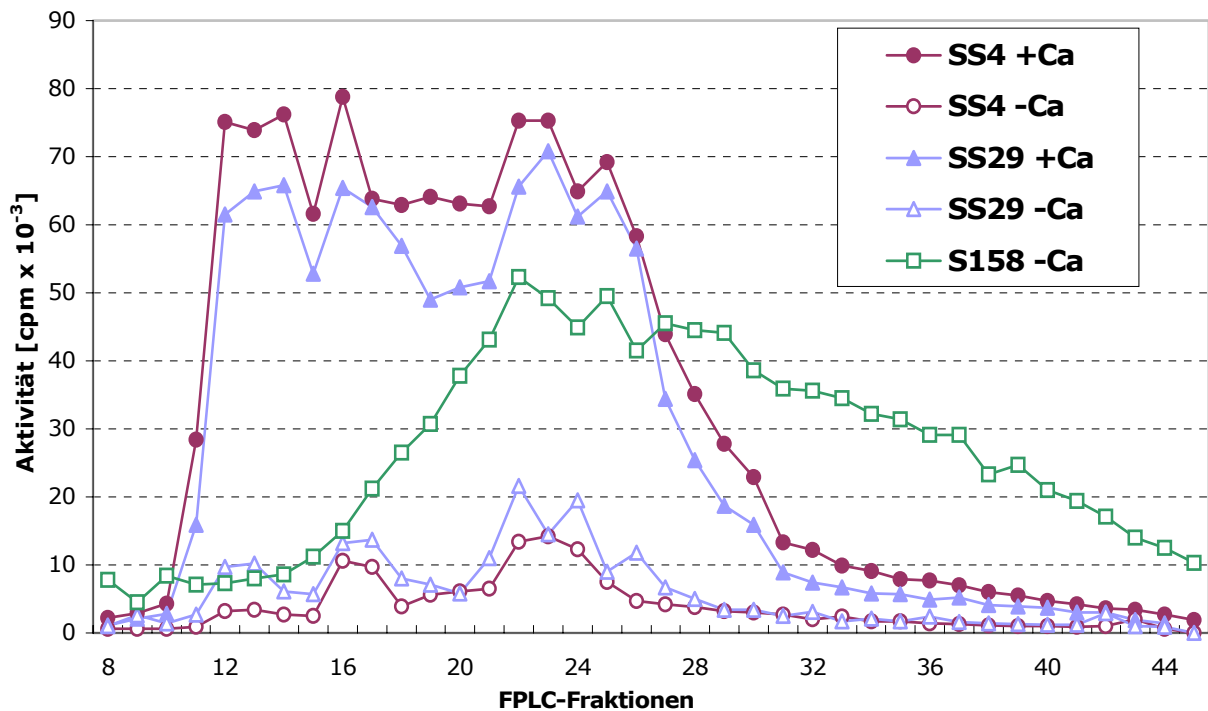


Abb. 3.2.9: Phosphorylierung synthetischer Peptide durch Mais-Kinaseaktivität in Abhängigkeit von Calcium.

Die Ergebnisse der Peptidphosphorylierung deuten daraufhin, dass die SuS3 aus Mais ebenso calciumabhängig am N-Terminus phosphoryliert werden kann wie die SUS1-Isoform. Literaturdaten (HUANG und HUBER, 2001) zeigten den negativen Einfluss eines Prolins an der Position -4 relativ zum Serinrest bezüglich der Phosphorylierbarkeit durch CDPK. Die Phosphorylierung durch die SnRK1 war davon unbeeinflusst. Die SuS3-Sequenz enthält Prolin an Position -1 und -7. Dies könnte das abgeschwächte Inkorporationssignal erklären.

3.2.3 Immunologischer Nachweis des SuS3-Proteins

Nahezu zeitgleich mit der Identifizierung der SuS3-Isoform erbrachten CARLSON et al. (2002) den Beweis für die Existenz eines dritten Saccharose-Synthase-Gens in Mais. Die von den Autoren vorhergesagte Sequenz war am N-Terminus unvollständig. Das SuS3-Genprodukt wurde von den Autoren im Vergleich verschiedener Gewebe und Entwicklungsstadien als ubiquitär und konstant niedrig beschrieben.

Das rekombinante (*E. coli*) SuS3-Protein wurde für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers (Anti-SuS3) verwendet. Die Reaktion und Spezifität des Immunerums wurde im Immunblot mit Zellextrakten von *E. coli*, *S. tuberosum* und *Z. mays* getestet. Das ungereinigte Serum zeigte in den Pflanzenextrakten eine deutliche Immunreaktion mit Proteinen um 93 kDa. Zusätzlich wurden in sämtlichen Extrakten einige unspezifische Banden detektiert. Um einen isoformspezifischen Antikörper zu generieren, wurde das Immuneserum gegen die Gesamtheit der Proteine einer *E. coli*-Expressionskultur sowie rekombinantes SuSy-wt-Protein verarmt, wobei unspezifische Bindestellen abgesättigt

wurden (vgl. 2.8.3.6). Das gereinigte SuS3-Immuneserum wurde erneut mit verschiedenen Verdünnungen im Immunblot getestet (Abb. 3.2.10, oben). Mit Kartoffelrohextrakt (Spur 4) konnte keine Kreuzreaktion detektiert werden. Wie erwartet wurde im Gesamtzellextrakt der SuS3-exprimierenden *E. coli*-Kultur (Spur 1) eine dominante Bande um 96 kDa erkannt. Bei einer Verdünnung von 1:1000 wurden zusätzliche Banden mit kleineren Molekulargewichten erkannt, bei denen es sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte handelte. Im Extrakt von *E. coli*-Zellen, die SuSy-wt enthielten (Spur 3), wurde bei allen Verdünnungen nur das rekombinante Protein von ca. 97 kDa erkannt. Das erhaltene Signal war zwar deutlich abgeschwächt, aber die Kreuzreaktion des SuS3-Antikörpers mit dem SuSy-wt-Protein konnte nicht vollständig aufgehoben werden. Im Rohextrakt junger Maisblätter (Spur 2) erkannte der SuS3-Antikörper ein Polypeptid von ca. 73 kDa sowie eine schwächere Bande im Bereich von ca. 28 kDa. Das reife SuS3-Protein sollte jedoch im Molekulargewichtsbereich von 92 kDa detektiert werden. Zum Vergleich wurde nach dem „Strippen“ der Blotmembranen der monoklonale Antikörper, Anti-SuS-ct, in den gleichen Verdünnungen eingesetzt (Abb.3.2.10, unten). Dieser Antikörper erkannte im Maisextrakt (Spur 2) spezifisch ein Protein, das dem Molekulargewicht der Saccharose-Synthasen entsprach. Eine schwache Kreuzreaktion mit dem rekombinanten SuS3-Protein war auch hier bei allen getesteten Verdünnungen zu erkennen.

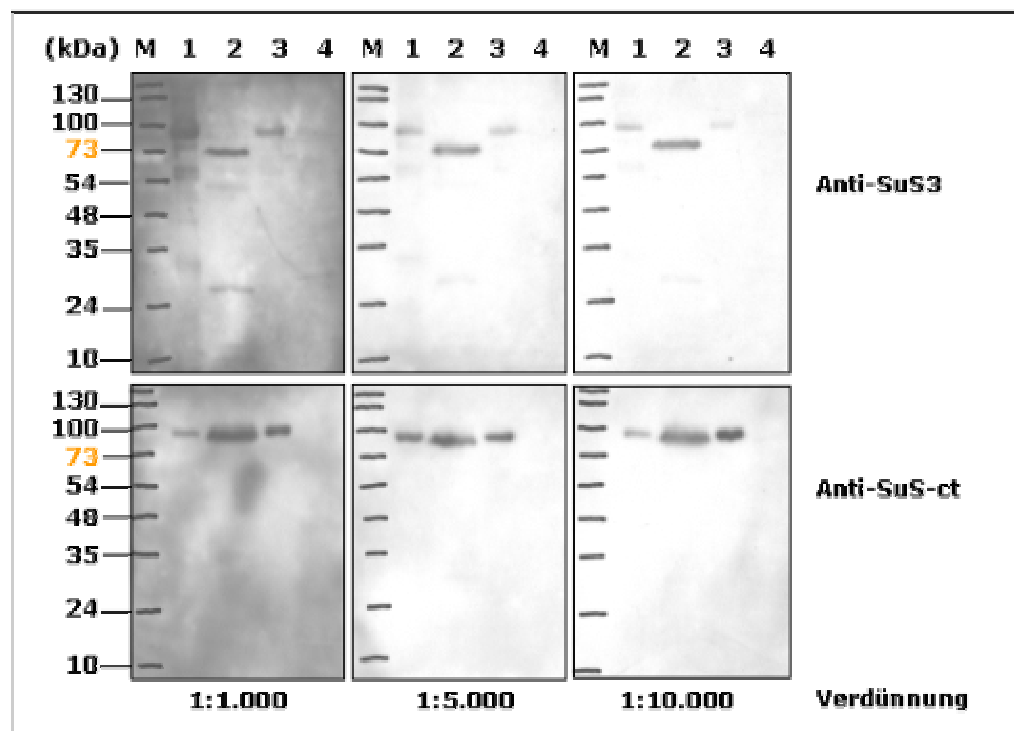


Abb. 3.2.10: Reaktion der Anti-SuS3- und Anti-SuS-ct-Antikörper im Immunblot von Mais-, Kartoffel- und SUS-exprimierenden *E. coli*-Extrakten.

Je 5 µg Gesamtprotein von SuS3 (Spur 1) und SuSy-wt (Spur 3) exprimierenden *E. Coli*-Zellen, Rohextrakt aus jungen Mais- (Spur 3) und Kartoffelblättern (Spur 4) wurde in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit den angegebenen SUS-Antikörpern inkubiert. Die Bindung wurde über einen HRP-gekoppelten sekundären Antikörper und anschließende ECL-Reaktion nachgewiesen.

Aufgrund der unterschiedlichen Spezifitäten der Antikörper Anti-SuS3 und Anti-SuS-ct wurde ein gewebespezifischer Western-Blot zur Analyse der Proteinexpression in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. Eine gewebespezifische Transkription von SuS3 wurde durch CARLSON et al. (2002) nicht festgestellt. Der Antikörper Anti-SuS-ct erkannte bei der Immunmarkierung von Gesamtprotein aller getesteten Gewebe spezifisch ein Protein, dessen molekulare Masse von ca. 94 kDa mit der theoretischen Masse der Saccharose-Synthasen übereinstimmt (Abb. 3.2.11). In jungem, etiolierem Sprossgewebe wurde eine zweite, niedermolekulare Bande mit ca. 70 kDa detektiert. Die Immunmarkierung bestätigte Literaturdaten, die hohe Gehalte der SUS1-Isoform im Elongationsgewebe wie Pulvinus (Blattpolster) (Spur 4) und geringere Mengen dieser Isoform im ausdifferenzierten Gewebe (Spur 5) zeigten. Der Anti-SuS3-Antikörper hingegen zeigte nur eine Immunreaktion mit Gewebe junger, etiolierter Keimlinge (Spur 2), im autotroph kultivierten Sprossgewebe (Spur 3) sowie im reifen Blatt (Spur 5). Wurzel-, Pulvinus- und Kolbengewebe erbrachten kein Signal. Auffällig war auch in diesem Versuch, dass die detektierten Proteine nicht mit der aus der Sequenz des SuS3-Proteins abgeleiteten theoretischen Masse übereinstimmten, sondern im Bereich von 70 kDa detektiert wurden. Möglich wäre, dass das Voll-längen-SuS3-Protein *in vivo* einem sehr schnellen „turn over“ unterworfen ist und somit nicht in detektierbaren Mengen vorliegt. CARLSON et al. (2002) hatten eine konstant niedrige Expression des SuS3-Proteins postuliert. Auffällig war die intensive Immunreaktion des SuS3-Antikörpers mit Blattgewebe (Spur 5) im Vergleich zum schwachen Signal des SuS-ct-Antikörpers.

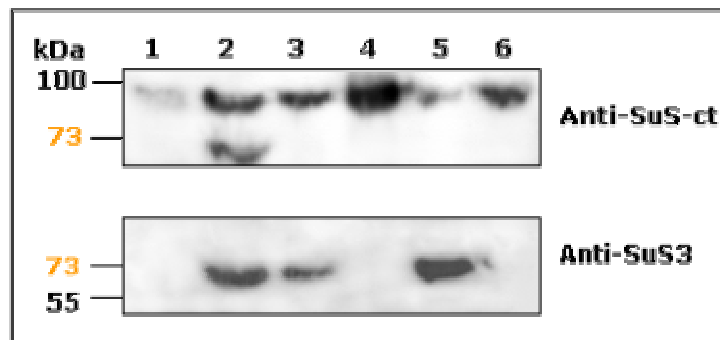


Abb. 3.2.11: Immunreaktion der Anti-SuS-ct und Anti-SuS3-Antikörper in verschiedenen Geweben von *Z. mays*.

Je 7 µg Gesamtprotein aus Mais wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und nacheinander mit den angegebenen SUS-Antikörpern mit einer Verdünnung von 1:10.000 inkubiert. Die Bindung wurde über einen HRP-gekoppelten sekundären Antikörper und anschließende ECL-Reaktion nachgewiesen. Spur 1: Wurzel; Spur 2: etiolierter Spross (5-8 cm); Spur 3: grüner Spross; Spur 4: Pulvinus; Spur 5: reifes Blatt; Spur 6: sich entwickelnder Kolben.

3.3. Die subzelluläre Lokalisation der Saccharose-Synthase

Saccharose-Synthase kommt als frei lösliches Enzym im Cytosol, assoziiert mit der Plasmamembran (CARLSON und CHOUREY, 1996; WINTER et al., 1997) und/oder am Aktin-Cytoskelett (WINTER et al., 1998) angelagert vor. Die Interaktionen mit der Plasmamembran und den Mikrofilamenten sind spezifisch und transient. Eine physiologische Relevanz ist für

keine dieser Assoziationen nachgewiesen. Der Mechanismus für die Membranassoziation (Protein-Protein-Wechselwirkung und/oder direkte Bindung) ist unbekannt, ebenso wie für die Interaktion der Saccharose-Synthase mit Aktinfilamenten; jedoch wird der reversiblen Phosphorylierung der Saccharose-Synthase sowie der metabolischen Regulation durch lösliche Zucker eine Bedeutung zugeordnet.

Untersuchungen an rekombinantem und nativem SUS-Protein sollten dazu dienen, die regulatorischen Mechanismen und physiologischen Bedingungen, die die Lokalisation der Saccharose-Synthase in der Zelle bestimmen, zu identifizieren. Im Wesentlichen wurden zwei Strategien zur Analyse der Protein-Protein-Interaktionen verfolgt. Zum einen die Co-Sedimentationsstudien als anerkannte *in vitro*-Methode und zum anderen Hefe-2-Hybrid-Analysen als *in vivo*-Ansatz.

3.3.1 Die Saccharose-Synthase als Aktin-Bindeprotein

In vitro-Untersuchungen von WINTER et al. (1998) zeigten, dass die „lösliche“, nicht membrangebundene Form der Saccharose-Synthase aus Maispulvinus nachweislich befähigt ist, mit dem pflanzlichen Aktin-Cytoskelett zu interagieren. Bei diesen Versuchen wurde keine strikte Differenzierung nach Isoformen und Phosphorylierungsgrad vorgenommen.

3.3.1.1. Induktion der SUS-Aktinbindung durch Zucker

Eigene Versuche (Abb. 3.3.1) bestätigten die Assoziation nativ gereinigter Saccharose-Synthase mit Muskel-Aktin aus Kaninchen unter Anwesenheit verschiedener Zucker. Die Aktinbindung des nativ gereinigten Proteins wurde durch Di- und Trisaccharide verstärkt, jedoch nicht durch Monosaccharide in osmolaren Konzentrationen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zu früheren Versuchen von WINTER.

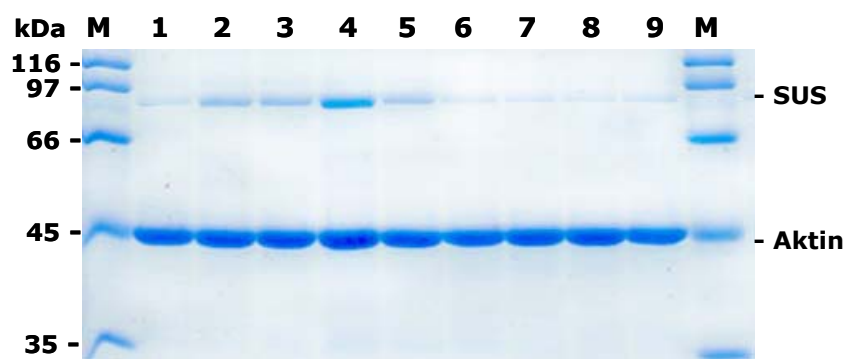


Abb. 3.3.1: Induktion der SUS-Aktinbindung durch verschiedene Zucker.

Nativ gereinigte Saccharose-Synthase (*Z. mays*) wurde in Gegenwart verschiedener Zucker mit Aktin (*O. cuniculus*) für 30 min co-polymerisiert und für 60 min mit 150.000g zentrifugiert. SDS-PAGE der Pelletfraktionen. Spur 1: ohne Zucker; Spur 2: 200 mM Saccharose; Spur 3: 200 mM Raffinose; Spur 4: 200 mM Maltose; Spur 5: 200 mM Palatinose, Spur 6: 200 mM Glucose; Spur 7: 200 mM Fructose; Spur 8: 100 mM Cellobiose; Spur 9: 200 mM Glucose und 200 mM Fructose.

Während die katalytische Spaltaktivität des Enzyms selektiv für Saccharose als Substrat ist, kann die Bindung des Enzyms an Aktinfilamente *in vitro* durch Saccharose, Raffinose,

Maltose und Palatinose begünstigt werden (Tabelle 3.5). Da Raffinose, Maltose und Palatinose keine kompetitiven Inhibitoren der SUS-Spaltungsaktivität sind, wohl aber ebenso wie Saccharose die Aktinbindung von SUS induzierten, liegt die Existenz einer zweiten, regulatorischen Zuckerbindestelle nahe. Besonders auffällig war die sehr hohe Löslichkeit des mit Maltose inkubierten SUS-Proteins in aktinfreien Proben. Während in An- und Abwesenheit aller weiteren Zucker etwa $3,1 \pm 0,77$ % des Enzyms auch ohne Zugabe von Aktin im Ultrazentrifugationspellet präzipitierten, erniedrigte sich dieser Anteil bei Inkubation mit Maltose auf $< 1\%$.

Tabelle 3.5: Einfluss von Metaboliten auf die Bindung von nativer SUS an Aktin sowie auf die katalytische Aktivität. Die Daten sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. Die Quantifizierung der Aktinbindung erfolgte durch densitometrische Auswertung von Gelbanden sowie Analyse von Pellet- und Überstandfraktionen mittels ELISA.

Zuckerspezifität	nmol SUS/nmol Aktin (Monomere)	relative Änderung [%]	Spaltungsaktivität [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$]	relative Änderung [%]
Ohne	0,052	54	0,00	0
Sorbitol	0,061	58	0,00	0
Saccharose	0,108	100	4,81	100
Raffinose	0,112	108	0,03	0,6
Maltose	0,126	117	0,04	0,8
Palatinose	0,095	92	2,45	51
Glucose	0,042	42	0,06	1,2
Fructose	0,059	58	0,12	2,4

Im Gegensatz zur Saccharose sind cytosolische Konzentrationen von 200 mM für Maltose unphysiologisch. Versuche zur Bestimmung des K_i -Werts der Aktinbindung in Abhängigkeit von verschiedenen Zuckern zeigten, dass mit 100 mM Maltose (Endkonzentration) im Polymerisationsansatz die Aktinbindung bereits gesättigt war. Gleiche Konzentrationen an Saccharose reichten hingegen nicht zur Sättigung der Bindekapazität aus (Abb. 3.3.2). WINTER und HUBER (2000) beschrieben einen K_i -Wert für Saccharose von 112 mM. Im Vergleich zu zuckerfreien Proben konnten Maltosekonzentrationen von 0-30 mM die Aktinbindung nicht messbar begünstigen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass *in vivo* weitere Effektoren für eine durch Maltose vermittelte Aktinbindung unerlässlich sind oder die *in vitro*-Experimente hier artifizielle Ergebnisse lieferten.

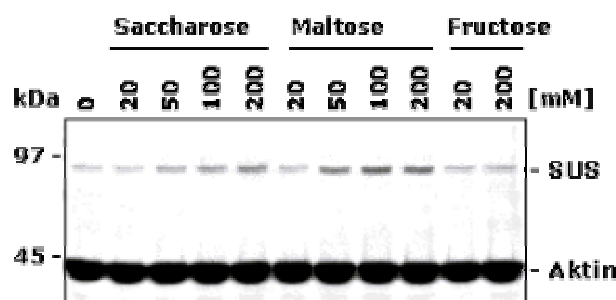


Abb. 3.3.2: Co-Polymerisation nativer Saccharose-Synthase (SUS) mit Aktin in Gegenwart verschiedener Zuckerkonzentrationen. SDS-PAGE der Pelletfraktionen.

3.3.1.2 Aktin-Assoziation und Phosphorylierung der Saccharose-Synthase

Im untersuchten Pulvinus-Gewebe wird hauptsächlich die SUS1-Isoform exprimiert. Im Zusammenhang mit der Aktin-Assoziation wird für die Phosphorylierung am Serinrest 15 (Ser-15) eine regulatorische Relevanz postuliert. Die Phosphorylierung am Ser-15 erfolgt calciumabhängig durch die CDPK; die entsprechende Phosphatase ist bislang unbekannt.

Weil neben der Phosphorylierung des N-Terminus am Ser-15 mindestens eine weitere Phosphorylierungsstelle (Ser-170) im SUS1-Protein enthalten ist (HARDIN et al., 2003) und eine *in vitro*-Dephosphorylierung durch Alkalische Phosphatase (AP) nur unvollständig abläuft, konnte keine eindeutige Aussage zum Effekt der Ser-15-Phosphorylierung des nativ gereinigten Enzyms auf die Aktinbindung getroffen werden. Mit EGTA und AP präinkubiertes SUS-Protein zeigte im Co-Polymerisationsansatz weiterhin die Fähigkeit, zuckerinduziert an Aktinfilamente zu binden.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Aktin-Assoziation und Phosphorylierung am Serinrest 15 selektiv zu betrachten, wurden Untersuchungen zur Aktin-Assoziation mit dem rekombinanten SuSy-wt sowie mit mutagenisiertem SuSy-wt-Protein durchgeführt. Das Ser-15 wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese gegen die kleine, ungeladene Aminosäure Alanin (S15A) und die sauren Aminosäuren Glutamat (S15E) und Aspartat (S15D) ausgetauscht. Die exprimierten, gereinigten und vom His-*tag* befreiten Proteine SuSy-wt und die mutagenisierten Proteine wurden in Bezug auf ihre katalytischen und assoziativen Eigenschaften untersucht.

Die am Serin-15 mutagenisierten Proteine zeigten zum rekombinanten Wildtyp (SuSy-wt) keine deutlichen Unterschiede in ihren kinetischen Parametern (Tabelle 3.6). Tendenziell wiesen die "phospho-mimic"-Mutanten (SuSy-D und SuSy-E) für die Spaltreaktion einen erhöhten V_{\max} -Wert im Vergleich zur "dephospho-mimic"-Mutante SuSy-A und dem Wildtyp auf. Die kinetischen Daten der aus Mais gereinigten, nativen (mit unbestimmtem Verhältnis von phospho-/dephospho)-SUS deuteten auf eine höhere Affinität für Saccharose und einen höheren V_{\max} als im gereinigten rekombinanten Wildtyp-Protein hin. Zusammengenommen ähneln sich die kinetischen Charakteristika von nativer SUS und von der SuSy-D-Mutante am meisten.

Tabelle 3.6: Kinetische Konstanten der Saccharose-Spaltungsaktivität und Saccharose-Syntheseaktivität von nativer SUS im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp und mutagenisierten SUS-Proteinen.

	Spaltungs-Aktivität		Synthese-Aktivität	
	K_m [mM]	V_{\max} [U mg ⁻¹]	K_m [mM]	V_{\max} [U mg ⁻¹]
native SUS	17,61 ± 1,76	4,81 ± 0,65	0,89 ± 0,13	10,88 ± 0,54
SuSy-wt	27,43 ± 2,84	3,57 ± 0,13	1,60 ± 0,22	10,47 ± 0,39
SuSy-D	12,83 ± 2,78	4,56 ± 0,09	1,41 ± 0,12	9,90 ± 0,25
SuSy-E	31,66 ± 2,83	3,94 ± 0,29	0,99 ± 0,17	8,35 ± 0,42
SuSy-A	24,54 ± 3,04	3,23 ± 0,13	1,47 ± 0,17	10,10 ± 0,35

Die rekombinanten SUS-Proteine, Wildtyp und Ser-15-Mutanten, binden an filamentösem Aktin. Eine Zeitkinetik der Assoziation zeigte eine gesättigte Bindung bereits nach etwa 10 Minuten. Im Vergleich zu nativer SUS vermochten der rekombinante Wildtyp (SuSy-wt) und die Mutanten auch zu einem deutlichen Anteil Zucker-unabhängig an filamentösem Aktin zu binden. Auf den Einfluss von intrazellulären Bedingungen, wie Ionenstärke, pH-Wert und Proteinkonzentration, auf die Aktinbindeaffinitäten beteiligter Proteine wurde bereits von CLARKE und MASTERS (1975) hingewiesen. Eben diese Abhängigkeit macht Aktinbindeproteine (ABPs) zu geeigneten Kandidaten für Cytoskelett-vermittelte Eingriffe in verschiedene Signal-Übertragungsprozesse. Die Assoziation der rekombinanten SUS-Proteine war unter Standardbedingungen (LSB-Puffer ohne Saccharose) mit etwa 0,064 nmol/nmol Aktin (Monomer) gesättigt. Durch Erhöhung des Proteingehalts auf bis zu 0,5 nmol SUS-Protein pro nmol Aktin im Co-Polymerisationsansatz konnte zwar eine leicht gesteigerte Assoziation erzielt werden, diese war jedoch als unspezifisch anzusehen. Ausserdem führten derart hohe Proteinkonzentrationen zur vermehrten Präzipitation des SUS-Proteins in aktinfreien Proben (Abb. 3.3.3).

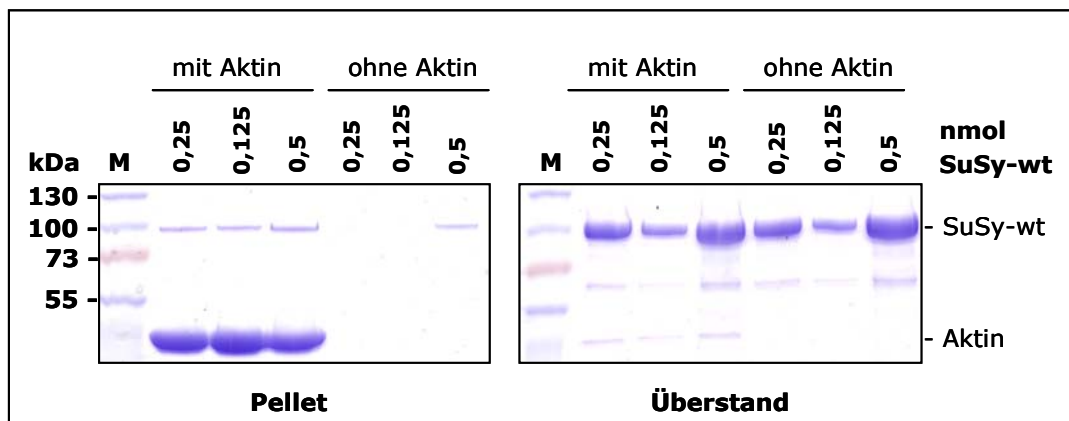


Abb. 3.3.3: Co-Polymerisation rekombinanter Saccharose-Synthase mit Aktin in molaren Verhältnissen oberhalb der Assoziationssättigung. In einem Probenvolumen von 200 μ l wurden 0,125-0,5 nmol SuSy-wt mit und ohne 1 nmol Aktin co-polymerisiert. 12%-SDS-PAGE der Pellet- und Überstandfraktionen nach der Ultrazentrifugation.

Ein mutagenese-spezifischer Effekt der Zucker-Induktion auf die Aktinbindung konnte nicht festgestellt werden. Alle rekombinanten SUS-Proteine zeigten eine generell erhöhte Bindeaffinität zu Aktin in Anwesenheit von Zucker. Eine Spezifität für Mono-, Di- oder Trisaccharide konnte auch nach Korrektur durch die Kontrollen weder für die „phospho“-Mutanten noch für den Wildtyp eindeutig im ELISA quantifiziert werden. Der reine Ladungseintrag am Serin-15 durch Asparagin- oder Glutaminsäure scheint als alleiniger Faktor nicht ausreichend zu sein für eine veränderte Aktinaffinität.

Als weiterer Ansatz, um den Einfluss einer Phosphorylierung des SUS-Proteins auf die Aktinbindung zu untersuchen, wurde *in vitro*-phosphoryliertes, rekombinantes SuSy-wt-Protein sowie dessen Mutanten (SuSy-A, S170A und S15/170A) zur Co-Polymerisation mit Aktin eingesetzt (vgl. 2.11.2). SuSy-wt wird durch die *in vitro*-Phosphorylierung sowohl am Serin 15 als auch am Serin 170 phosphoryliert (HARDIN et al., 2003), wobei die

Phosphorylierung am Serin 170 jedoch nur ca. 30% beträgt. Die SuSy-A wird aufgrund der Alaninsubstitution nicht am N-Terminus phosphoryliert, während die S170A-Mutante aus dem gleichen Grund nicht am Serin 170, aber am Serin 15, phosphoryliert werden kann (HARDIN et al., 2004). In der Doppelmutante S15/170A sind beide bekannten CDPK-Phosphorylierungsstellen ausgetauscht. Die über eine Anionenaustauscher-Matrix gereinigte CDPK trug keine detektierbaren Mengen an SUS-Protein in den Versuchansatz ein. Western-Blot-Analysen der Pellet- und Überstandfraktionen (Abb. 3.3.4) zeigten für phosphoryliertes SuSy-A und S170A eine abgeschwächte Aktinbindefähigkeit. Der Wildtyp und die Doppelmutante hingegen assoziierten unabhängig von einer Phosphorylierung gleichmäßig mit Aktinfilamenten. Die Doppelmutante S15/170A unterschied sich in ihrer katalytischen Aktivität kaum von allen anderen SUS-Mutanten, zeigte aber eine generell verminderte Aktin-Assoziation.

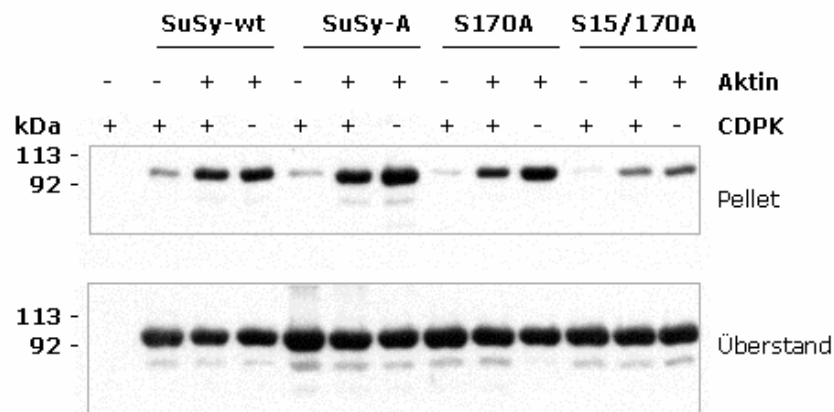


Abb. 3.3.4: Einfluss der *in vitro*-Phosphorylierung von SUS-Protein auf die Aktinbindung. Phosphoryliertes oder unphosphoryliertes rekombinantes SUS-Protein wurde mit Aktin für 30 min co-polymerisiert und 60 min lang mit 150.000g zentrifugiert. Western-Blot-Analyse der Pellet- und Überstand-Fraktionen mit dem Anti-SuS-ct-Antikörper.

Da kein abschließendes Ergebnis zum Einfluss der Ser-15-Phosphorylierung auf die Aktin-Assoziation des SUS-Proteins gefunden werden konnte, wurden alle nachfolgenden Versuche zur Metabolit-Regulation des SUS-Proteins mit dem rekombinanten Wildtyp durchgeführt.

3.3.1.4 Einfluss der Aktinbindung auf die Enzymaktivität von SUS

Die zentrale Rolle von Saccharose als Substrat der Spaltreaktion und positiver Effektor der Aktinassoziation lenkte ein besonderes Augenmerk auf die Verknüpfung von katalytischer und assoziativer Aktivität der Saccharose-Synthase. Standardisierte Co-Polymerisationen von SuSy-wt mit Aktin wurden durch Zugabe verschiedener Metabolite, Effektoren und Inhibitoren modifiziert (vgl. 2.10.3). Alle Versuche wurden unter Einbezug enzym- oder aktindefizienter Blindproben mit mindestens drei unabhängigen Enzymchargen durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteingehalte in Überstand- und Pellet-Fraktionen nach der Co-Sedimentation erfolgte densitometrisch (2.8.2.3) und durch ELISA (2.8.3.7).

Ein signifikanter Anteil des rekombinanten SUS-Proteins assoziierte unabhängig von der Präsenz weiterer Metabolite an filamentösem Aktin. Versuchsbedingungen, die die katalytische Aktivität in Richtung der Saccharose-Spaltung begünstigen, erhöhten den Anteil des mit Aktin assoziierten Enzyms (Abb. 3.3.5). Das bevorzugte Nukleotidphosphat UDP führte in Gegenwart von Saccharose zu einer erhöhten Assoziation, während die Zugabe von Arbutin, neben der Inhibition der katalytischen auch die assoziative Aktivität des SUS-Proteins verringerte. Im Gegensatz zur etwa 90%igen Inhibition der Spaltreaktion in Anwesenheit von 10 mM Arbutin wurde das Assoziationsvermögen maximal zu etwa 50% vermindert. Arbutinkonzentrationen von bis zu 30 mM während der Präinkubation des SUS-Proteins sowie im Co-Polymerisationsansatz führten zu keiner weiteren Verminderung der Bindung. Die Polymerisations- und Sedimentationseigenschaften des verwendeten Aktins wurden durch die Versuchsanordnung nicht nachweislich beeinflusst.

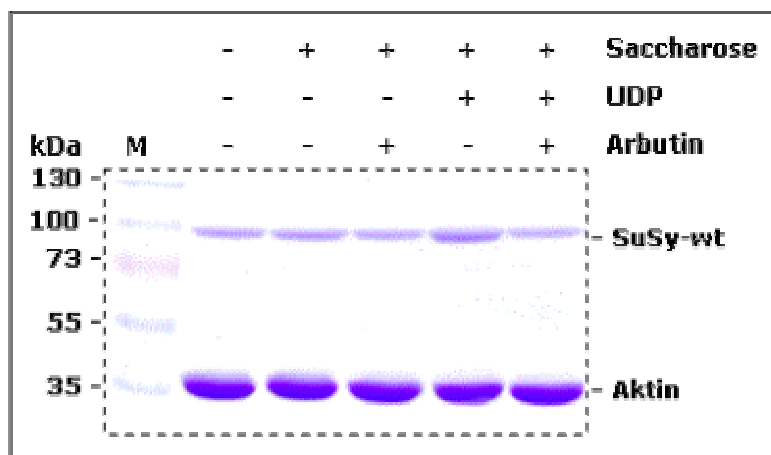


Abb. 3.3.5: Metabolische Regulation der Aktin-Assoziation von rekombinanter SUS.

Die Co-Polymerisation von SuSy-wt und Aktin wurde wie unter 2.10.3 beschrieben durchgeführt. SDS-PAGE der Pelletfraktion. Endkonzentrationen im Versuchsansatz: 1 mM UDP, 200 mM Saccharose, 10 mM Arbutin.

Eine erhöhte Bindeaffinität von SuSy-wt an Aktinfilamente konnte in Anwesenheit von UDP-Glucose, dem Produkt der Saccharose-Spaltung, nicht beobachtet werden (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Nukleotidspezifität der Aktinassoziation.

Die Menge Aktin-assoziiertes SuSy-wt in Anwesenheit von Saccharose entspricht 100%. Endkonzentrationen der getesteten Metabolite und Effektoren: 200 mM Saccharose, 1 mM UDP, 10 mM Arbutin, 15 mM UDP-Glucose. Der pH-Wert aller Stammlösungen betrug 7,5.

Metabolite und Effektoren	SuSy-wt/Aktin [nmol /nmol] (Monomere)	relative Änderung [%]
ohne	0,064	73
Saccharose	0,088	100
Saccharose + Arbutin	0,066	75
Saccharose + UDP	0,129	147
Saccharose + UDP + Arbutin	0,079	90
Saccharose + ADP	0,093	105
Saccharose + ADP + Arbutin	0,067	76
Saccharose + UDP-Glucose	0,087	99

Zusätzlich zur Quantifizierung der Aktin-Assoziation wurde die Saccharose-Spaltungsaktivität in An- und Abwesenheit von Aktin mit nativ gereinigter sowie rekombinanter Wildtyp Saccharose-Synthase getestet (vgl. 2.9.1.1). Aliquote Anteile der Co-Polymerisationsansätze wurden unmittelbar vor der Zentrifugation entnommen, denaturiert und zur Bestimmung der katalytischen Aktivität verwendet. Die Präsenz von Aktin stimulierte die katalytische Aktivität des nativen und rekombinanten SUS-Proteins (Abb. 3.3.6 und Abb. 3.3.7).

Einfluss von Aktin auf die katalytische Aktivität nativer Saccharose-Synthase

Die Menge an gebildeter UDP-Glucose in Anwesenheit von Aktin und 20 mM Saccharose war beim nativ gereinigten Protein mit 12,6% und beim rekombinanten mit etwa 15,8% deutlich erhöht. Während die V_{\max} -Werte für das native Enzym in aktindefizienten und -supplementierten Proben nahezu unverändert blieben, sank die Affinitätskonstante für Saccharose von 32,7 mM auf 25,2 mM. Gegenüber Standardmessungen der Enzymaktivität waren beide K_m -Werte erhöht; vermutlich aufgrund des vom Optimum abweichenden pH-Wertes im Reaktionsansatz. Bei zusätzlicher Zugabe von 200 mM Maltose wurde in den Aktinproben weniger UDP-Glucose gebildet als in den aktinfreien Kontrollen.



Abb. 3.3.6: Katalytische Aktivität von nativem SUS-Protein in An- und Abwesenheit von Aktin. Co-Polymerisationsproben mit und ohne 1 μ M Aktin, 0,25 μ M SUS, 200 mM Saccharose und 200 mM Maltose wurden mit 1 mM UDP, LSB-Puffer und Polymerisationsinduzierer für 10 min bei 25°C inkubiert. UDP-Glc-Produktquantifizierung über gekoppelten enzymatischen Test mit UDPG-DH. Die Mittelwerte stammen aus zwei unabhängigen Messungen.

Einfluss von Aktin auf die katalytische Aktivität rekombinanter SUS

Deutlichere Ergebnisse als das native SUS-Protein lieferte der rekombinante Wildtyp. Die signifikante Aktivierung der katalytischen Saccharose-Spaltungsaktivität durch Aktin manifestierte sich in deutlich erhöhtem V_{\max} -Wert im Vergleich zur aktinfreien Kontrolle (Abb. 3.3.7).

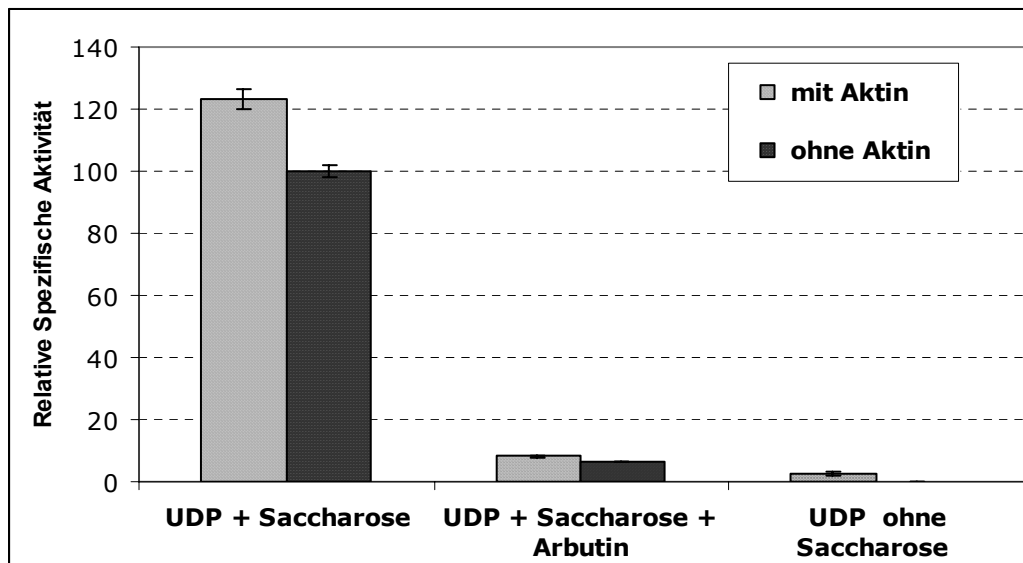


Abb. 3.3.7: Katalytische Aktivität von SuSy-wt in An- und Abwesenheit von Aktin.

Co-Polymerisationsproben mit und ohne 1 μM Aktin, 0,25 μM SuSy-wt, 200 mM Saccharose und 10 mM Arbutin wurden mit 1 mM UDP, LSB-Puffer und Polymerisationsinduzierer für 10 min bei 25°C inkubiert. UDP-Glc-Produktquantifizierung über gekoppelten enzymatischen Test mit UDPG-DH. Die Mittelwerte stammen aus zwei unabhängigen Messungen.

Eine Determinierung der katalytischen Aktivität bei einem molaren Verhältnis von 20:1 zwischen Aktin und SuSy-wt ergab einen um etwa 27% erhöhten V_{max} -Wert im Vergleich zur aktinfreien Probe. Unter diesen Bedingungen sollte eine vollständige Bindung der Saccharose-Synthase an Aktinfilamente erfolgt sein. Eine Quantifizierung der tatsächlichen Aktinbindung war erfolglos und bleibt daher spekulativ. Die Enzymaktivität in Richtung der Synthese von Saccharose in Abhängigkeit von der Aktin-Assoziation wurde nicht untersucht. Arbutin hemmte die katalytische Aktivität unabhängig von der Aktin-Assoziation. Die Saccharose-defizienten Proben zeigten, dass die Aktinstammlösung weitgehend frei von Saccharose war und keinen zusätzlichen Substratbeitrag für die Reaktion lieferte.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit neusten Literaturdaten. MATIC et al. (2004) ermittelten eine um 60% gesteigerte Enzymaktivität für das SuSy2 Protein aus Tabak (BY2-Zellen) in Anwesenheit von Aktin. Für die parallel untersuchte SuSy1-Isoform wurde hingegen eine um 17% verminderte katalytische Aktivität beschrieben.

3.3.1.5 Untersuchungen zur Aktinbindestelle in der Saccharose-Synthase

Neben der Bindung der einzelnen Monomere untereinander partizipiert Aktin an mehr Protein-Protein-Interaktionen als jedes andere Protein. Die Mehrheit der bekannten Aktin-Binde-Proteine (ABPs) kann in konservierte Gruppen eingeordnet werden. Strukturinformationen zu den gebildeten Komplexen aus Aktin und den entsprechenden Bindeproteinen sind bislang rar. Es wird postuliert, dass ABPs, einschließlich Aktin selbst, konservierte Bindemotive in ihrer Primärstruktur aufweisen, die die Interaktion vermitteln (als Überblick, DOMINGUEZ, 2004). Die Fähigkeit vieler Proteine, Aktin zu binden, kann auf einen zum Teil sehr kurzen, definierten Abschnitt in der Primärstruktur zurückgeführt

werden. Die Bindung von Glycogenin aus Kaninchenmuskel an Aktin wird zum Beispiel durch das Heptapeptid ($^{321}\text{DNIKKKL}^{327}$) vermittelt, welches homolog zu Bindedomänen von Cofilin, Actophorin, Tropomyosin und anderen ist (BAQUE et al., 1997).

Ein Ansatz, die putative Aktinbindestelle der Saccharose-Synthase zu identifizieren, war der Vergleich der Aminosäuresequenz von SUS1 aus Mais mit aktinbindenden Domänen bekannter aktinassoziierender Proteine. Die Primärsequenzanalyse zeigte mehrere Bereiche mit beträchtlichen Homologien zu bereits bekannten, anderen ABPs. Die Darstellung für zwei dieser Bereiche mit Homologie zu Aldolase aus Kaninchen und Mensch oder zu Aktin aus Mais und zu Arp2 (actin related protein 2) aus *Drosophila* ist exemplarisch (Abb. 3.3.8).

SUS1	225	A	D	T	P	Y	S	E	F	H	H	R	F	Q	E	L	G	L	E	242
Aldolase	33	A	D	E	S	T	G	S	I	A	K	R	L	Q	S	I	G	T	E	50
SUS1	375	E	N	G	I	V	R	K	W	I	S	R	F	E	V	W	P	Y	391	
Aktin	54	E	H	G	I	V	N	N	W	D	D	M	E	K	I	W	H	H	70	
SUS1	375	E	N	G	I	V	R	K	W	I	S	R	F	E	V	W	P	Y	391	
ARP2	76	E	N	G	V	V	R	N	W	D	D	M	C	H	V	W	E	Y	92	

Abb. 3.3.8: Sequenzbereiche von SUS1 mit Homologien zu bekannten Aktinbindedomänen.

Identische Aminosäurereste sind dunkelgrau und konservierte Austausche hellgrau hinterlegt.

SUS1 (*Z. mays*): AC:P49036; Aldolase (*O. cuniculus*): AC:ADRBA; Aktin (*Z. mays*): AC:AAB40; ARP2 (*D. melanogaster*): AC:P45888.

Zur Aminosäuresequenz von SUS1 homologe oder sehr ähnliche Peptide könnten in einem *in vitro*-Versuch mit dem Protein selbst um die Bindung an Aktinfilamente konkurrieren. Die Bindedomäne der tierischen Aldolase wurde so z.B. mit Hilfe eines synthetischen Peptides identifiziert (O'REILLY und CLARK, 1993).

Analog zu verschiedenen Sequenzabschnitten von SUS1 wurden Peptide variierender Länge von Prof. Dr. Steven C. Huber (NCSU, Raleigh) synthetisiert. Die Lokalisation der zu SUS1 korrespondierenden Peptide ist im Anhang dargestellt. In Tabelle 3.8 sind die Peptidsequenzen, ihre molare Masse sowie die korrespondierenden Bereiche im SUS1-Protein aufgelistet.

Tabelle 3.8: Sequenzen synthetischer Peptide, die hinsichtlich ihrer Aktin-Assoziation untersucht wurden.

Peptid	Sequenz	Länge	MW[Da]	Homologe/ identische Sequenz in SUS1
SS19	MGEGAGDRVLSRLHSVR _{NH2}	17mer	1839.4	M1-R17
SS22	IAEYNNAIPEAEREKLD _{NH2}	18mer	2102.5	I52-D69
SS20	RPSLSKSI GNGVQF _{NH2}	14mer	1488.9	R151-F164
NR28	QFLNRHLSSKLFHDK _{NH2}	15mer	1869.5	Q163-K177

SS26	LNDRI RSL SAL QGAL RKAEEHLSTLQAD _{NH2}	28mer	3147.5	L199-D226
SS23	ADTPYSEFHHRFQELGLE _{NH2}	18mer	2175.6	A225-E242
SS9	RFQELGLEKGGWDTAKRVK _{NH2}	19mer	2217.8	R235-Q235
SuSpH	CHILRVPFRTENGIVRKWISR _{NH2}	21mer	2563.4	C365-R385
SS12	GIVRKWISRFEVWPYL _{NH2}	16mer	2048.6	G377-L392
SS18	GVVRNWDDMCHVWEY _{NH2}	15mer	1908.2	G377-Y391
SS10	TDDVAHEIGELANPK _{NH2}	15mer	1607.9	T396-P411
SS21	DRVKNLTGLVELYGRNKR _{NH2}	18mer	2130.7	D585-R602
SuSCT	CKYVSNLERRETRYLEMLYA _{NH2}	21mer	2676.4	K776-A795

Um den Einfluss der Peptide selbst auf die Aktinbindung zu untersuchen, wurden zunächst die synthetischen Peptide in einem molaren Verhältnis von 20:1 mit Aktin co-polymerisiert und anschließend fraktionell zentrifugiert (vgl. 2.10.4). Die SDS-Gelanalyse der Zentrifugationsfraktionen ist in Abb. 3.3.9 dargestellt. Die Fraktion P I repräsentiert gebündeltes, quervernetztes oder in lockeren Maschen angeordnetes F-Aktin, welches schon bei Zentrifugation mit 10.000g zu einem farblosen Sediment mit gelartiger Konsistenz pelletiert. Im Überstand dieser Zentrifugation (S I-Fraktion) befinden sich depolymerisierte Aktinmonomere (G-Aktin) sowie unverzweigte Aktinfilamente. Während diese ungebündelten F-Aktinfäden bei anschließender Ultrazentrifugation pelletieren (P II-Fraktion), verbleibt G-Aktin weiterhin im Überstand (S II-Fraktion).

Durch Co-Polymerisationsexperimente konnte gezeigt werden, dass keines der dreizehn untersuchten synthetischen Peptide die Aktinpolymerisation inhibierte. Darüber hinaus besaßen sechs Peptide (SS19, SS26, SuSpH, SS12, SS21 und SuSCT) *in vitro* die Fähigkeit, Aktin zu bündeln (Abb. 3.3.10). Peptide, die bei einem molaren Verhältnis von 20:1 zwischen Peptid und Aktinmonomer in Co-Polymerisationsversuchen keine Aktinbündelung zeigten, wurden als inaktiv bezeichnet. Zu bedenken ist, dass ein synthetisches Peptid definierter Länge zwar in seiner Primärstruktur einem Aminosäuresequenzabschnitt des gesamten Proteins entspricht, aber aufgrund seiner Größe andere Sekundär- und Quartärstrukturen aufweisen kann. Somit kann selbst ein homologes Peptid nur annäherungsweise strukturelle Bereiche des vollständigen Proteins repräsentieren.

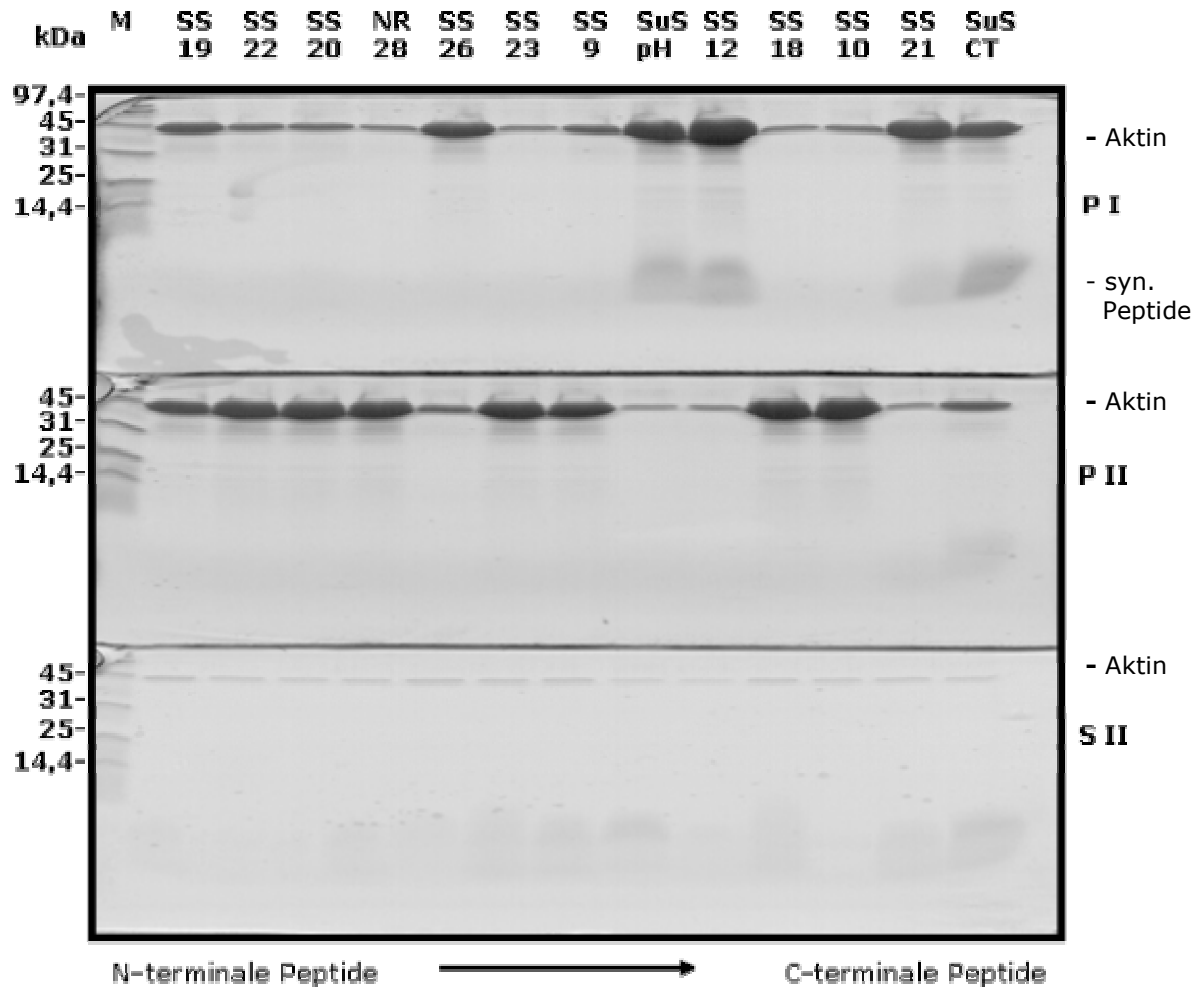


Abb.: 3.3.10: Co-Polymerisation synthetischer Peptide mit Aktin.

Je $\frac{3}{4}$ der Pelletfraktionen der differentiellen Zentrifugation mit 10.000g (P I) und 160.000 g (P II) sowie $\frac{1}{3}$ des Überstandes der Ultrazentrifugation (S II) wurden in einem 10%-igen SDS-Gel mit Coomassie gefärbt. Der Gelauftrag erfolgte derart, dass von links nach rechts die Peptid-Aktinproben entsprechend vom N- zum C-Terminus der homologen SUS1-Sequenz aufgetragen wurden.

Die synthetischen Peptide SuSpH, SS12 und SS21 binden denukleiertes und depolymerisiertes G-Aktin aus Kaninchenmuskel bei der Co-Polymerisation *in vitro* vollständig bei einem molaren Verhältnis von 2:1.

In weiteren Polymerisationsversuchen wurden die Bündel Eigenschaften der Peptide mit präpolymerisierten Aktinfilamenten untersucht. Die Spezifität der Peptide lag bei Anwesenheit von präpolymerisierten Aktinfilamenten wesentlich höher. Eine vollständige Bündelung der Filamente wurde für die Peptide SuSpH und SS12 bei einem molaren Verhältnis von 6:1 erreicht. Die restlichen elf Peptide, die zum Teil unter Anwesenheit von G-Aktin in der Co-Polymerisation eine Bündelaktivität zeigten (SS21), waren bei einem molaren Verhältnis von 20:1 in Gegenwart von F-Aktin inaktiv (Abb. 3.3.11). Das SUS-Protein alleine zeigte keine Bündelaktivität.


	Peptid	Beschreibung/Ähnlichkeit	Bündeleigenschaft	
			G-Aktin	F-Aktin
	SS19	Actinin	schwach aktiv	inaktiv
	SS22	Caldesmon	inaktiv	inaktiv
	SS20	Marcks	inaktiv	inaktiv
	NR28	Phosphorylierungsstelle (Serin 170)	inaktiv	inaktiv
	SS26	3x coiled-coil/Leucine Zipper	aktiv	inaktiv
	SS23	Aldolase	inaktiv	inaktiv
	SS 9		aktiv	inaktiv
	SuSpH	N-term. von SS12, putative Pleckstrin homolog (PH-) Domäne	voll aktiv	aktiv
	SS12	Aktin, Arp2	voll aktiv	aktiv
	SS18	Arp2, Maisaktin	inaktiv	inaktiv
	SS10	C-term. von SS12 lokalisiert	inaktiv	inaktiv
	SS21	Cortactin	aktiv	inaktiv
	SuSCT	SUS1 C-Terminus	schwach aktiv	inaktiv

Abb. 3.3.11: Ähnlichkeiten der synthetischen Peptide und Bündelaktivität in Co- und Postpolymerisationsversuchen. Eine Bündelaktivität bei einem molaren Verhältnis von größer als 20:1 wurde als inaktiv bewertet.

Kompetitionsversuche zwischen Saccharose-Synthase und synthetischen Peptiden um die Bindung an Aktin

Nachdem der Einfluss der synthetischen Peptide auf Aktin selbst untersucht wurde und gezeigt werden konnte, dass einige Peptidsequenzen von SUS1 an Aktin binden können, wurde das kompetitive Verhalten von allen 13 Peptiden mit nativ gereinigtem SUS-Protein untersucht. In verschiedenen Versuchsansätzen wurden entweder zunächst Peptid oder SUS-Protein mit Aktin inkubiert und anschließend entsprechend mit SUS-Protein oder Peptid komplettiert, oder das jeweilige Peptid und SUS-Protein wurden gleichzeitig dem Polymerisationsansatz zugefügt. Die Ansätze wurden als Co-Polymerisationsversuche mit G-Aktin und als Post-Polymerisationsversuche mit F-Aktin durchgeführt. Das molare Verhältnis zwischen Peptid, SUS und Aktin war jeweils 50:0,5:1. Keines der getesteten Peptide konnte in den Co-Polymerisationsversuchen bei gleichzeitiger Zugabe von SUS und Peptid die Bindung von SUS an Aktin inhibieren. SDS-PAGE-Analyse der Präpolymerisationsfraktionen zeigte nach Ultrazentrifugation mit und ohne Peptid gleiche Mengen an SUS-Protein in der Pelletfraktion. Das gleiche Bild zeigten Versuche, bei denen zunächst SUS mit Aktin copolymerisiert wurde und die Inkubation mit den jeweiligen Peptide in der Postpolymerisationsphase stattfand (nicht gezeigt).

Ein verändertes Assoziationsverhalten von nativer Saccharose-Synthase in Gegenwart der Peptide konnte nur mit einer optimierten Versuchsanordnung erreicht werden. Hierbei wurden präpolymerisierte Aktinfilamente zunächst mit den synthetischen Peptiden inkubiert, bevor der finale Ansatz mit SUS-Protein komplettiert wurde (Abb. 3.3.12). Das Peptid SS18

verdrängte verstärkt das SUS Protein in den frei löslichen Überstand. Eine vollständige Konkurrenz konnte durch Erhöhung der Peptidkonzentration nicht erreicht werden.

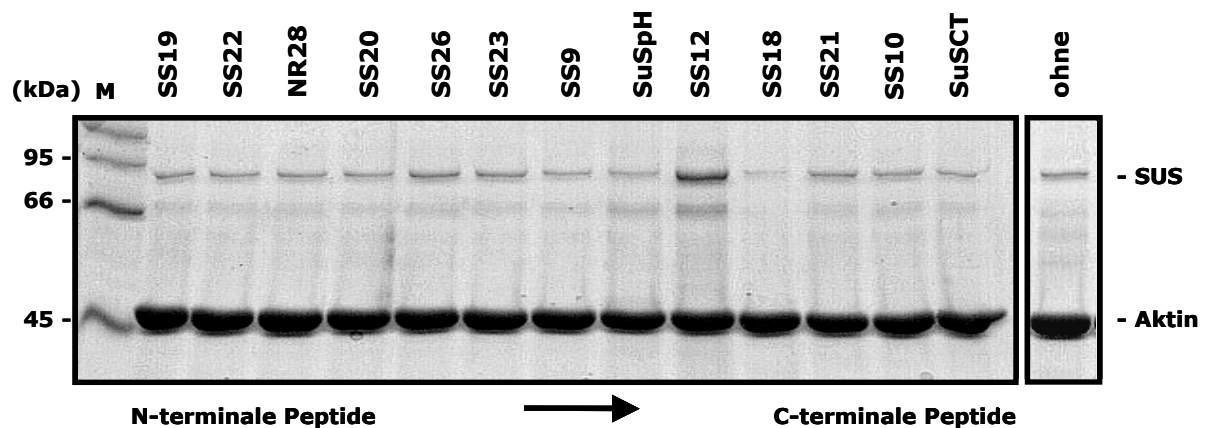


Abb. 3.3.12: Konkurrenz von SUS-homologen, synthetischen Peptiden und nativem SUS-Protein um die Bindung an Aktinfilamente.

SDS-PAGE der Pelletfraktionen nach Ultrazentrifugation. Der Probenauftrag erfolgte entsprechend der Lokalisation der korrespondierenden Sequenzen im SUS-Protein vom N- zum C-Terminus.

Das Peptid SS18 war identisch mit der Aminosäuresequenz (G78-Y92) des Arp2-Proteins von *Drosophila* und gleichzeitig stark homolog zu Maisaktin (G58-H70) sowie zu SUS1 (G377-Y391). Das zu den Aminosäuren G377-L392 in SUS1 identische Peptid SS12 ist dem Peptid SS18 zwar sehr ähnlich, zeigte hingegen keine kompetitive Hemmung der SUS-Aktin-Interaktion, sondern eher eine erhöhte Assoziation. Andere Peptide wie z.B. SS23 konnten nicht mit SUS um die Bindung an Aktin konkurrieren. SS23 ist homolog zu der durch O'REILLY und CLARK (1993) identifizierten Aktinbindedomäne in der Aldolase aus Kaninchen. Vor allem der in Aldolasen konservierte Aminosäure Arginin (R43) wird in der Literatur eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der Aktinassoziation zugesprochen. Eine Aldolasemutante mit dem Austausch des Arginins gegen Alanin (R42A) zeigte keine Bindung an F-Aktin. Dieses essentielle Arginin ist konserviert im homologen Sequenzbereich von SUS und im Peptid SS23 enthalten.

Weitere SDS-PAGE-Analysen sowie Immundetektion von Post-Polymerisationsfraktionen zeigten außerdem eine verstärkte Sedimentation von Proteinfragmenten der SUS in Anwesenheit der Peptide SS12 und SuSpH (Abb. 3.3.13). Der C-terminale Teil von SuSpH überlappt mit dem N-terminalen Sequenzbereich von SS12. In aktinfreien Kontrollproben konnte festgestellt werden, dass eben diese beiden Peptide nicht nur an Aktin, sondern auch an SUS selbst binden. Diese Bindung resultierte in einer Komplexbildung des SUS-Proteins. Der Protein-Peptidkomplex sedimentierte verstärkt während der Ultrazentrifugation. Eine Denaturierung des Proteins durch Inkubation mit dem SS12- und SuSpH-Peptid war auszuschließen, da kein deutlicher Verlust der katalytischen Aktivität zu beobachten war.

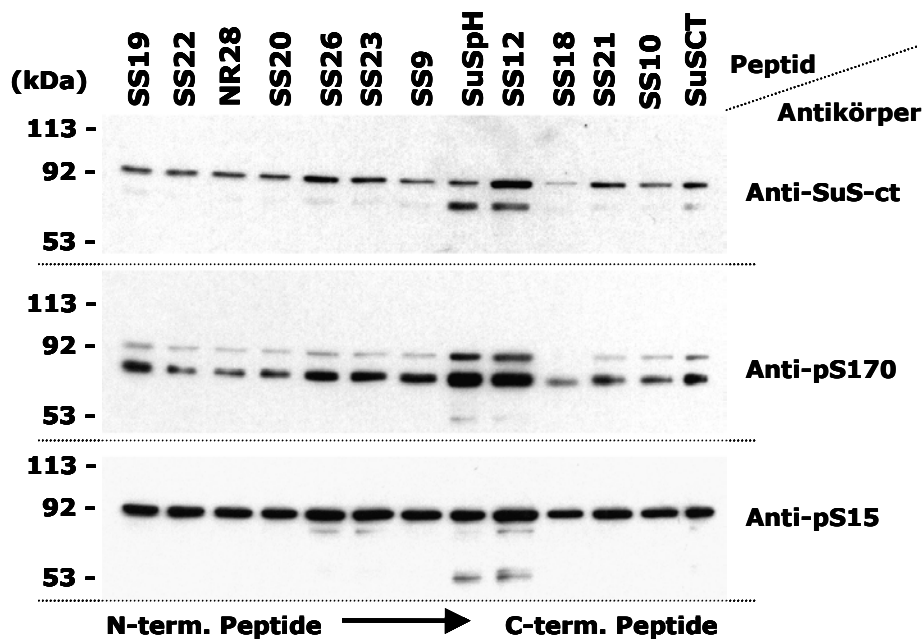


Abb: 3.3.13: Immunblot der Pelletfraktionen eines Assoziationsversuches mit synthetischen Peptiden, nativem SUS-Protein und Aktin.

Analysiert wurden gleiche Volumina der resuspendierten Pelletfraktionen, die Immundetektion erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern gegen den C-Terminus von SUS1, das phosphorylierte Serin an Position 170 in SUS1 sowie gegen das phosphorylierte Serin an Position 15 in SUS1.

Die Immundetektion unter Verwendung phosphospezifischer, monoklonaler Antikörper bestätigte, dass das native gereinigte SUS-Protein zumindest teilweise an beiden bekannten Phosphorylierungsstellen Ser-15 und Ser-170 (HARDIN et al., 2003) phosphoryliert vorliegt (Abb. 3.3.13). Es wurde nicht nur eine Assoziation des Volllängen-Protein mit Aktin beobachtet, sondern auch eine Bindung einiger Abbauprodukte von SUS. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass Abbauprodukte des SUS-Proteins eine stärkere Ser-170-Phosphorylierung zeigten als das Volllängen-Protein. Der Vergleich von Überstand- und Pelletfraktionen zeigte keine Korrelation zwischen Phosphorylierung und Aktinassoziation. Die unter 3.3.1.2 dargelegten Ergebnisse wurden somit untermauert.

Immunblotanalysen von Pellet- und Überstandfraktionen der Assoziationsversuche zeigten unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen den C-Terminus von SUS1, dass ein etwa 40 kDa großes, C-terminales Fragment des reifen SUS-Proteins nicht mit den Aktinfilamenten assoziierte, sondern als lösliches Fragment im Überstand verblieb (Abb. 3.3.14). Dieses Ergebnis grenzte die aktinbindende Domäne etwa auf die N-terminalen 450 Aminosäuren, die ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 53 kDa haben, ein.

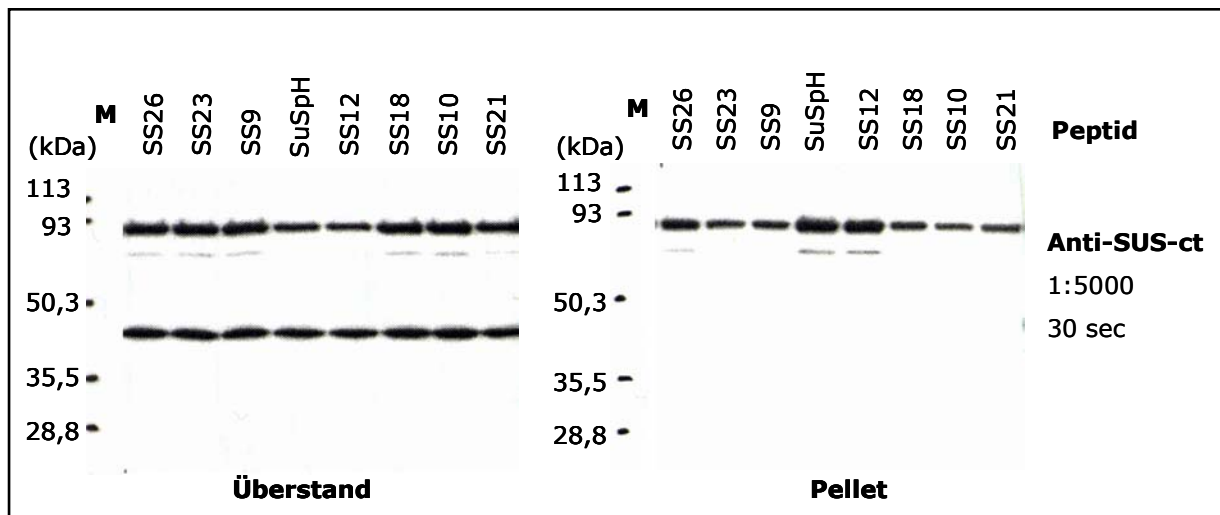


Abb. 3.3.1.14: Immunblot von Fraktionen eines Assoziationsversuches mit synthetischen Peptiden, nativem SUS-Protein und Aktin.

Analysiert wurden jeweils $\frac{1}{4}$ der Überstand- und $\frac{1}{2}$ der resuspendierten Pelletfraktionen. Die Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper gegen den C-Terminus von SUS1, Anti-SuS-ct, in einer Verdünnung von 1:5000. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL bei einer Expositionszeit von 30 Sekunden.

Mutagenese einzelner Aminosäuren in der möglichen Aktinbindestelle

Durch die Studien an SUS-homologen, synthetischen Peptiden konnten Sequenzabschnitte identifiziert werden, die vermutlich mit der Aktinassoziation der Saccharose-Synthase in Verbindung stehen. Die Peptide SuSpH und SS12 zeigten eine Affinität zu Aktin und zu SUS selbst, das Peptid SS18 konnte unter bestimmten Bedingungen die SUS-Aktin-Bindung inhibieren. Abb. 3.3.15 zeigt einen Sequenzvergleich von SUS1 und diesen Peptiden. Aufgrund der Homologie zu Arp-Proteinen und Aktin (siehe Anhang) wurde der Sequenzabschnitt E375-L392 in SUS1 als putative Aktinbindedomäne angenommen.

```

SUS1      365  C H I L R V P F R T E N G I V R K W I S R F E V W P Y L 392
SuSpH      C H I L R V P F R T E N G I V R K W I S R
SS12      G I V R K W I S R F E V W P Y L
SS18      G V V R N W D D M C H V W E Y

```

Abb. 3.3.1.15: Sequenzvergleich synthetischer Peptide und SUS1 zur Identifizierung konservierter Aminosäuren.

Die putative Aktinbindedomäne in SUS1 ist grau unterlegt.

Die für die Aktinbindung essentiellen Aminosäuren sollten durch Assoziationsversuche mit mutagenisiertem, rekombinantem SUS1-Protein identifiziert werden. Die Mutagenesen innerhalb der putativen Aktinbindedomäne wurden in der SuSy-E-Mutante unternommen. Die beiden Tryptophane (W) wurden in den Mutanten S15E/W383A und S15E/W389A gegen Alanin (A) ersetzt, da die im kristallisierten Aktin homologe Sequenz räumlich eine Helix beschreibt. Die Distanz zwischen den Tryptophanen in der Helix beträgt 3,6 aa, so dass diese sehr nahe auf einer Seite zu liegen kommen. Außerdem sind die Tryptophane aufgrund ihrer Größe und Struktur (Pyrolring, aromatisch und hydrophob) gute Kandidaten, um eine Aktinbindung zu begünstigen. Das Tyrosin (Y) an Position 391 wurde wegen seines aromatischen Restes und der reaktiven Hydroxylgruppe (OH) gegen Alanin ersetzt

(S15E/Y391A). Das Arginin (R) an Position 380 liegt in zahlreichen Aktinsequenzen und ABP-Sequenzen konserviert vor. Der pK-Wert liegt bei 12 und die Seitenkette des Arginin ist ein Kandidat für Ionisierung. Die zugehörige Mutante wurde mit S15E/R380A bezeichnet. Der Austausch E391A (S15E/E387A) wurde gewählt, weil innerhalb der Aktinsequenzen an ähnlicher Position (-1) ein E zu finden ist.

Die Mutante S15E/Y391A konnte nicht heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Die weiteren vier Mutanten zeigten im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp (SuSy-wt) sowie zur SuSy-E-Mutante keine signifikanten Unterschiede in ihrer katalytischen und assoziativen Aktivität (Abb. 3.3.1.16).

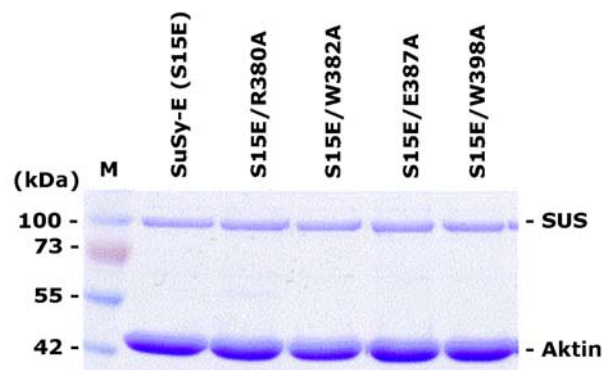


Abb. 3.3.1.16: Aktinbindeversuch mit mutagenisiertem SUS-Protein. SDS-PAGE der Assoziationsfraktionen.

3.3.2 Saccharose-Synthase als Tubulin-Bindeprotein

3.3.2.1 Isolierung von Tubulin

Die Isolierung von Tubulin erfolgte aus schlachtfischem Rinderhirn. Nach Homogenisierung wurde durch zwei Assemblierungs- und Disassemblierungszyklen mit anschließender Ultrazentrifugation das Mikrotubulin-Protein angereichert. Im zellfreien System polymerisieren die Mikrotubuli (MT) in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und GTP bei Temperaturen $> 20^{\circ}C$. Die Zugabe von Glycerin erhöht den Polymersationsgrad, während durch Inkubation bei $4^{\circ}C$ die gebildeten Mikrotubuli zu Tubulin-Dimeren depolymerisieren. Die Abtrennung der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) erfolgte säulenchromatographisch mit dem Kationenaustauscher Phosphocellulose (PC). An der Säulenmatrix binden die alkalischen MAPs, während die sauren Tubulin-Dimere nahezu unretardiert eluieren.

Das Muster der Polypeptidbanden im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 3.3.2.1, links) demonstriert die starke Anreicherung des Mikrotubulin-Proteins in der Pellet- und Überstandfraktion der letzten Zentrifugation sowie die erfolgreiche Isolierung MAP-freien Tubulins.

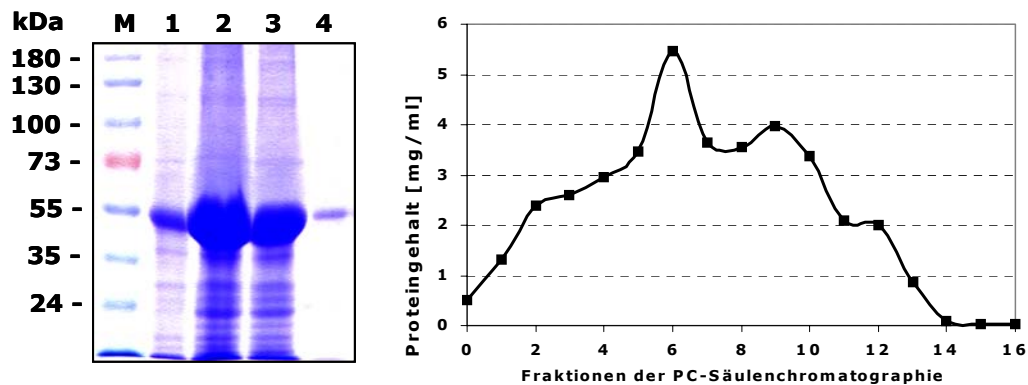


Abb. 3.3.2.1: SDS-PAGE verschiedener Fraktionen der Tubulinreinigung (links) und Proteingehalte der Tubulineluatate nach der PC-Säulenchromatographie (rechts).

Mit Tubulin angereichertes Zellhomogenat und isoliertes Tubulin wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. M: Molekulargewichtsstandard; Spur 1: MAP-Mikrotubuli-Fraktion vor dem Säulenauftrag; Spur 2: Pellet nach dem zweiten Assemblierungszyklus; Spur 3: Überstand nach dem zweiten Assemblierungszyklus; Spur 4: Eluatfraktion 6 der PC-Säulenchromatographie.

Sämtliche Untersuchungen zur Tubulinassoziation wurden mit der hochreinen Eluatfraktion 6 durchgeführt. Die Polymerisation von nativem, dimerem Tubulin zu Mikrotubuli (MT) wurde nach einem Protokoll von Herrn Prof. Dr. R. Brandt, (Abteilung Neurobiologie, Universität Osnabrück) durchgeführt (vgl. 2.10.7). Die Stabilisierung der Mikrotubuli erfolgte mit 5 μM Taxol (Endkonzentration).

3.3.2.2 *In vitro*-Bindung von Saccharose-Synthase an Mikrotubuli

Co-Sedimentationsstudien zeigten die direkte Bindung rekombinanter Saccharose-Synthase (SuSy-wt) an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli. Die Bindespezifität ist stark abhängig von der Proteinkonzentration, Inkubationsdauer und Temperatur. Eine Sättigung der Bindung konnte nicht erreicht werden. Während bei Versuchsansätzen mit 0,125 μM SuSy-wt und 1 μM Mikrotubuli mehr als 90% der rekombinanten SUS gebunden vorlag, führte eine Erhöhung der SuSy-wt-Konzentration im Bindungsassay zu einem gleichmäßigen Verteilungsmuster in Überstand und Pelletfraktion. Die Quantifizierung des gebundenen und löslichen SUS-Proteins mittels ELISA in drei unabhängigen Versuchsreihen ergab, dass mit zunehmender Konzentration von SuSy-wt jeweils etwa 54% des Proteins in gebundener Form vorlagen (Abb. 3.3.2.2.). In Mikrotubuli-freien Proben pelletierten jeweils weniger als 10%.

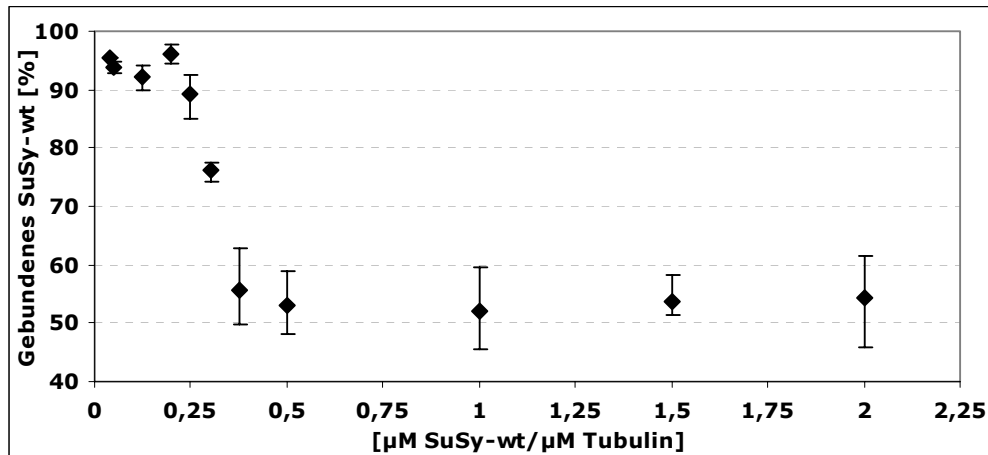


Abb. 3.3.2.2: Konzentrationsabhängige Assoziation von SuSy an Mikrotubuli.

Die Bindung von SuSy-wt an Mikrotubuli stieg bei Inkubationszeiten von 10-60 Minuten nahezu linear an. Nach 60 Minuten war ein Plateau erreicht (Abb. 3.3.2.3) Ein vergleichbares Phänomen wurde durch Temperaturerhöhung von 22°C auf 37°C erreicht.

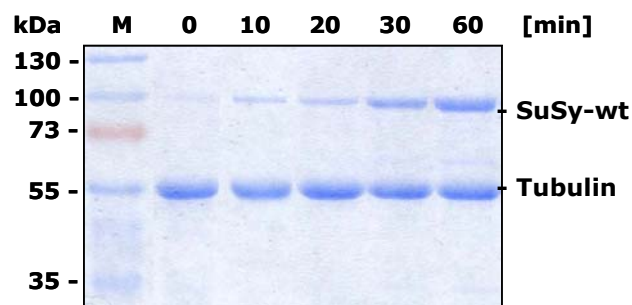


Abb. 3.3.2.3: SDS-PAGE der zeitabhängigen Co-Assemblierung von SuSy-wt und Mikrotubuli-Protein.

3.3.2.3 Konkurrenz von SuSy und Aldolase um die Bindung an Mikrotubuli

Im tierischen System ist die Bindung des glykolytischen Enzyms Aldolase an Mikrotubuli gezeigt worden (VOLKER und KNOLL, 1993); für pflanzliche Aldolase wurde eine Assoziation mit zellulären Strukturen ebenfalls vermutet (AZAMA et al., 2003). Rekombinante Aldolase aus Mais bindet *in vitro* an Taxol-stabilisierte MT (Abb. 3.3.2.4). Wettbewerbsversuche zwischen den rekombinanten Proteinen Saccharose-Synthase und Aldolase aus Mais zeigten, dass die Bindung von Aldolase an Mikrotubuli stärker ist als die Bindung von SuSy-wt. In Wettbewerbsversuchen (Abb. 3.3.2.4) wurden jeweils 1 µM Mikrotubuli mit und ohne 1,3 µM SuSy-wt und/oder Aldolase eingesetzt. Die Versuchsbedingungen wurden auf 30 Minuten Inkubation bei 25°C determiniert. Unter diesen Bedingungen co-sedimentierten etwa 54% SuSy-wt bei Abwesenheit von Aldolase mit den stabilisierten Mikrotubuli, während bei Anwesenheit von Aldolase lediglich 27% in assoziierter Form vorlagen (Tab. 3.9). Im Gegensatz dazu wurde das Assoziationsverhalten der Aldolase in Wettbewerbsversuchen nicht beeinflusst. Unabhängig von der An- und Abwesenheit von SuSy-wt co-sedimentierten etwa 33% der Aldolase mit den Mikrotubuli. Mikrotubuli-freie Kontrollansätze zeigten keine

erhöhte Präzipitation der co-inkubierten Enzyme. Die kompetitive Assoziation der Aldolase deutet auf eine spezifische Bindung der Saccharose-Synthase an Mikrotubuli hin.

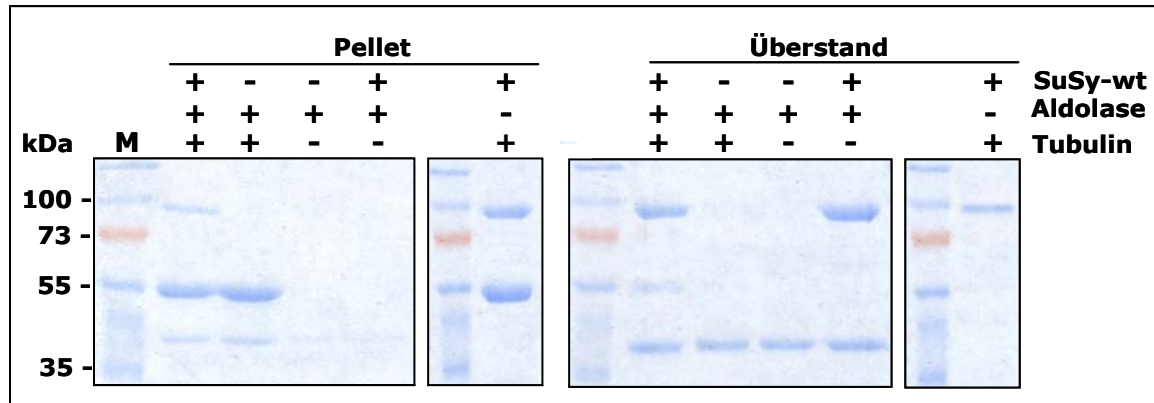


Abb. 3.3.2.4: SDS-PAGE eines exemplarischen Wettbewerbsversuches zwischen SuSy-wt und Aldolase um Mikrotubuli-Assoziation. Molekulargewichte der Proteine. SuSy-wt ~97 kDa, Tubulin ~55 kDa und Aldolase ~40 kDa.

Tabelle 3.9: Konkurrenz zwischen SuSy-wt und Aldolase um Mikrotubuli-Assoziation.

Ansatz	Tubulin	Aldolase	SuSy-wt	150.000g Pellet*	
	[µg]	[µg]	[µg]	Aldolase	SuSy-wt
1	5,5	-	12,5	-	54,2±1,9
2	5,5	5,5	-	33,8±0,9	-
3	5,5	5,5	12,5	33,9±2,2	27,4±0,4
4	-	-	12,5	-	9,6±0,2
5	-	5,5	-	10,8±3,4	-
6	-	5,5	12,5	8,9±0,2	7,8±0,1

* Proteinangaben in [%]

3.3.2.4 Bindung von SUS und GAPDH an Mikrotubuli

DURRIEU et al. (1987) zeigten, dass ein Teil der *in vitro* an Mikrotubuli gebundenen GAPDH aus Kaninchen nach Kälte-depolymerisation des GAPDH-Mikrotubuli-Komplexes als katalytisch aktives Enzym dissoziiert vorlag, während ein anderer, katalytisch inaktiver Teil weiterhin im Assoziations-Komplex verblieb. Im folgenden Versuch wurden je 8,25 µg GAPDH (rekombinant aus *A. thaliana* und nativ aus Kaninchen) mit sowie 12 µg SUS-Protein (SuSy-wt) mit und ohne 15 µg Mikrotubuli-Protein (MT) inkubiert (vgl. 2.10.8). Der Polymerisationsansatz wurde zentrifugiert, das Pellet dieser Ultrazentrifugation resuspendiert, disassembliert und bei 4°C erneut zentrifugiert. In den einzelnen Fraktionen wurde die Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteinmengen wurden mittels ELISA oder durch densitometrische Auswertung von Gelbanden quantifiziert und die katalytische Aktivität der jeweiligen Enzyme bestimmt (Tab. 3.10 und Tab. 3.11). Zum besseren Verständnis der Vielschichtigkeit der untersuchten Interaktionen wurde die Auswertung in zwei Teile gegliedert. Zunächst wurde das Augenmerk auf die assoziative und katalytische Aktivität von GAPDH und SUS im Assemblierungsansatz gerichtet. Im zweiten

Teil wurde der Einfluss der Enzyme auf die Mikrotubuli im Disassemblierungsansatz dargestellt.

Bindung und Aktivität von SUS und GAPDH im Assemblierungsansatz

Die katalytische Aktivität der rekombinanten GAPDH aus *A. thaliana* wurde auf 132 U/mg determiniert, die des nativen Kaninchenenzym auf 18,5 U/mg. Sowohl die katalytisch hoch aktive, als auch die schwach aktive GAPDH präzipitierten mit weniger als 10% in mikrotubulifreien Proben. Das tierische und das rekombinante pflanzliche GAPDH-Enzym konnte mit den Mikrotubuli assoziieren und die Disassemblierung der Mikrotubuli durch Kälte minimieren bzw. weitgehend im Mikrotubuli-Enzymkomplex verbleiben (Abb. 3.3.2.5). Für rekombinantes SUS-Protein wurde ein vergleichbares assoziatives Verhalten wie für die GAPDH festgestellt. SuSy-wt vermochte ebenfalls die Disassemblierung der Mikrotubuli durch Kälte zu minimieren, die katalytische Aktivität hingegen wurde nicht im gleichen Maße wie bei der GAPDH in Anwesenheit der MTs inhibiert.

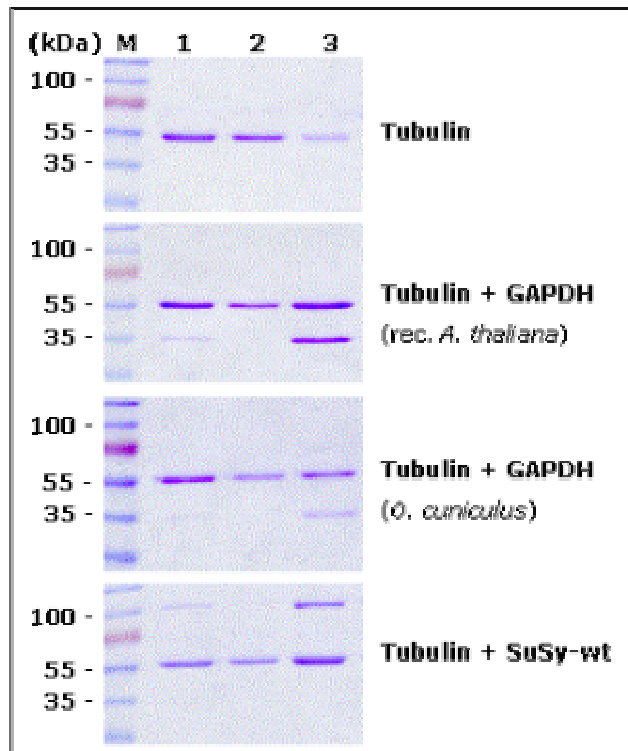


Abb. 3.3.2.5: Assemblierung und Disassemblierung von MTs in An- und Abwesenheit der Enzyme GAPDH und Saccharose-Synthase. SDS-PAGE der Zentrifugationsfraktionen. Spur 1: ¼ Assemblierungspellet (25°C); Spur 2: ½ Überstand nach der Disassemblierung (4°C); Spur 3: ½ Pellet der Disassemblierung (4°C).

Inaktivierung der GAPDH durch Mikrotubuli-Assoziation

In den einzelnen Fraktionen der Assemblierung und Disassemblierung von MTs in An- und Abwesenheit der Enzyme GAPDH und Saccharose-Synthase wurden die Enzymaktivität und die Proteinmenge quantifiziert. Die Verteilung der katalytischen GAPDH-Aktivität auf die einzelnen Fraktionen korrelierte nicht mit der Menge des Enzyms. Dies steht im Einklang mit der postulierten Inaktivierung der GAPDH durch Bindung an die Mikrotubuli (DURRIEU et

al., 1987). Die Summen der GAPDH-Aktivitäten aus Überstand- und Pelletfraktion des Assemblierungsansatzes erreichten weder in Mikrotubuli-freien noch in Mikrotubuli-supplementierten Proben den zunächst eingesetzten Wert (Tab. 3.10). Ein Teil der katalytischen Aktivität wurde offensichtlich durch die Versuchsanordnung und etwaige Messungenauigkeiten eingebüßt. In Mikrotubuli-freien Proben konnten 88,7% bzw. 90,4% der GAPDH-Aktivität rückgewonnen werden. In Mikrotubuli-supplementierten Proben wurden jedoch lediglich 60,5% bzw. 73% der GAPDH-Aktivität rückgewonnen. Dieser Befund deutete auf einen katalytischen Inaktivierungsmechanismus des gebundenen, heterolog expremierten Pflanzenenzym infolge der Mikrotubuli-Assoziation hin. Eine Inaktivierung der GAPDH durch Assoziation mit MTs wurde für das muskuläre Enzym aus Kaninchen bereits beschrieben (DURRIEU et al., 1987).

Tabelle 3.10: Verteilung der Enzymaktivitäten und -Mengen im Assemblierungsansatz.

GAPDH oder SuSy-wt wurden mit und ohne Taxol-stabilisiertes Mikrotubuli-Protein inkubiert und anschließend durch Ultrazentrifugation in Pellet- und Überstandfraktion getrennt. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Die eingesetzten Proteinmengen waren je 8,25 µg GAPDH (rekombinant *A. thaliana* oder nativ *O. cuniculus*), 12 µg SuSy-wt und 15 µg Tubulin. Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels ELISA und Densitometrie. Die Aktivitätsmessungen wurden in Standardansätzen durchgeführt (2.9). Die in den Assemblierungsansatz eingesetzten Aktivitäten entsprechen 100%. Um bestehende Proteinbindungen weitestgehend zu erhalten wurden aliquote Probenanteile mit weithalsigen Pipetten bei RT in die Messansätze überführt und vorsichtig gemischt.

Ansätze	Aktivität [%]			Proteinmenge [%]		
	Pellet	Überstand	Rückgewinnung	Pellet	Überstand	Rückgewinnung
GAPDH (<i>A. thaliana</i>) + Tubulin	29,1	31,5	60,5	66,1	31,3	97,4
GAPDH (<i>A. thaliana</i>)	3,5	85,2	88,7	3,3	94,9	98,1
GAPDH (<i>O. cuniculus</i>) + Tubulin	10,5	62,5	73,0	27,4	70,1	97,5
GAPDH (<i>O. cuniculus</i>)	2,9	87,5	90,4	2,2	93,1	95,3
SuSy-wt (<i>Z. mays</i>) + Tubulin	59,6	33,6	93,2	54,1	43,6	97,7
SuSy-wt (<i>Z. mays</i>)	5,1	72,0	77,1	6,3	89,8	95,1

Bestimmung der SUS-Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Mikrotubuli-Assoziation

Determinierung der katalytischen Aktivität von SuSy-wt in Richtung der Saccharose-Spaltung zeigte eine erhöhte Aktivität des Enzyms in Anwesenheit von MTs. Ein ähnlicher Befund wurde für den Einfluss von Aktin auf die katalytische Aktivität beschrieben (vgl. 3.3.1.4). Die Addition der in Pellet- und Überstandfraktion des Polymerisationsansatzes gemessenen Enzymaktivitäten erreichte nahezu den Ausgangswert des Gesamtansatzes (Tab. 3.10). In den Mikrotubuli-freien Proben hingegen kam es zu einem Aktivitätsverlust.

Die Verteilung der Enzymaktivität korrelierte in allen Fällen positiv mit der Verteilung der Proteinmenge; d.h. weder eine deutliche Aktivierung noch eine Inaktivierung der SUS wurde in Abhängigkeit von MTs beobachtet.

Die Assemblierung des Tubulins zu Mikrotubuli war unter den gewählten Versuchsbedingungen fast vollständig. Es wurden jeweils $96\pm 3\%$ des eingesetzten Proteins in der Pelletfraktion nachgewiesen.

Einfluss von GAPDH und SUS-Protein auf Mikrotubuli

Die bestehende Wechselwirkung der Protein-Enzym-Interaktion wurde unter einem weiteren Gesichtspunkt betrachtet; dem Einfluss der Enzyme auf das Assemblierungs- und Disassemblierungsverhalten der MTs. Nachdem eine Inhibition der Enzymaktivität für GAPDH, aber nicht für SUS, in Abhängigkeit von der Mikrotubuli-Assoziation deutlich wurde, wurde ausgehend von der Pelletfraktion des Assemblierungsansatzes ein Disassemblierungszyklus durchgeführt.

Die Resuspendierung und Inkubation der polymerisierten und assoziierten MT-Enzymkomplexe erfolgte in Taxol-freiem Depolymerisationspuffer (vgl. 2.10.8) bei 4°C. Die anschließende erneute Ultrazentrifugation trennte die kältestabilen MTs und assoziierte Enzyme von den disassemblierten, löslichen Proteinen.

Die Analyse der enzymfreien Kontrolle zeigte, dass die MTs zwar weitgehend, aber nicht vollständig, disassemblierten (Tab. 3.11). Etwa 22% des Proteins pelletierte als kältestabile Mikrotubuli. In Anwesenheit der Enzyme hingegen wurden etwa 60-76% des Tubulins pelletiert. Diese Ergebnisse legen eine zweidimensionale Wechselwirkung der assoziierten Proteine nahe.

Tabelle. 3.11: Pelletierung kältebehandelter Mikrotubuli.

Summe aus pelletiertem und löslichem Tubulin des Disassemblierungsansatzes wurde als 100% festgesetzt. Die Proteinquantifizierung der Pellet- und Überstandfraktionen erfolgte densitometrisch. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messungen der Überstand- und Pelletfraktionen der Disassemblierungsansätze.

Ansätze	Proteinmenge [%] Pellet
Tubulin	$21,7 \pm 1,8$
Tubulin + GAPDH (<i>A. thaliana</i>)	$76,2 \pm 2,2$
Tubulin + GAPDH (<i>O. cuniculus</i>)	$59,9 \pm 3,4$
Tubulin + SuSy-wt (<i>Z. mays</i>)	$68,1 \pm 3,0$

DURRIE et al. (1986) zeigten für GAPDH aus Kaninchen, dass ein Teil des Enzyms durch die Kältebehandlung von den MTs dissoziiert. Für dieses dissoziierte Enzym wurde eine spezifische Aktivität ermittelt, die höher war als die eingangs bestimmte Grundaktivität. Dieser Befund, führte zu der Annahme, dass die hochaktive GAPDH leicht dissoziieren kann, während die eher inaktive GAPDH mit den MTs im kältestabilen Komplex verbleibt.

Aufgrund dieser Hinweise wurden in den oben beschriebenen Disassemblierungs-fractionen die Enzymaktivitäten und Proteinmengen von GAPDH und SuSy-wt bestimmt. Als Ausgangswerte für die Berechnung wurden die Summen der Aktivitäten und Proteinmengen aus Überstand- und Pelletfraktionen des Disassemblierungsansatzes als 100% angenommen (Tab. 3.12). Die für beide GAPDH-Proteine und SuSy-wt ermittelten Daten wurden zum Vergleich mit den Ergebnissen für Tubulin in einer Übersichtstabelle aufgelistet (Tab. 3.11). Diese Darstellung wurde gewählt, weil die unterschiedlichen Aktivitäten und Molekulargewichte der Proteine den Vergleich absoluter Daten schwierig gestalteten.

Ein Anteil von etwa 10-12% der GAPDH und des SuSy-wt-Proteins wurden dissoziiert im löslichen Überstand gefunden. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden GAPDH-Proteine und SuSy-wt ein differentes Verhalten hinsichtlich der Verteilung der katalytischen Aktivität. Weniger als 10% der SuSy-wt-Aktivität war in der löslichen Fraktion nachweisbar. Hier korrelierten erneut Menge und Aktivität positiv miteinander. Im Vergleich dazu war für die rekombinante GAPDH (*A. thaliana*) gut 45% der Gesamtaktivität in der löslichen Fraktion nachweisbar. Die Aktivität der nativen GAPDH (*O. cuniculus*) war sogar zu mehr als 70% in der löslichen Fraktion lokalisiert.

Tabelle 3.12: Enzymaktivitäten und Proteinmengen in Disassemblierungsfractionen.

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels ELISA und Densitometrie (Enzyme) oder nur durch Densitometrie (Tubulin). Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit je drei Messungen der Überstand- und Pelletfraktionen der Disassemblierungsansätze.

Ansätze	Aktivität [%]		Proteinmenge [%]	
	Pellet	Überstand	Pellet	Überstand
Tubulin (enzymfreie Probe)				
Tubulin	-	-	21,7	78,3
Tubulin + GAPDH (<i>A. thaliana</i>)				
GAPDH	54,4	45,6	87,9	12,1
Tubulin	-	-	76,2	23,8
Tubulin + GAPDH (<i>O. cuniculus</i>)				
GAPDH	28	72	89,9	10,0
Tubulin	-	-	59,9	40,1
Tubulin + SUS (<i>Z. mays</i>)				
SuSy-wt	90,8	9,2	88,3	11,8
Tubulin	-	-	68,12	31,88

Die Ergebnisse deuten auf komplexe Wechselwirkungen im Protein-Enzymkomplex hin. Die Bindung an Mikrotubuli kann die katalytische Aktivität der assoziierten Enzyme beeinflussen, andererseits kann ein assoziiertes Enzym die (De-)Polymerisationseigenschaften der Cytoskelettkomponente modifizieren.

3.3.3. Assoziation der Saccharose-Synthase mit Membranen

Neben der subzellulären Lokalisierung des typischerweise löslichen, cytosolischen Enzyms Saccharose-Synthase an Cytoskelettelementen wurde die transiente Assoziation des Enzyms mit verschiedenen Membranen gezeigt (WINTER und HUBER, 2000; HONG et al., 2001; DOBLIN

et al., 2002; KOMINA et al., 2002; HARDIN et al., 2003; HARDIN et al., 2004). Die reversible und transiente Assoziation des Enzyms mit diversen Membranen deutet auf eine Vielzahl verschiedener Funktionen hin (KOCH, 2004). Enzymaktivitäten an der Plasmamembran und am Golgi könnten mit der Zellwandbiosynthese in Verbindung stehen (AMOR et al., 1995; BUCKERIDGE et al., 2001; SALNIKOV et al., 2003; ALBRECHT und MUSTROPH, 2003;).

Eine Assoziation mit der Siebröhren-Plasmamembran und dem Tonoplasten könnte das Enzym in die Metabolisierung und/oder die Ablagerung von (vakuolärer) Saccharose involvieren (HONG et al., 2001).

3.3.3.1 Assoziation von Saccharose-Synthase mit der Cellulose-Synthase

Eine allgemeine Hypothese stellt die Membranassoziation von Saccharose-Synthase in Zusammenhang mit einem direkten „Channeling“ des Substrates UDP-Glucose für die Cellulose-Synthase (Abb. 3.3.3.1). NAKAI et al. (1999) zeigten, dass die heterologe Expression von Saccharose-Synthase in transformierten *Acetobacter xylium*-Zellen zu einer erhöhten Cellulosesynthese im bakteriellen System führt. In Maispulvini korrelierte die Menge und Aktivität von membranassoziierter Saccharose-Synthase mit der Zellstreckungsrate (WINTER et al., 1997). Eine Co-Lokalisation von Cellulosemikrofibrillen und Saccharose-Synthase während der Sekundärwandsynthese wurde von HAIGLER und BLANTON (1996) gezeigt. Ein molekularer Mechanismus der Interaktion von Cellulose-Synthase und Saccharose-Synthase ist nicht bekannt. Ein „Metabolit-Channeling“ würde jedoch eine direkte Assoziation von Saccharose-Synthase und Cellulose-Synthase oder eine indirekte Interaktion (z.B. vermittelt durch das kortikale Cytoskelett) erfordern. Eine direkte Interaktion einer UDP-Glucose-Transferase (UGT1) und einem Callose-Synthase-Komplex wurde bereits von HONG et al. (2001) gezeigt.

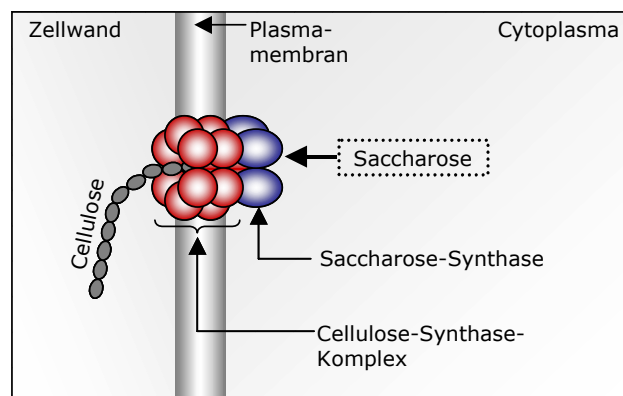


Abb. 3.3.3.1: Hypothetisches Modell zur Assoziation von Saccharose-Synthase mit dem membranständigen Rosetten-Komplex der Cellulose-Synthase. Nach KOCH (2004)

Für die katalytischen Untereinheiten der Cellulose-Synthase sind in Mais bislang 9 Gene (*CesA*) identifiziert worden, deren Transkription zelltypspezifisch ist (HOLLAND et al., 2000). *CesA*-Proteinsequenzen besitzen vermutlich acht Transmembranhelices, von denen zwei am

N-terminalen und sechs weitere am C-terminalen Ende in die Membran inserieren (DELMER, 1999). Während bei Pflanzen und Bakterien drei Aspartate sowie das QxxRW-Motif, welches für die glykosidische Bindung zwischen den Polymerbausteinen wichtig ist (Substratbindung und katalytische Aktivität), konserviert sind, besitzen pflanzliche Cellulose-Synthasen ausgedehnte Sequenzbereiche mit starker Variabilität. Eine zinkbindende Domäne mit Homologie zu LIM/Ring-Domänen (KAWAGOE und DELMER, 1997) ist N-terminal lokalisiert. Zwei weitere pflanzenspezifischen Bereiche, CR-P und HVR, liegen zwischen dem zweiten und dritten Transmembrandurchgang, vermutlich in einem großen, cytosolisch orientierten „Loop“. Die Funktion der in Pflanzen konservierten Region (CR-P; conserved region in plants) und der Hypervariablen Region (HVR; hypervariable region) ist unbekannt (PEAR et al., 1996). Es wird postuliert, dass die erste, N-terminale cytosolische Domäne eher an der Interaktion der Untereinheiten des Rosetten-Komplexes untereinander beteiligt ist, während die Bereiche des cytosolischen „Loops“ zwischen Membrandurchgang zwei und drei eher in Interaktionen mit cytosolischen Bindepartnern involviert sind (ZHONG et al., 2003). Diese cytosolische Domäne ist somit ein guter Kandidat, um eine direkte oder indirekte Interaktion mit der Saccharose-Synthase zu vermitteln.

Affinitätschromatographie von HVR und Mais-Rohextrakt

Aus der Diplomarbeit von Julia Pelz, geb. Frank stand ein HVR-Expressionskonstrukt zur Verfügung. Um die mögliche Beteiligung des HVR-Bereiches an einer direkten oder indirekten Interaktion mit der Saccharose-Synthase zu untersuchen, wurden Affinitätschromatographien durchgeführt. Die Herstellung der HVR-Ni-NTA-Affinitätsmatrix sowie der Kontrollmatrix erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben. Als mobile Phase wurde geklärter Rohextrakt aus Mais verwendet. Nach mehreren Waschschritten wurden die spezifisch gebundenen Proteinkomplexe eluiert und die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immundetektion (Abb. 3.3.3.1) analysiert. Der Vergleich der Proteinverteilung in den Fraktionen beider Affinitätsmatrices zeigte, dass in beiden Fällen viele Proteine unterschiedlicher Größe die Säulen unretardiert passierten. Ebenfalls konnten unspezifische Bindungen an beiden Matrices effizient durch Waschen mit Imidazol-haltigem Puffer (60 mM Imidazol) gelöst werden. Spezifische Bindungen, die in Anwesenheit von 0,15–1 M Imidazol von der Affinitätsmatrix gelöst wurden, waren mittels Coomassie-Färbung lediglich im Elutionsprofil der HVR-Säule zu detektieren. Polypeptide unterschiedlicher molarer Masse co-eluierten mit dem HVR-Peptid. Die größte Menge an HVR-Peptid wurde durch Verwendung von 300 mM Imidazol von Ni-NTA-Affinitätsmatrix verdrängt, gleichzeitig eluierten in dieser Fraktion die höchsten Mengen uncharakterisierter Polypeptide.

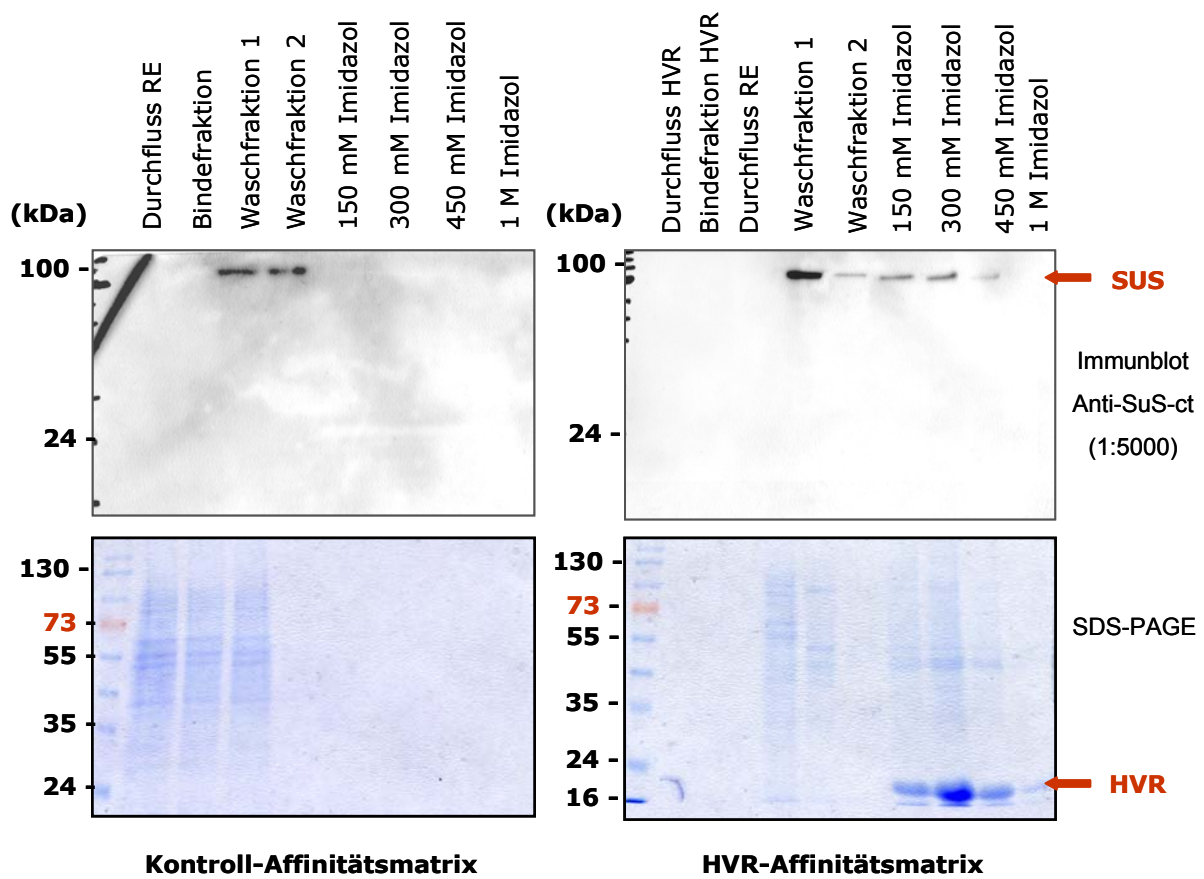


Abb. 3.3.3.2: Affinitätschromatographie von rek. HVR und Rohextrakt aus Mais. Immundetektion (*oben*) unter Verwendung des monoklonalen Anti-SuS-ct-Antikörpers und Coomassie-Färbung nach 12%-iger SDS-PAGE (*unten*).

Die Immundetektion von SUS-Protein zeigte deutliche Signale in den Waschfraktionen beider Affinitätschromatographien. Eine spezifische Bindung des nativen SUS-Proteins konnte in den Elutionsfraktionen der HVR-Säule detektiert werden, während in den korrespondierenden Kontrollfraktionen kein Signal erhalten wurde. Auch im Coomassiegefärbten SDS-Gel lässt sich bei genauem Hinsehen eine Bande im Bereich von ~93 kDa erkennen. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der HVR der Cellulose-Synthase Cesa1 aus Mais an einer Interaktion mit der Saccharose-Synthase hin. Da als mobile Phase geklärter Rohextrakt eingesetzt wurde, kann keine Aussage über eine direkte Interaktion getroffen werden. Weitere co-eluierende Polypeptide könnten die Interaktion vermitteln, eine Zuordnung der entsprechenden Banden wurde nicht vorgenommen.

Direkte Interaktion von HVR und Saccharose-Synthase *in vitro*

Ein Ansatz, um die direkte Interaktion von SUS-Protein und HVR *in vitro* zu untersuchen, begründet sich auf der Tatsache, dass SUS *in vitro* an Aktinfilamente bindet. Darüber hinaus wird für die Cellulose-Synthase eine direkte oder indirekte Assoziation mit dem kortikalen Cytoskelett postuliert. Es ist somit denkbar, dass die aktin gebundene SUS gleichzeitig mit der Cellulose-Synthase interagiert. In Sedimentationsversuchen wurden rekombinantes SUS-

Protein (SuSy-wt) und/oder rekombinantes HVR-Polypeptid mit und ohne Aktinfilamente inkubiert und anschließend durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Analyse der Überstand- und Pelletfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte eine starke Präzipitation des HVR-Peptides unabhängig von der Anwesenheit von SuSy-wt und Aktin. Optimierungsversuche hinsichtlich pH-Wert und Zusammensetzung des Puffers blieben erfolglos. Eine Assoziation mit SuSy-wt und/oder Aktin konnte nicht determiniert werden.

Im Sandwich-ELISA (2.8.3.9) konnte eine direkte Bindung von HVR und SuSy-wt immunologisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Pro μg HVR wurden nach Abzug der Kontrollen $18,6 \pm 2,9$ ng SuSy-wt als gebunden nachgewiesen.

Eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der Saccharose-Synthase und den cytosolischen Domänen (CR-P und HVR) der Cellulose-Synthase (CesA) konnte beim Durchmustern einer cDNA-Bank aus Mais im Hefe-2-Hybrid-System in eigenen Arbeiten und im Rahmen der Diplomarbeit von Julia Pelz nicht identifiziert werden. Um eine direkte Interaktion von HVR und Saccharose-Synthase dennoch zu überprüfen, wurden Hefe-2-Hybrid-Analysen in modifizierter Form durchgeführt (vgl. 2.6.8). Hefezellen unterschiedlicher Paarungstypen wurden mit dem *Bait*-Konstrukt HVR-pGBKT7 und dem *Prey*-Konstrukt SuSy-pGAD transformiert und zur Verpaarung gebracht. Einige diploide Hefezellen zeigten deutliche Reporteragenaktivität, während bei diploiden Negativkontrollzellen keine vergleichbare Aktivität beobachtet werden konnte (Tab. 3.13). Die Reporteragenaktivität der eingesetzten Positivkontrolle (Dimerisierung oder Tetramerisierung von SUS-Protein) war bedeutend stärker, was auf eine schwache Interaktion zwischen den Fusionsproteinen HVR und SUS schließen lässt.

Tabelle 3.13: Phänotypen diploider Hefezellen.

Hefezellen, die *Bait*- und *Prey*-Konstrukte konstitutiv exprimierten, wurden hinsichtlich ihrer Reporteragen-Aktivität bzw. ihres Wachstums analysiert.

+++ = starkes; ++ = mittleres; + = schwaches ; - = kein Wachstum bzw. α -Galaktosidase-Aktivität der Hefezellen.

<i>Bait</i> -Konstrukt	<i>Prey</i> -Konstrukt	SD-Leu/-Trp	SD/QDO	Aktivität α -Galaktosidase
HVR-pGBKT7	SuSy-pGAD	+++	++	++
HVR-pGBKT7	SuS3-pGAD	+++	++	+
HVR-pGBKT7	cGPx-pGAD	+++	-	-
pGBKT7	SuSy-pGAD	+++	-	-
SuSy-pGBKT7	SuSy-pGAD	+++	+++	+++

3.3.5 Lokalisation der Saccharose-Synthase *in situ*

Zu den markanten Eigenschaften aktiver Protoplasten gehört die rasche Regeneration einer Zellwand, die einer Protoplastenteilung stets vorangeht. Die Expression und Visualisierung von SuSy-GFP-Konstrukten in Mais-Protoplasten sollte Hinweise über den zeitlichen Verlauf der subzellulären Lokalisierung der Saccharose-Synthase bringen. Erwartet wurde, dass bei der beginnenden Zellwandsynthese durch die membranständige Cellulose-Synthase das Fluoreszenzsignal des SuSy-GFP-Fusionsproteins an der Plasmamembran akkumuliert. Das

für SUS1 kodierende Konstrukt, SuSy-GFP (GFP am C-terminalen Ende von SUS1) stand unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors. Protoplasten aus fünf Tage alten eliolierten Maiskeimlingen wurden nach der Methode von SHEEN et al. (1991) isoliert und mittels Polyethylenglykol transformiert. Zur Expression wurden die Protoplasten für 20-36 h im Dunkeln inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im Konfokalen Laserscanning Mikroskop (cLSM) betrachtet. Mikroskopische Untersuchungen der SuSy-GFP-Konstrukte zeigten nach 20 h Inkubation eine Lokalisation der Fluoreszenz in oder an kleinen Organellen, deren Identität nicht geklärt werden konnte (Abb. 3.3.5.1). Es könnte sich hierbei um Golgi-Vesikel oder Amyloplasten handeln.

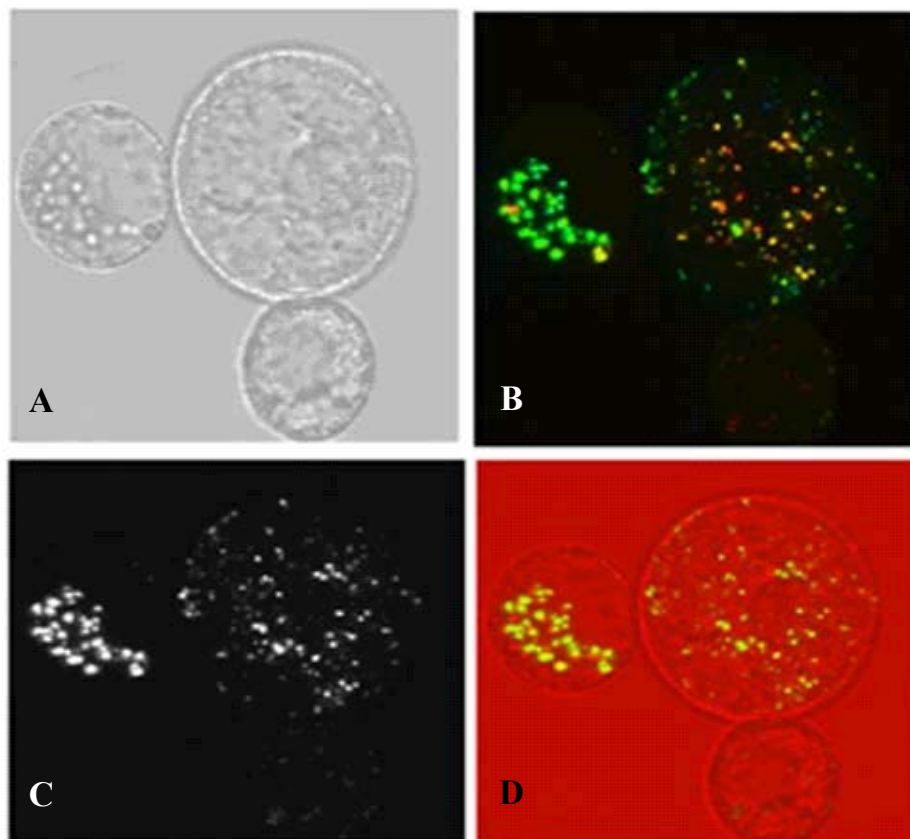


Abb. 3.3.5.1: Lokalisation von SuSy-GFP in transformierten Mais-Protoplasten nach 20 h Inkubation.

(A) Phasenkontrast; (B) 10 nm Ebene mit Falschfarben-Tiefenkodierung (C) 10 nm optischer Schnitt der GFP-Fluoreszenz (D) Overlay von (A) und (B). Nur zwei der drei Protoplasten wurden transformiert.

Auch im zeitlichen Verlauf konnte keine deutliche Fluoreszenzakkumulation an der Plasmamembran beobachtet werden. Vielmehr schien sich nach ca. 40 h Inkubation die Fluoreszenz im Kern zu konzentrieren.

3.4. Posttranslationale Modifikation von SUS-Protein durch Redox-Regulation

Neben der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung spielt vor allem die reversible Oxidoreduktion von Cysteinresten über den Wechsel zwischen Dithiol und Disulfid eine Rolle (ROUHIER et al., 2002; MARX et al., 2003). Die reversible Inhibition der katalytischen Aktivität von SUS-Protein in Richtung der Saccharosespaltung durch Disulfide wurde von PONTIS et al. (1981) für Weizen gezeigt. Die Spaltungsaktivität des Enzyms wurde in Untersuchungen mit verschiedenen Redoxreagenzien durch Oxidation stark verringert, die Syntheseaktivität dagegen wurde nur schwach beeinflusst. Die Untersuchungen wurden an nativ gereinigtem Enzym durchgeführt, ohne etwaige Isoformspezifitäten zu berücksichtigen. In Zusammenarbeit mit Kerstin Schipper (Bachelorarbeit, Universität Osnabrück) wurde die Enzymaktivität von SUS-Protein anhand der heterolog exprimierten Mais-Isoformen SUS1 (SuSy-wt) und SuS3 untersucht. Dabei wurde der Einfluss des synthetischen Redoxreagenz DTT (DTT_{red} und DTT_{ox}) und der Einfluss der physiologischen Redoxreagenzien Glutathion (GSH und GSSG) sowie Thioredoxin (Td) betrachtet. Obwohl das pH-Optimum der Spaltungsreaktion bei pH 6,5 (vgl. 3.2.1) liegt, wurden die Vorinkubationen sowie die Messungen bei pH 7,5-8,0 durchgeführt, um die Effizienz der Redoxreagenzien zu gewährleisten. Die beiden rekombinanten Isoformen zeigten nach dem Überführen in ein Puffermedium ohne Redoxreagenzien lediglich eine schwache Grundaktivität, die innerhalb weniger Stunden vollständig zum Erliegen kam.

3.4.1 Einfluss auf die Spaltungsreaktion

Unabhängig vom verwendeten Thiolreagenz waren beide Enzyme unter oxidierenden Bedingungen bezüglich der Spaltungsreaktion inaktiv. Reduzierende Bedingungen hingegen aktivierten die Spaltungs-Aktivität. In Reaktionsansätzen ohne vorherige Vorinkubation korrelierte die Aktivität sowohl von SuSy-wt als auch von SuS3 positiv mit den Konzentrationen an reduziertem DTT von 0-50 mM (Abb.3.4.1.). Die inhibitorische Wirkung von Arbutin blieb unverändert hoch. Die reduzierenden Reagenzien wie z.B. DTT_{red} nahmen in höheren Konzentrationen einen verfälschenden Einfluss auf die Bestimmung der entstandenen UDP-Glucose. Um artifizielle Extinktionsänderungen, die nicht auf die Bildung von UDP-Glucose durch die untersuchten SUS-Enzyme zurückzuführen waren, auszuschließen, wurden die Messungen jeweils ohne und mit SUS-Enzym durchgeführt.

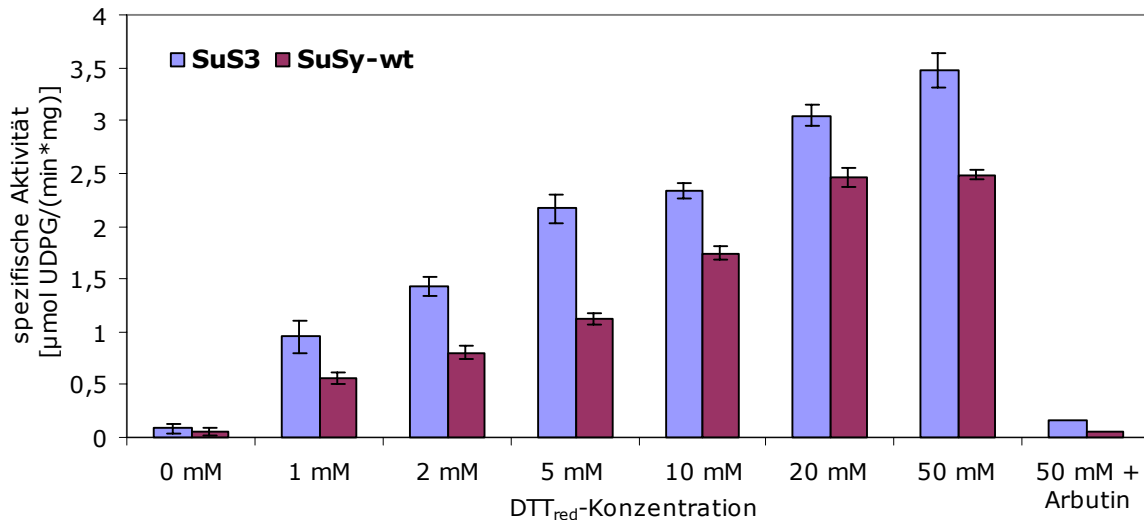


Abb. 3.4.1: Netto-Spaltungsaktivität von SuS3 und SuSy-wt. Dargestellt ist die Differenz der Aktivitätswerte ohne und mit Enzym. Der pH-Wert der Reaktion betrug 8,0. Die 10-minütige Reaktion wurde ohne Vorinkubation in Anwesenheit von 100 mM Saccharose durchgeführt. :

Die Aktivierung beider SUS-Isoformen manifestierte sich deutlich in den kinetischen Parametern der Saccharose-Spaltung (Tab. 3.14). Allein das reduzierende Milieu im Reaktionsansatz führte zu einer erhöhten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und einer drastisch erhöhten Affinität zu Saccharose. Die K_m - und V_{max} -Änderungen der beiden Isoformen lagen in der gleichen Größenordnung. Die höhere Aktivität der SuS3-Isoform ist vermutlich auf den breiteren pH-Optimumsbereich (vgl. 3.2.1) zurückzuführen.

Tabelle 3.14: Kinetische Parameter der SUS-Isoformen in Abhängigkeit von DTT_{red}.

Enzymatische Messungen mit 0-300 mM Saccharose bei pH 8,0 ohne Vorinkubation. Bestimmt wurde die spezifische Aktivität über Quantifizierung von UDP-Glucose [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$].

Isoform	0 mM DTT _{red}		2 mM DTT _{red}		10 mM DTT _{red}	
	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
SuSy-wt	0,49±0,05	130,6±32,46	1,11±0,13	58,78±9,75	2,16±0,32	23,07±6,42
SuS3	0,31±0,05	96,72±11,98	1,87±0,18	47,38±7,01	2,75±0,21	11,14±2,45

Enzymmessungen bei einem pH-Wert von 6,5 nach 30-minütiger Vorinkubation mit DTT_{red} (pH 8,0) zeigten die Aktivierung noch deutlicher. Durch Vorinkubation mit 10 mM DTT_{red} wurde eine maximale Aktivierung erreicht, höhere Konzentrationen bewirkten hier keine weitere Aktivitätssteigerung (Abb. 3.4.2). Das Aktivierungsmuster der beiden Isoenzyme SuSy-wt und SuS3 zeigte auch bei Vorinkubation mit niedrigen DTT-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede. Ferner blieb für beide Enzyme die Substratpräferenz zugunsten von UDP erhalten. Durch die Voraktivierung der SUS-Proteine konnten Enzymaktivitäten ermittelt werden, die mit denen des nativ gereinigten Enzyms (vgl. 3.3.1.2) vergleichbar sind.

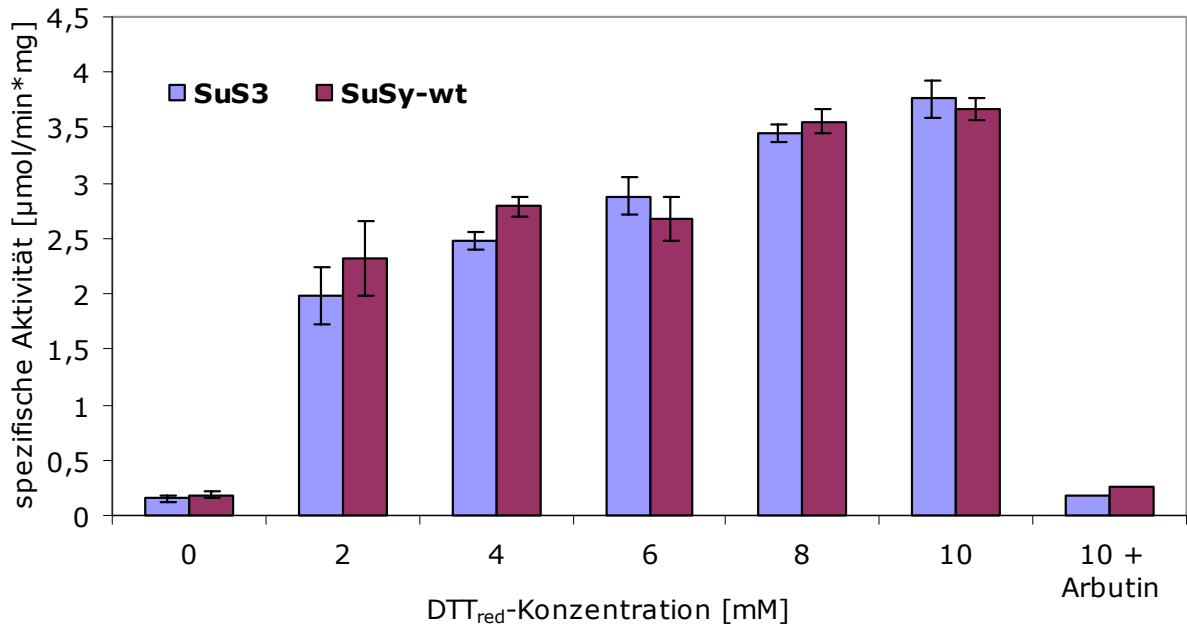


Abb. 3.4.2: Spaltungsaktivität unter Einfluss von DTT_{red} nach Vorinkubation. Der pH-Wert der Reaktion lag bei 6,5. Die Vorinkubationsdauer mit 0-10 mM DTT_{red} betrug 30 min bei pH 8,0. Die Spaltungsreaktion wurde mit 100 mM Saccharose durchgeführt.

Die katalytische Spaltungsaktivität von SuSy-wt und SuS3 war durch DTT_{red} eindeutig aktivierbar. Die oxidierte Form, DTT_{ox}, hingegen inaktivierte beide Enzyme. Um die Reversibilität dieser Enzymregulation zu untersuchen, wurden in Vorinkubationsansätzen die rekombinanten Proteine erst 15 Minuten lang mit DTT_{ox} und dann 15 Minuten lang mit DTT_{red} bzw. erst mit DTT_{red} und anschließend in Gegenwart von DTT_{ox} inkubiert. Anschließende Aktivitätsbestimmungen zeigten für beide Inkubationsvarianten eine Enzymaktivität. Die Regulation beider SUS-Isoformen durch Thiolreagenzien ist *in vitro* reversibel. Durch Reduktion aktiviertes Enzym konnte durch anschließende Oxidation um 65% (SuS3) bzw. etwa 80% (SuSy-wt) inhibiert werden. Ebenso konnte durch Oxidation der Enzyme und anschließende Reduktion etwa 85% (SuS3) bzw. 71% (SuSy-wt) der Aktivität, die durch ausschließliche Reduktion mit DTT_{red} erzielt wurde, zurückgewonnen werden (Abb. 3.4.3).

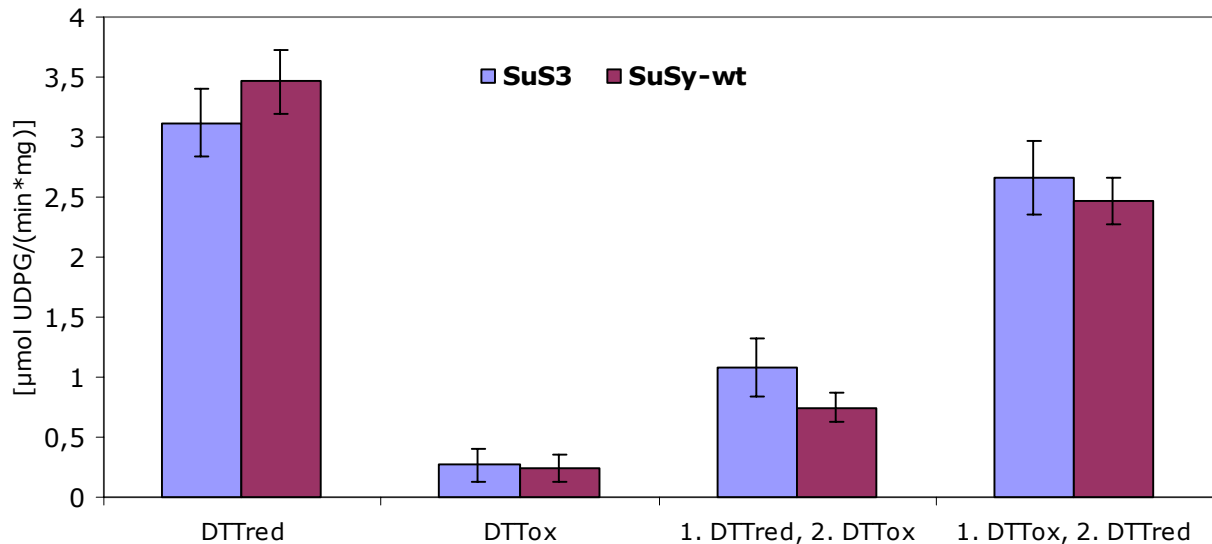


Abb. 3.4.3: Spaltungsaktivität unter Einfluss von DTT_{red} und DTT_{ox}.

Der pH-Wert der Reaktion lag bei 6,5, der pH-Wert im Vorinkubationsansatz betrug 8,0. Die Vorinkubationsdauer mit 10 mM DTT betrug 30 min, wenn nur mit einem Thiolreagenz inkubiert wurde. Wurden beide Thiolreagenzien eingesetzt, wurde je 15 min mit 10 mM der oxidierten oder reduzierten Form von DTT vorinkubiert. Anschließend wurde, ohne vorheriges Entsalzen der Probe) die jeweils andere Form in gleicher Konzentration zugegeben und weitere 15 min vorinkubiert.

Der Effekt von Glutathion auf die SuSy-wt und SuS3-Spaltungsaktivität wurde sowohl mit der reduzierten Form (GSH) als auch mit der oxidierten Form (GSSG) untersucht. GSH erwies sich als geeignetes Reagenz zur Reaktivierung von inaktiver Saccharose-Synthase bezüglich der Spaltungsaktivität. Im Vergleich zu Messungen ohne GSH, die kaum messbare Aktivität zeigten, stieg bei Zugabe von GSH die Spaltungsaktivität beider Enzyme (SuSy-wt und SuS3) linear zur GSH-Konzentration an (Abb. 3.4.4). GSSG bewirkte bei beiden Enzymen keine Zunahme der Spaltungsaktivität. Durch die niedrige Aktivität der Arbutinkontrollen wurde deutlich, dass GSH lediglich das SUS-Enzym, nicht aber andere Komponenten der Aktivitätsmessung beeinflusst. Das physiologische Thiolreagenz Glutathion in seiner reduzierten Form vermochte die SUS-Proteine bei gleichen Konzentrationen weniger effizient zu aktivieren als reduziertes DTT. Die Spaltungsaktivität von SuS3 erreichte auch bei Anwesenheit von GSH wieder höhere Werte als die von SuSy-wt. Während bei einer Konzentration von 2 mM GSH und 100 mM Saccharose beide Isoenzyme gut 0,4 μmol UDP-Glucose pro mg Protein und Minute bildeten, stieg der Wert in Anwesenheit von 50 mM GSH für SuS3 auf etwa 2,1 und für SuSy-wt lediglich auf 1,4 an. Die im Vergleich zum SuSy-wt-Protein generell höhere Aktivität des SuS3-Proteins im leicht alkalischen pH-Bereich könnte als Erklärung dienen. Eine andere Erklärung wäre eine schneller beschleunigte und effizientere Aktivierung der SuS3-Isoform durch Thiolreagenzien.

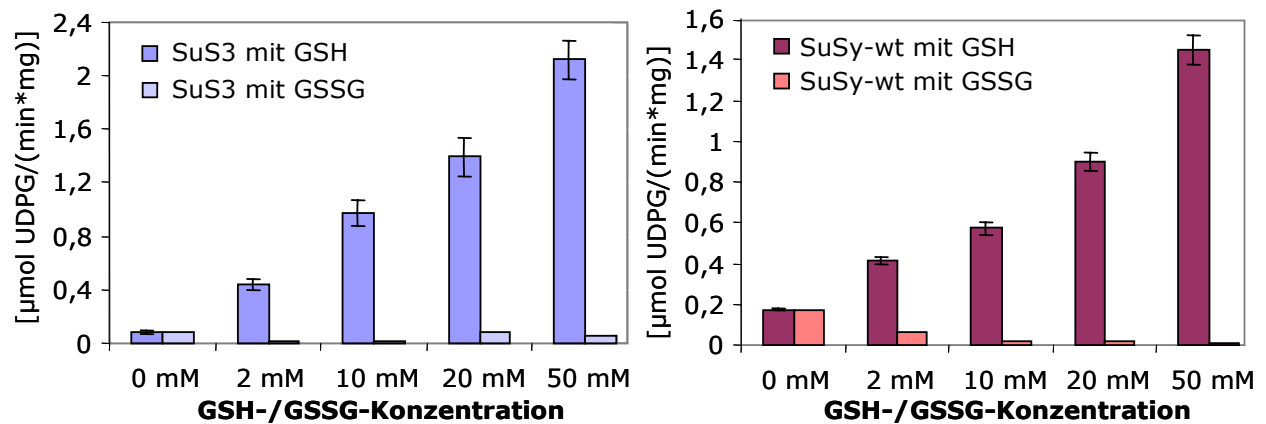


Abb. 3.4.4: Wirkung von GSH und GSSG auf die Spaltungsaktivität von SUS-Isoformen.

Diagramm *links*: SuS3. Diagramm *rechts*: SuSy-wt. Die Versuche wurden bei einem pH-Wert von 8,0 mit 100 mM Saccharose ohne Vorinkubation durchgeführt.

Die Tatsache, dass GSSG und GSH die Enzymaktivität modifizieren, deutet auf einen Thiol-Disulfid-Austausch hin. Glutathion und Thioredoxin (Td) dienen in der Zelle als direkte Überträger von Reduktionsäquivalenten. Beide Reagenzien besitzen exponierte SH-Gruppen, die bei Oxidation inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können.

Bei der Protein-Disulfid-Oxidoreduktase Thioredoxin unterscheidet man in Pflanzen verschiedene Isoformen, zu denen unter anderem die chloroplastidären Thioredoxine *f* (Td *f*), *mb* (Td *mb*) und *mc* (Td *mc*) sowie das cytosolische Thioredoxin *h* (Td *h*), welches in heterotrophen Geweben zu finden ist (ROUHIER et al., 2002), zählen. Es handelt sich um relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa und 95-125 Aminosäureresten. Für verschiedene chloroplastidäre Enzyme ist die Aktivierung durch reduziertes Thioredoxin seit langem bekannt (BUCHANAN et al., 1980).

Bei Versuchen mit Thioredoxinen (Td) bezüglich der Saccharose-Spaltungsrichtung wurden vier verschiedene in der Arbeitsgruppe vorhandene Td verwendet. Es handelte sich um rekombinant exprimiertes Td *f*, welches aus zwei unterschiedlichen Reinigungen stammte (Td *f_I* und Td *f_{II}*) sowie um rekombinantes Td *mb* und rekombinantes Td *mc*. Proteinbestimmungen durch Messungen der UV-Absorption bei 280 nm ergaben Proteinkonzentrationen von 0,09 bis 0,8 µg/µl. Die Reinheit der Td wurde durch Analyse auf 15%-SDS-Gelen (Abb. 3.4.5) untersucht. Bis auf Td *f_{II}* lagen alle Td frei von signifikanten Mengen an Fremdproteinen vor. Td *f_{II}* zeigte leichte Verunreinigungen, hauptsächlich durch ein unbekanntes, etwa 30 kDa großes Protein. Hierbei könnte es sich aber auch um ein Td-Dimer handeln, welches sich durch Reduktion nicht spalten lässt (Prof. Scheibe, persönliche Mitteilung).

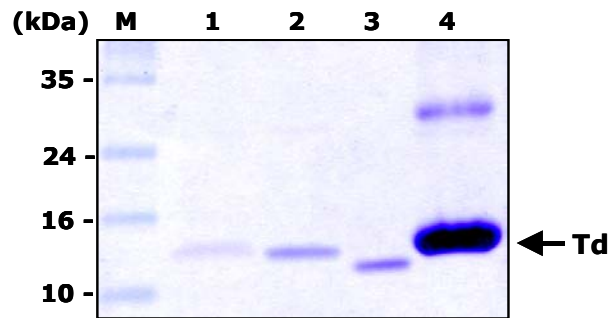


Abb. 3.4.5: SDS-PAGE mit verschiedenen rekombinanten Thioredoxinen.

M: Molekulargewichtsstandard; Spur 1: Td *mc*; Spur 2: Td *mb*; Spur 3: Td *f_I*; Spur 4: Td *f_{II}*.
Es wurden je 20 μ l der Proteinlösungen aufgetragen.

Mit den unterschiedlichen Td sollte die Reduktion der rekombinanten SUS-Isoformen, SuSy-wt und SuS3, vermittelt und die katalytische Spaltungsreaktion aktiviert werden. Da die Td jedoch oxidiert vorlagen, mussten sie in einer Vorinkubationsreaktion zunächst durch DTT_{red} reduziert werden. Dafür erwies sich eine Konzentration von 2 mM DTT_{red} als geeignet. Bei Reduktion durch 1 mM DTT_{red} musste auf eine unzureichende Reduktion der Td geschlossen werden. Höhere Konzentrationen wie 5 und 10 mM DTT_{red} waren ebenfalls geeignet für die Reduktion der Td, reduzierten jedoch die Saccharose-Synthasen auch in Abwesenheit der Td (vgl. Abb. 3.4.2) nahezu vollständig.

Messungen der Saccharose-Spaltungsaktivität mit Td wurden bei pH 6,5 und bei pH 8,0 durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen mit SuSy-wt sind in Abbildung 3.4.6 A und 3.4.6 B dargestellt. Die Arbutinkontrollen, die mit 2 mM DTT_{red} und Td *mc* durchgeführt wurden, erwiesen sich in allen Experimenten als niedrig (< 10%, verglichen mit der Messung mit Td). Die Aktivität von SuSy-wt zeigte sich bei beiden pH-Werten durch Td positiv beeinflusst. Die Kontrollmessung, bei der nur DTT_{red} und kein Td im Ansatz vorhanden war, ergab jeweils niedrigere Werte als die Messungen mit den unterschiedlichen Td. Besonders deutlich wurde die Aktivitätssteigerung bei einem pH-Wert von 8,0. Durch alle getesteten Thioredoxine wurde die katalytische Aktivität deutlich um etwa 90% (Td *f_I*) bis 124% (Td *mb*) gegenüber thioredoxin-freien Proben erhöht.

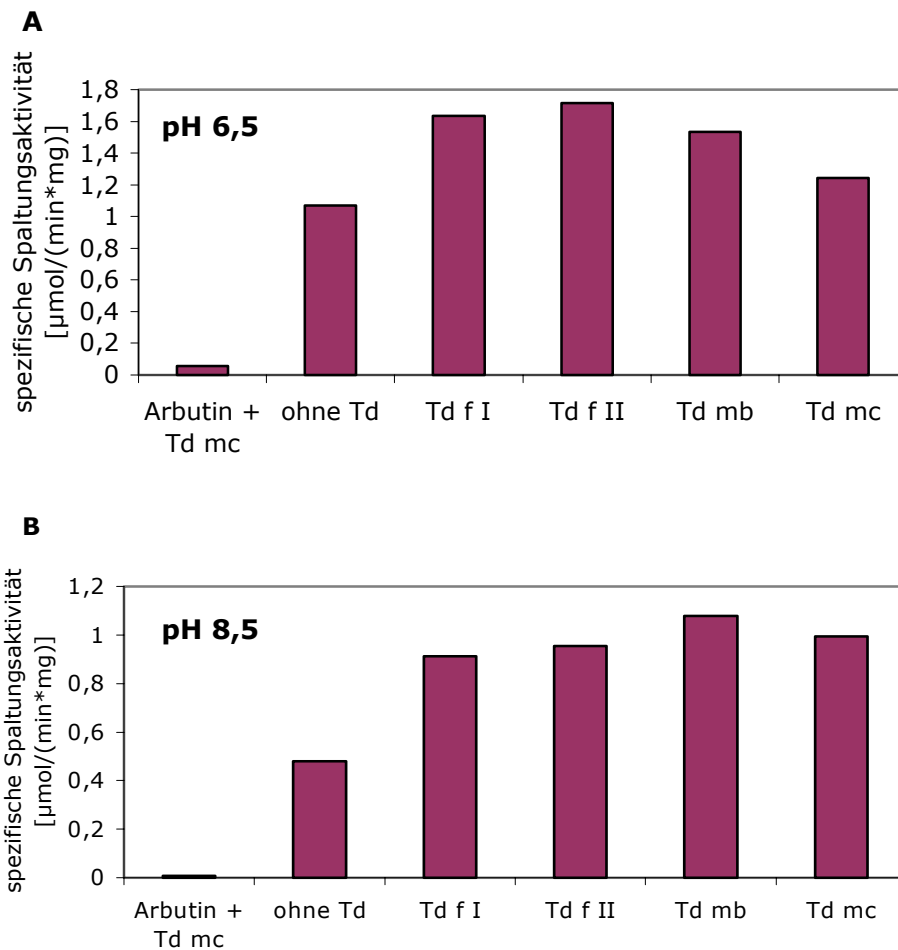


Abb. 3.4.6: Effekte verschiedener Td auf die Saccharose-Spaltungsaktivität von SuSy-wt.

Es wurden jeweils etwa 0,24 μg Td eingesetzt. Die DTT_{red}-Konzentration in der 30-minütigen Vorinkubation betrug 2 mM. **Diagramm A:** pH 6,5. **Diagramm B:** pH 8,5.

Der Effekt von Thioredoxinen auf die Spaltungsaktivität von SuSy-wt wurde außer mit einer Konzentration von 2 mM DTT_{red} zusätzlich mit 5 bzw. 10 mM DTT_{red} im Saccharose-Spaltungsansatz untersucht. Dabei wurden Messungen durchgeführt, bei denen DTT_{red} nur im Vorinkubationsansatz in der angegebenen Konzentration zugegeben wurde. Durch Überführen in den Spaltungsansatz wurde diese Konzentration um den Faktor 2,6 verdünnt. Außerdem wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt, bei denen die DTT_{red}-Konzentration im Vorinkubationsansatz und im Spaltungsansatz identisch war. Beide Messungen zeigten ebenfalls einen deutlichen Effekt der Td auf die Aktivität von SuSy-wt (Abb. 3.4.7), wobei dieser Effekt durch Messungen, bei denen DTT_{red} im Vorinkubations- und Spaltungsansatz enthalten war, stärker sichtbar wurde. Da die Messungen in diesem Versuch mit konstanten DTT_{red}-Konzentrationen durchgeführt wurden, konnte der eventuelle Einfluss des Reagenz auf die Messung vernachlässigt werden.

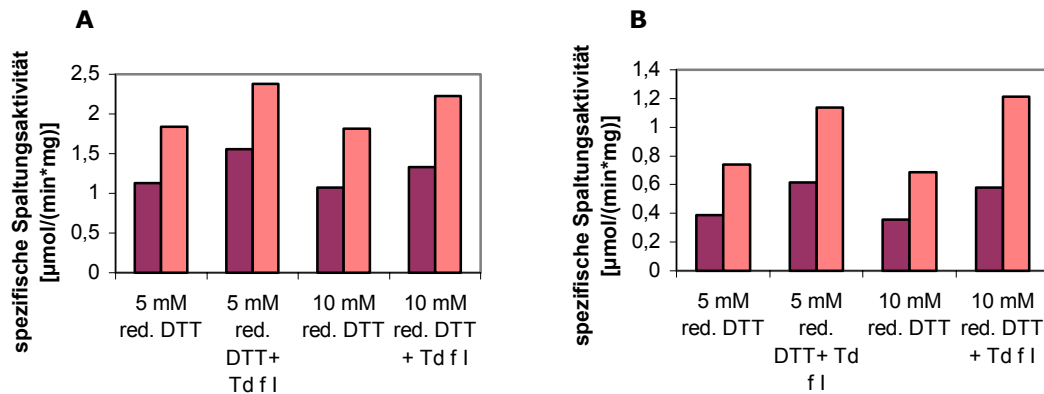


Abb. 3.4.7: Effekt von Td auf die Spaltungsaktivität von SuSy-wt bei hohen DTT_{red} -Konzentrationen. Es wurden jeweils $0,24 \mu\text{g}$ Td pro $1 \mu\text{g}$ SuSy-wt eingesetzt, die bei einer DTT_{red} -Konzentration von 5 bzw. 10 mM vorinkubiert wurden. In der eigentlichen Spaltungsreaktion wurde diese Konzentration entweder verdünnt (dunkle Säulen) oder aufrechterhalten (helle Säulen). Diagramm **A**: pH 6,5. Diagramm **B**: pH 8,0.

Im Gegensatz zur Spaltungsaktivität von SuSy-wt blieb die Aktivität des SuS3-Proteins in der Spaltungsrichtung durch Td weniger deutlich beeinflusst (Abb. 3.4.8). Messungen ohne Td im Vorinkubationsansatz bei einem pH-Wert von 6,5 im Testansatz ergaben im Vergleich zu Messungen mit den unterschiedlichen Td kaum abweichende Werte. Bei einem pH-Wert von 6,5 im Spaltungsansatz wurde für keines der getesteten Td eine Aktivitätsänderung von mehr als 10% gemessen (Abb. 3.4.8).

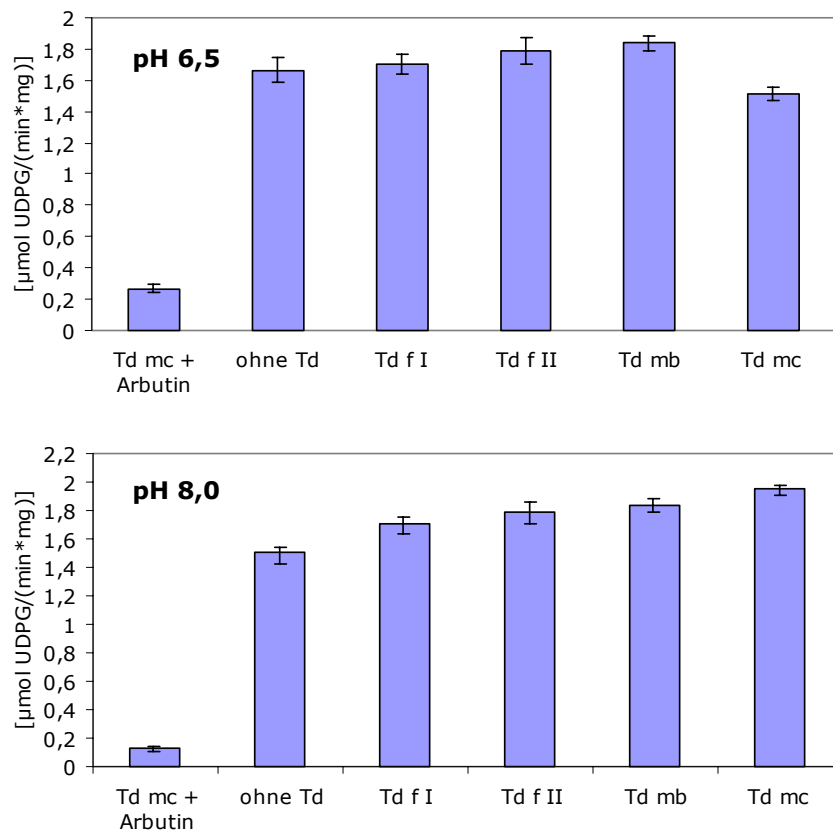


Abb. 3.4.8: Effekt von verschiedenen Td auf die Spaltungsaktivität von SuS3.

Es wurden jeweils $0,24 \mu\text{g}$ Td pro $1 \mu\text{g}$ SuS3-Protein eingesetzt. Die DTT_{red} -Konzentration in der 30-minütigen Vorinkubation betrug 2 mM. Die Spaltungsreaktion wurde bei einem pH von 6,5 und 8,0 durchgeführt.

Für Td *mc* wurde sogar eine leicht verminderte SUS-Aktivität erhalten. Bei einem pH-Wert von 8,0 im Spaltungsansatz wurden hingegen in Abhängigkeit von den Thioredoxinen Aktivitätssteigerungen von etwa 13% (Td *fl*) bis 30% (Td *mc*) ermittelt.

3.4.2 Untersuchungen zur Redox-Modifikation der Syntheseaktivität

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Saccharose-Spaltungsreaktion, da diese *in vivo* bevorzugt abläuft. Weil die SUS-Aktivität jedoch prinzipiell reversible ist, wurden darüber hinaus Untersuchungen zur Redox-Modifikation der katalytischen Saccharose-Synthesereaktion unternommen.

Für die spätere Berechnung synthetisierter Saccharose-Konzentrationen wurde eine Saccharose-Eichreihe mit Konzentrationen von 0-1 mM erstellt (vgl. 2.9.1.1). Aus den ermittelten Daten wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 3.4.8) Durch die Gleichung $y = 0,95 x + 0,0088$ wurde diese Gerade beschrieben.

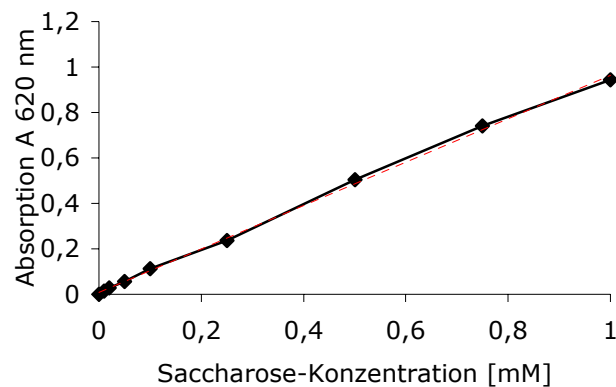


Abb. 3.4.9: Saccharose-Eichgerade für die Untersuchung der Syntheserichtung. Mit Hilfe von linearer Regression wurde eine Trendgerade (rot gestrichelt) eingefügt, die durch die Geradengleichung $y = 0,95 x + 0,0088$ beschrieben wurde. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Gerade betrug 0,9987.

Die Syntheseaktivität sowohl von rekombinanter SUS1 (SuSy-wt) als auch von SuS3 wurde unter dem Einfluss von DTT_{red} und DTT_{ox} untersucht. Die Untersuchungen wurden bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt, so dass eine effiziente Reduktion oder Oxidation durch DTT gewährleistet war. Außerdem lag das pH-Optimum der Synthesereaktion bei pH 7,5. Die katalytischen Messungen fanden nach 30-minütiger Vorinkubation der Enzyme mit und ohne DTT statt. SuSy-wt und SuS3 waren unter niedrigen und hohen DTT-Konzentrationen aktiv. Im Gegensatz zur Spaltungsreaktion der Enzyme kam die Synthesereaktion durch oxidierende Bedingungen nicht vollständig zum Erliegen. Trotz der tendenziell ähnlichen katalytischen Eigenschaften der beiden Isoenzyme ergaben sich im detaillierten Vergleich für SuSy-wt und SuS3 abweichende Ergebnisse.

Bei der Inkubation von SuSy-wt mit DTT_{red}-Konzentrationen bis 50 mM (Abb. 3.4.10) im Reaktionsansatz zeigte sich eine Steigerung der Aktivität bis zu einer Konzentration von 5-10 mM DTT_{red}. Bei höheren Konzentrationen sank die Syntheseaktivität dagegen wieder ab,

bis bei 50 mM DTT_{red} etwa 58% des Ausgangswerts ohne DTT_{red} erreicht war. Protein, welches länger bei 4°C gelagert wurde, zeigte ebenso wie frisch gereinigtes und dialysiertes Protein auch in Abwesenheit von DTT Syntheseaktivität. Bei der Inkubation mit oxidiertem DTT ergab sich, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, eine relativ konstante SuSy-wt-Syntheseaktivität, die ungefähr bei 75-90% der Grundaktivität lag. Bei einer DTT_{ox} -Konzentration von 50 mM sank die Aktivität auf etwa 67% des Ausgangswertes.

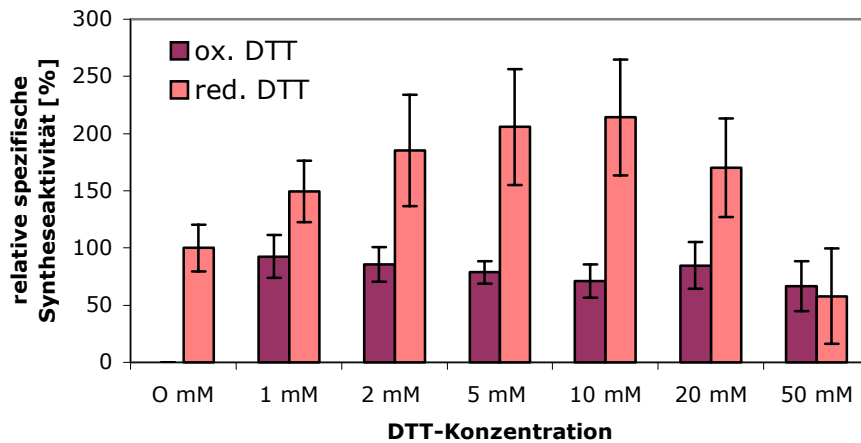


Abb. 3.4.10: Syntheseaktivität von SuSy-wt mit DTT_{ox} und DTT_{red} .

Gezeigt sind die Mittelwerte von drei Messungen. Die Reaktionen wurden bei pH 7,5 durchgeführt. Die Aktivität von 1-3 μg SuSy-wt wurde nach 30 minütiger Vorinkubation mit DTT bestimmt. Die Aktivität ohne DTT betrug 10,47 U/mg und wurde als 100% festgesetzt. Helle Säulen: DTT_{red} ; Dunkle Säulen: DTT_{ox} .

Für SuS3-Isoform ergaben sich in Abhängigkeit von DTT abweichende Aktivitätswerte (Abb. 3.4.11). Hier stieg die Aktivität bei Anwesenheit von 1 mM DTT_{red} um etwa 120%, verglichen mit Messungen ohne DTT_{red} . Im Gegensatz zu SuSy-wt konnte unter zunehmend reduzierenden Bedingungen keine weitere Aktivitätssteigerung von SuS3 erreicht werden. Die Synthesaktivität blieb bis zu Konzentrationen von 5 mM an reduziertem DTT nahezu konstant auf dem hohen Aktivitätsniveau. Bei steigender Reduktionsmittelkonzentration wurde eine zunehmende Inaktivierung gemessen. Konzentrationen von 10-50 mM DTT_{red} führten zum stetigen Absinken der katalytischen Aktivität bis auf etwa 95% des Ausgangswertes.

Oxidiertes DTT bewirkte bei Konzentrationen bis 10 mM, mit einem Anstieg um 20%, eine vergleichsweise geringe Aktivierung der Synthesereaktion von SuS3. Ebenso wie bei der Spaltungsreaktion von SuS3 ging die Syntheseaktivität bei Konzentrationen über 10 mM DTT_{ox} langsam bis auf 86% des Ausgangswertes zurück (Abb. 3.4.11).

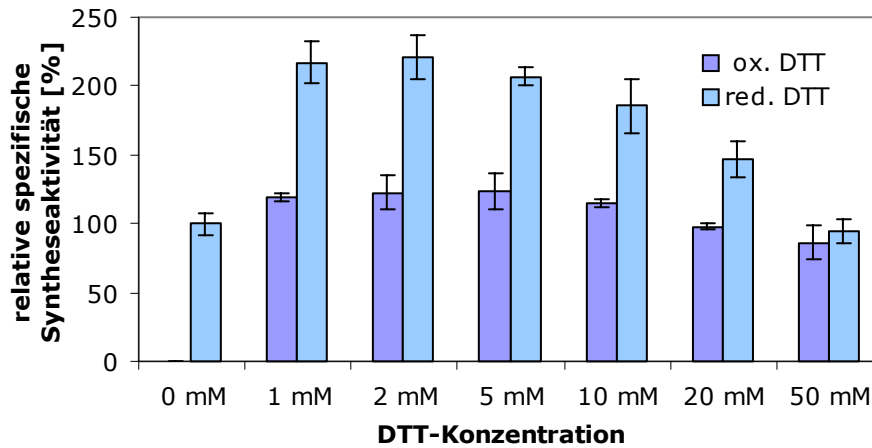


Abb. 3.4.11: Syntheseaktivität von SuS3 mit DTT_{ox} und DTT_{red}. Die Reaktion wurde bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µg SuS3 eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem reduzierenden Reagenz 2-Mercaptoethanol sowie den oxidierenden Reagenzien Diamide und Wasserstoffperoxid erhalten. Die Reversibilität der vermittelten Reaktionen wurde für diese Substanzen allerdings nicht untersucht.

3.4.3 Ortsspezifische Mutagenese an Cysteinen

Der Redoxstatus von Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) beeinflusst die Aktivität und Struktur vieler Enzyme. In Proteinen tragen die Cysteinreste die am leichtesten zu oxidierenden Sulfhydryl-Gruppen. Eine Oxidation dieser SH-Gruppen kann zur Ausbildung inter- und intramolekularer Brücken zwischen Proteinen sowie zur Inaktivierung von Enzymen führen. Die Aminosäuresequenzen der Saccharose-Synthasen monokotyler und dikotyler Pflanzen enthalten einige Cysteine, die mehr oder weniger hoch konserviert sind. Die Sequenz der SUS1-Isoform aus Mais umfasst insgesamt elf Cysteine, die der SuS3-Isoform hingegen nur sieben. Sequenzvergleiche der beiden Isoformen SUS1 und SuS3 aus Mais zeigten, dass fünf dieser Cysteine in beiden Sequenzen konserviert sind (Tab. 3.15). Durch Vergleiche mit 26 Saccharose-Synthasen anderer Spezies wurden insbesondere die Cysteinreste an den Positionen C352 und C437 in SUS1 (C347 und C432 in SuS3) als hoch konserviert eingestuft. Diese Cysteinreste könnten daher für die vermutete Redoxmodulation des SUS-Protein verantwortlich sein.

Tabelle 3.15: Aminosäure-Positionen von Cysteinresten in SUS1 und SuS3 und Darstellung des Konservierungsniveaus.

Die SUS-Sequenzen aus Mais wurden mit 26 SUS-Sequenzen anderer Organismen verglichen.

SUS1 (<i>Z. mays</i>)	SuS3 (<i>Z. mays</i>)	Hochkonserviert	Semikonserviert	Unkonserviert
-	174		-	++
248	-		++	
329	-			++
352	347	++		
365	-			++
426	-		++	
437	432	++		
466	461		++	
-	595			++
613	-			++
665	-		++	
690	686	++		
734	730	++		

Ein Austausch dieser Cysteinreste könnte in einem veränderten Aktivitätsmuster sichtbar werden. Durch eine ortsspezifische Mutagenese in der DNA-Sequenz von SUS1 sollten die beiden konservierten Cysteine C352 sowie C437 durch die strukturanaloge Aminosäure Serin (vgl. 2.4.6.4) ersetzt werden. Die SUS1 Mutanten C352S und C437S sowie die Doppelmutante C352/437S wurden durch Nukleotidaustausche im SuSy-wt-Plasmid generiert. Obwohl die Sequenzierung mehrerer unabhängiger Plasmide den korrekten Austausch der Cysteine und eine fehlerfreie Klonierung der cDNA im Leseraster des Expressionsvektors dokumentierte, konnte lediglich die C352S-Mutante erfolgreich überexprimiert werden. Das Expressions- und Reinigungsmuster des C352S-Proteins war mit dem des rekombinanten Wildtyps (SuSy-wt) vergleichbar. Die C352S-Mutante zeigte katalytische Aktivität bezüglich Saccharose-Spaltung und Saccharose-Synthese. Im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp waren die Enzymreaktionen in Synthese- und Spaltungsrichtung stark vermindert. Messungen zur Saccharose-Spaltungsreaktion mit und ohne Vorinkubation mit Thioreagenzen zeigten, dass bei pH-Werten von 6,5-8,5 die C352S-Mutante einheitlich eine sehr geringe Aktivität besitzt. Dennoch konnte festgestellt werden, dass reduzierende Bedingungen das C352S-Protein aktivieren. In Abb. 3.4.12 sind exemplarisch die Mittelwerte der Saccharose-Spaltungsaktivitäten von SuSy-wt und C352S dargestellt. Determiniert wurde die gebildete UDP-Glucose in Abhängigkeit unterschiedlicher DTT-Konzentrationen. In Gegenwart von 50 mM DTT_{red} würde für C352S eine katalytische Aktivität gemessen, die für SuSy-wt bereits bei einer DTT-Konzentration von 10 mM erreicht worden war.

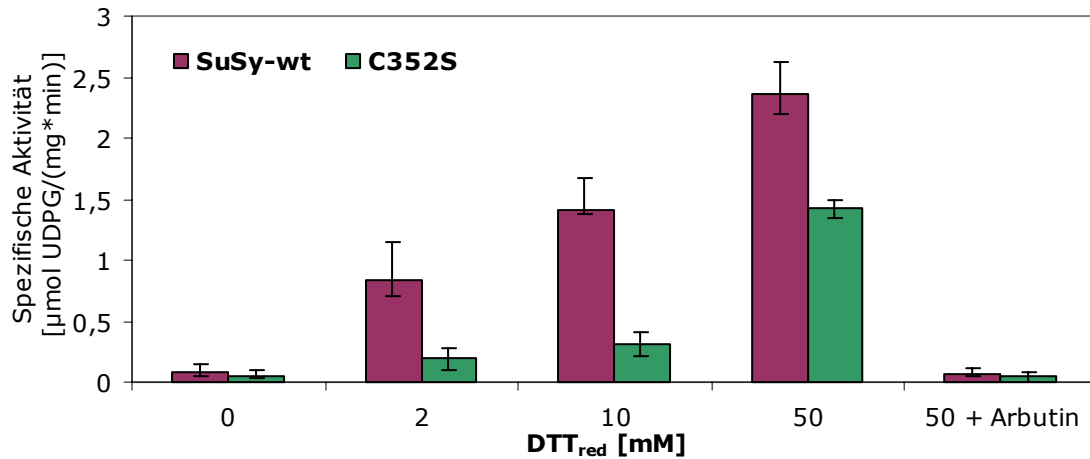


Abb.3.4.12 Netto-Spaltungsaktivität von SuSy-wt und C352S in Abhängigkeit von der DTT_{red}-Konzentration.

Dargestellt ist die Differenz der Aktivitätswerte ohne und mit Enzym. Der pH-Wert der Reaktion betrug 8,0. Die 10-minütige Reaktion wurde ohne Vorinkubation in Anwesenheit von 100 mM Saccharose durchgeführt.

Die Cystein-Mutante C352S zeigte nicht nur verminderte Saccharose-Spaltungsaktivität, sondern war auch hinsichtlich der Synthese von Saccharose weitaus weniger aktiv als der Wildtyp. Die Grundaktivität von C352S erreichte lediglich 20% der Grundaktivität des Wildtyps (Abb. 3.4.12). Glutathion in seiner reduzierten und oxidierten Form scheint auf Syntheseaktivität von C352S keinen Einfluss zu nehmen. C352S zeigte im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp keine veränderte Substratspezifität. Die Präferenz lag wie bei SuSy-wt auf UDP-Glucose. Während für ADP-Glucose minimale Umsatzraten gemessen werden konnten, war die Aktivität in Abhängigkeit von GDP-Glucose nicht mit den gewählten Messmethoden detektierbar.

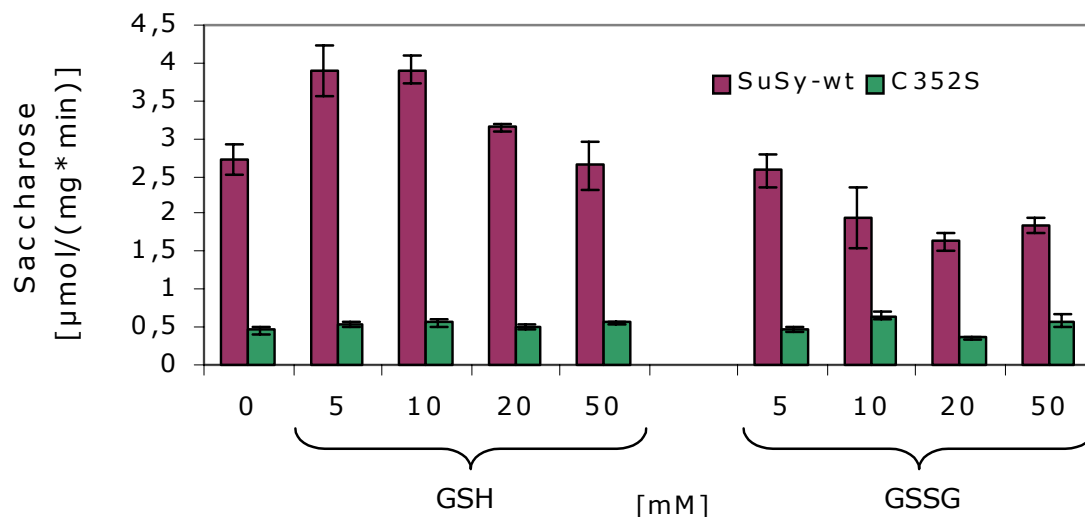


Abb. 3.4.13: Syntheseaktivität des Wildtyps und der Cystein-Mutante mit GSH und GSSG.

Gezeigt sind die Mittelwerte von drei Messungen. Die Reaktionen wurden bei pH 7,5 durchgeführt. Es wurden 2,4 µg rekombinantes Enzym eingesetzt. Die Quantifizierung der gebildeten Saccharose erfolgte mittels der „Anthrone-Methode“.

Die deutlich verminderte Saccharose-Spaltungsaktivität der Cystein-Mutante C352S im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp deutet auf die Beteiligung des Cysteinrestes an Position 352 im SUS1-Protein aus Mais an der katalytischen Aktivität hin. Widersprüchlich sind die gemessenen Aktivitäten der Saccharose-Synthase. Unter der Hypothese, dass Oxidation des SUS-Proteins keinen, oder lediglich einen marginalen, Einfluss auf die Syntheseaktivität hat, sollte der konservierte Austausch eines Cysteinrestes gegen ein strukturanaloges Serin nicht zu einer verminderten katalytischen Aktivität führen.

Einfluss von Thioreagenzien auf die Aktin-Assoziation von SUS

Während Thioreagenzien die katalytische Aktivität der untersuchten Saccharose-Synthasen stark beeinflussten, wurde das assoziative Verhalten der Enzyme nicht beeinflusst. Sowohl die zuvor oxidierten als auch die reduzierten SUS-Proteine SuSy-wt, C352S und SuS3 zeigten eine starke Aktin-Assoziation. Abbildung 3.4.13 zeigt eine exemplarische SDS-PAGE der Assoziationsfraktionen von SuSy-wt mit Aktinfilamenten in Abhängigkeit von reduktiven und oxidativen Bedingungen. Reduktion und Oxidation des Enzyms mit je 50 mM Thioreagenz führten zu keiner signifikanten Änderung der Aktinbindung, statt dessen konnte eine verminderte Polymerisationsfähigkeit des Aktins durch den Eintrag von oxidativen Reagenzien beobachtet werden. Durch das Überführen der vorinkubierten Enzymlösung lagen im Assoziationsansatz die Thioreagenzien mit einer Endkonzentration von 10 mM vor.

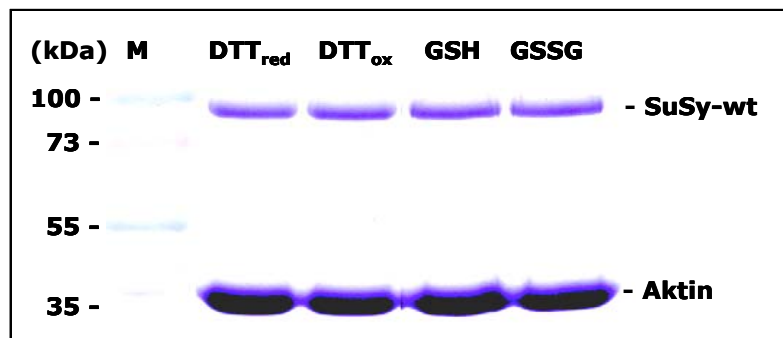


Abb. 3.4.14: Einfluss von Thioreagenzien auf die Aktin-Assoziation von SUS.

3.4.4 Alkylierung von Sulfhydryl-Gruppen

An der Modifizierbarkeit der Enzymaktivität von Saccharose-Synthase könnten inter- und intramolekulare Disulfid-Bindungen beteiligt sein. Die Zusammensetzung des nativen Enzyms als Homo- oder Heterotetramer *in vivo* ist nicht abschließend geklärt (vgl. 3.5.3). Das rekombinante SUS1-Protein (SuSy-wt) konnte in einer nativen Gelelektrophorese überwiegend als Dimer und Tetramer detektiert werden (Abb. 3.4.14). Proteinmonomere lagen nur in geringeren Menge vor, ebenso wie die trimere Konformation.

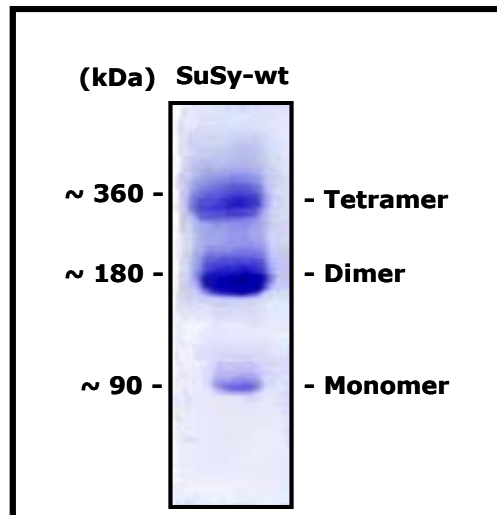


Abb. 3.4.15: BN-SDS vom rekombinanten Saccharose-Synthase-Wildtyp.
6-16% Blue-Native-SDS-PAGE des heterolog exprimierten SuSy-wt-Proteins.

Reduktionsmittel, wie z.B. DTT oder β -ME, können inter- und intramolekulare Disulfidbrücken reduzieren. Die Reoxidation der entstandenen Sulfhydrylgruppen kann durch Alkylierung mit dem ungeladenen Iodacetamid (IAM) unter Bildung von S-Carboxamidomethylcystein verhindert werden. Außerdem kann die Alkylierung mit der negativ geladenen Iodessigsäure (IAA) erfolgen. Durch die Reduktion des SUS-Proteins mit DTT und die anschließende Alkylierung aliquoter Anteile in Anwesenheit unterschiedlicher IAA/IAM-Verhältnisse, können die Ladungszustände der jeweiligen Proben in einer Harnstoff-Gelelektrophorese detektiert werden. Für das rekombinante SUS1-Protein wurde in Abhängigkeit vom eingesetzten IAA/IAM-Verhältnis ein variierendes Laufverhalten ersichtlich (Abb. 3.4.15).

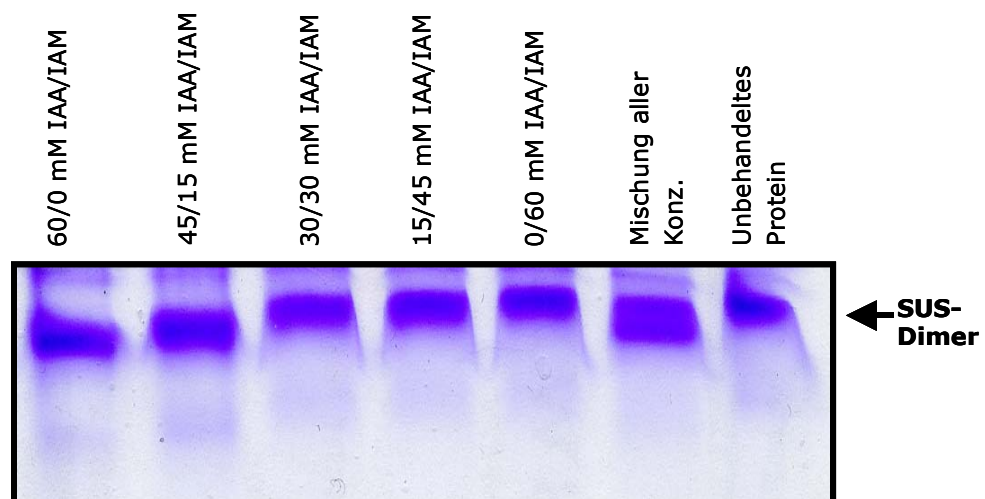


Abb.3.4.16: Ein-Schritt-Alkylierung von SuSy-wt in Gegenwart in IAA/IAM.

SuSy-wt wurde mit 20 mM DTT_{red} reduziert und anschließend mit Iodessigsäure (IAA) und/oder Iodacetamid (IAM) alkyliert. Die alkylierenden Substanzen wurden insgesamt mit einer Endkonzentration von 60 mM eingesetzt. Dargestellt sind die dimeren Proteinbanden nach Auftrennung durch die Harnstoff-Gelelektrophorese.

Am deutlichsten zeigte sich das unterschiedliche Laufverhalten bei Betrachtung der Protein-Dimere. Mit 20 mM DTT reduziertes Protein lief nach Alkylierung ausschließlich mit 60 mM IAA tiefer im Gel als Protein, welches nach Reduktion ausschließlich mit 60 mM IAM alkyliert wurde. Die Proteinspur, in der eine Mischung aus allen Alkylierungsansätzen aufgetrennt wurde, lässt bei genauer Betrachtung zwei divergente Banden für das SUS-Dimer erkennen. Unbehandeltes Protein lief etwa auf der Höhe des ausschließlich mit IAM alkylierten Proteins. Der beschriebene „Shift“ im Laufverhalten in Abhängigkeit der alkylierten Sulfhydryl-Gruppen ist auch bei den einzelnen Monomeren ersichtlich, allerdings wurde mit steigender IAM-Konzentration die korrespondierende Bande zunehmend diffus.

Die Ein-Schritt-Alkylierung der SUS1-Mutante, C352S, zeigte im Gegensatz zu SuSy-wt keinen zusätzlichen Ladungseintrag nach Reduktion mit DTT und Alkylierung mit IAA (Abb. 3.4.16 B). Die dimere Proteinbande von C352S lief unbeeinflusst von dem jeweils eingesetzten Alkylierungsagensatz auf gleicher Höhe wie die unbehandelte Probe. Auch die Auftrennung der Mischung aller Alkylierungsansätze ließ lediglich eine einzige Bande für das C352S-Dimer erkennen.

Native Gelelektrophorese von C352S zeigte, dass der Austausch des Cysteinrestes an Position 352 gegen einen Serinrest nicht die Di- bzw. Tetramerisierung des Enzyms blockiert (Abb. 3.4.16 A). Wenn das Cystein C352 an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt sein sollte, scheint diese inter- und nicht intramolekular vorzuliegen.

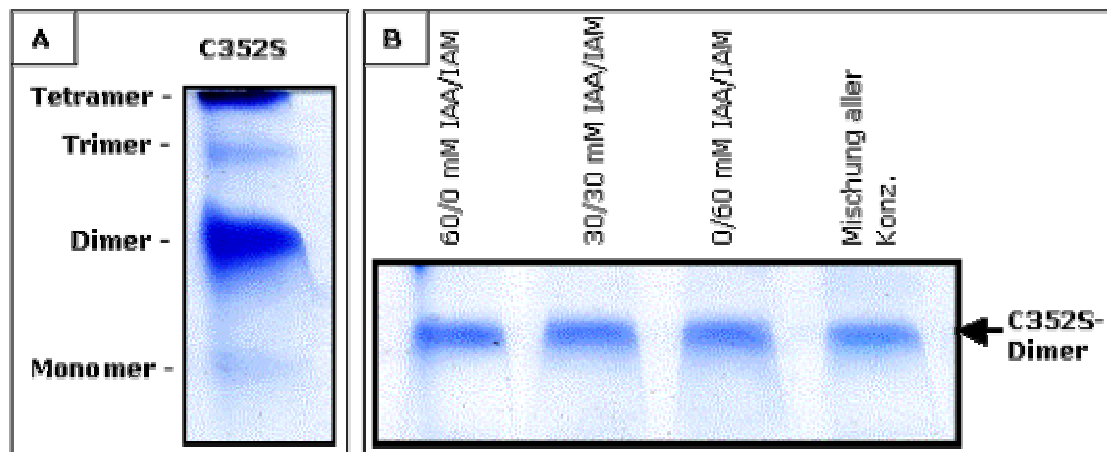


Abb. 3.4.17: (A) Elektrophoretische Auftrennung der C352S-Mutante (B) Ein-Schritt-Alkylierung von C352S.

C352S wurde mit 20 mM DTT_{red} reduziert und anschließend mit Iodessigsäure (IAA) und/oder Iodacetamid (IAM) alkyliert. Die alkylierenden Substanzen wurden insgesamt mit einer Endkonzentration von 60 mM eingesetzt. Dargestellt sind die dimeren Proteinbanden nach Auftrennung durch die Harnstoff-Gelelektrophorese.

In einem weiteren Versuch wurde das unterschiedliche Laufverhalten von unreduziertem und mäßig reduziertem SuSy-wt-Protein verglichen. Während ohne vorherige Reduktion durch 10 mM mit dem negativ geladenen IAA nur die frei zugänglichen SH-Gruppen alkyliert werden, erhalten die durch Reduktion neu gebildeten SH-Gruppen durch Alkylierung mit IAA einen zusätzlichen Ladungseintrag. An der dimeren Proteinbande von SuSy-wt wurde das

hieraus resultierende divergente Laufverhalten deutlich sichtbar. Während durch Harnstoff entfaltetes Protein ohne Reduktion deutlich oberhalb der „180 kDa“-Markerbande lief, wurde die entsprechende Bande nach Reduktion nur knapp oberhalb dieser Markerbande sichtbar (Abb. 3.4.17). Die „180 kDa“-Markerbande konnte im Harnstoffgel nicht als Molekulargewichtsstandard verwendet werden, sondern lediglich zur Orientierung der Laufhöhe der einzelnen Polypeptide im Gel. Wieder zeigte sich, dass die dimere Konformation erhalten bleibt und die Disulfidbrücke wahrscheinlich intramolekular vorliegt.

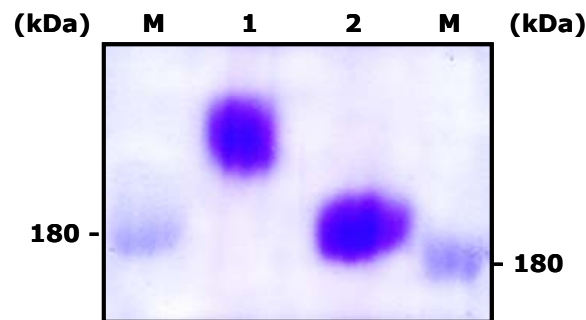


Abb. 3.4.18: Alkylierung von SH-Gruppen vor und nach Reduktion.

Die zugänglichen SH-Gruppen in SuSy-wt wurden unter Anwesenheit von 8 M Harnstoff vor (Spur **1**) und nach Reduktion mit DTT (Spur **2**) durch IAA alkyliert. Harnstoff-Gelelektrophorese zeigt die unterschiedlichen Ladungszustände der SuSy-wt-Dimere. **M**: entfaltete „180 kDa“-Markerbande zur Orientierung der Laufhöhe; aber nicht zur als Molekulargewichtsbestimmung.

3.4.5 Nachweis der Konformationsänderung durch Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz von Proteinen, die alle drei aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) enthalten, wird in der Regel durch den Beitrag der Tryptophanreste bestimmt. Die Eigenschaft der Saccharose-Synthase, bei Anregung mit UV-Licht zu fluoreszieren, wurde ausgenutzt, um Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Thioreagenzien zu untersuchen. In der SUS1-Proteinsequenz sind insgesamt zehn Tryptophan-, 35 Tyrosin- und 37 Phenylalanin-Reste enthalten. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm erfolgte die Messung der Fluoreszenzemission von Tyrosin und Tryptophan im Wellenlängenintervall von 300-530 nm. Fluoreszenzemissionsspektren von reduziertem und oxidiertem SUS-Protein sind in Abb. 3.4.18 dargestellt. In LSB-Puffer überführtes SUS-Protein lag durch Anwesenheit von 0,5 mM DTT_{red} in leicht reduzierter Konformation vor und zeigte eine deutliche Fluoreszenzemission. Das Fluoreszenzmaximum lag bei 338 nm. Unter zusätzlicher Anwesenheit des SUS-Substrates Saccharose war ebenfalls eine deutliche Fluoreszenzemission detektierbar.

Durch Oxidation des SUS-Proteins mit GSSG oder DTT_{ox} nahm die messbare relative Fluoreszenz (RF) im untersuchten Bereich bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm deutlich ab. Vollständig oxidiertes Enzym zeigte ebenso wie enzymfreie Kontrollproben keine Fluoreszenzemission. Die Änderung der Fluoreszenz zeigte, dass das SUS-Protein eine Konformationsänderung in Abhängigkeit von oxidativen Reagenzien durchlief. Infolgedessen sind die fluoreszierenden Tryptophan- und/oder Phenylalaninreste in der Tertiärstruktur

nicht mehr derart exponiert, dass sie durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 280 nm zwischen 300 und 530 nm fluoreszieren.

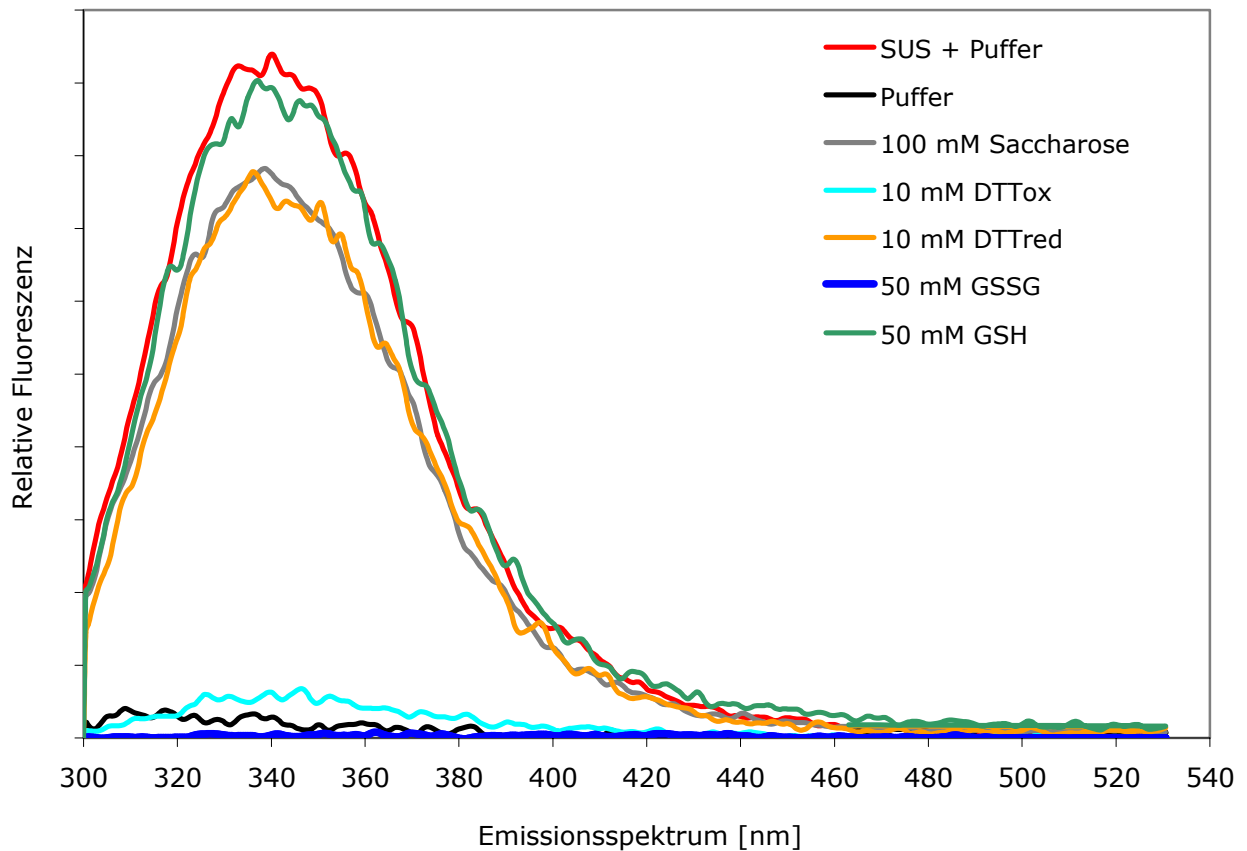


Abb. 3.4.19: Fluoreszenzemissionsspektrum von SUS-Protein bei 280 nm Anregung.

Alle Spektren wurden in LSB-Puffer (2.10.1) mit und ohne Thioreagenzien und Saccharose bei 25°C, wie in 2.19 beschrieben, mit dem Perkin Elmer Luminescence Spectrometer aufgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte aus jeweils vier Messungen. Die Proteinkonzentration betrug 65 µg/ml.

3.4.6 Quantifizierung von freiem und proteingebundenem Glutathion

Zur Ermittlung des Redoxstatus verschiedener Maisgewebe erfolgte die Quantifizierung von reduziertem und oxidiertem Glutathion. Gehalte an freiem Glutathion sowie Verhältnisse zwischen oxidiertem und reduziertem Thiol wurden bisher nur für Maiswurzeln und sieben Tage alte Keimlinge bestimmt (Kocsy et al., 2001). Der Gesamt-Glutathiongehalt setzt sich aus dem freien und proteingebundenen GSH und dem freien GSSG zusammen. Das Verhältnis von GSH zu GSSG gibt Hinweise auf den Redoxstatus der Zelle (Tab. 3.16) Die Quantifizierung erfolgte in zwei unabhängigen Messungen durch HPLC (vgl. 2.13). Abbildung 3.4.19 gibt die absoluten Gehalte von GSH (frei und proteingebunden) und GSSG an. Die Messungen zeigten, unterschiedliche Thiolgehalte für die einzelnen Gewebetypen. Für alle Gewebe wurde ein erheblicher Teil des reduzierten Glutathions in gebundener Form gefunden.

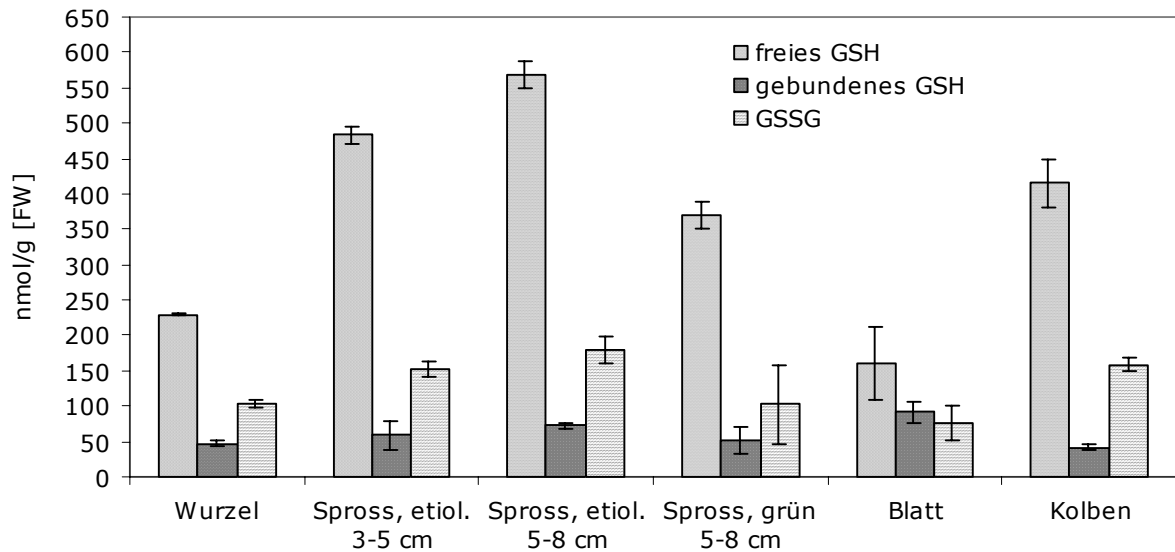


Abb. 3.4.20: Quantifizierung von freiem und proteingebundenem Glutathion.

Angegeben sind die Gehalte an freiem und proteingebundenem GSH sowie freiem GSSG verschiedener Maisgewebe in nmol pro Gramm Frischgewicht (FW). Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC.

Wurzel: Gesamtes Wurzelgewebe 7 Tage alter Maispflanzen. **Spross, etiol. 3-5 cm:** Die basalen 3-5 cm Gewebe 7 Tage alter etiolierter Keimlinge. **Spross, etiol. 5-8 cm:** Die basalen 5-8 cm Gewebe 7 Tage alter etiolierter Keimlinge. **Spross, grün 5-8 cm:** Die basalen 5-8 cm Gewebe 14 Tage alter, lichtkultivierter Pflanzen. **Blatt:** Gesamtes Blattgewebe 14 Tage alter, lichtkultivierter Pflanzen. **Kolben:** Gewebe sich entwickelnder Kolben, mit 6-8 cm Länge.

Tabelle 3.16: Verhältnis von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Maisgeweben.

Das Verhältnis ergibt sich aus dem Quotienten der Summe des gesamten GSH (frei + gebunden) und GSSG. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei Messungen. Legende wie in Abb. 3.4.19.

Gewebe	Wurzel	Spross, etiol. 3-5 cm	Spross, etiol. 5-8 cm	Spross, grün	Blatt	Kolben
Verhältnis GSH/GSSG	2,7	3,6	3,6	4,1	3,3	2,9

Immundetektion zeigte in sämtlichen Gewebeprobe der HPLC-Analyse ein Signal für SUS-Protein. Semiquantitative Analyse des SuS-ct-Antikörpersignals weist auf die größten Mengen an SUS-Protein im Gewebe etiolierter, kultivierter Maiskeimlinge hin.

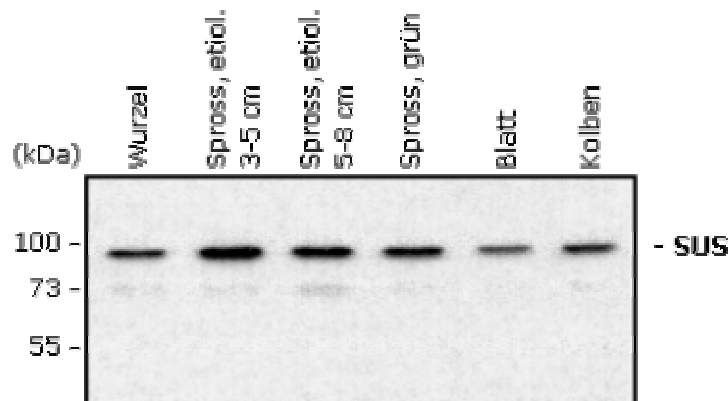


Abb. 3.4.21: Immundetektion von SUS-Protein in Gewebeprobe der HPLC-Analyse.

Je Spur wurden 7 µg Gesamtprotein verschiedener Maisgewebe in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Antikörper SuS-ct analysiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL. Legende wie in Abb. 3.4.19.

3.4.7 Glutathionylierung durch BioGEE

Die Aktivierung der Saccharose-Synthase-Spaltungsreaktion durch reduziertes Glutathion sowie die Inaktivierung durch oxidiertes Glutathion (3.4.1) deutet auf eine mögliche Glutathionylierung der Saccharose-Synthase hin.

3.4.7.1 Glutathionylierung von Proteinen etiolierter Protoplasten durch BioGEE

Nachdem der Einfluss von Glutathionylierung auf diverse Enzymaktivitäten vor allem im tierischen System eingehend untersucht wurde (GILBERT, 1984), wurden erstmals von ITO et al. (2003) verschiedene glykolytische Enzyme in *A. thaliana* als glutathionylierbar beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die putative Glutathionylierung immunologisch mit biotinyliertem GSH (BioGEE, glutathione ethyl biotin amide ester) überprüft werden. Protoplasten aus etiolierem Maisgewebe wurden isoliert und durch Inkubation mit den Oxidanzien Diamide und H_2O_2 einem oxidativen Stress ausgesetzt. Gleichzeitig wurden Kontrollproben mit reduziertem DTT, β -ME oder ohne Thioreagenz inkubiert (vgl. 2.17). In diesem *in situ*-System könnten die infolge der Oxidation entstandenen Disulfidbrücken mit dem membrangängige BioGEE durch Thiol-Disulfid-Austausche gemischte Disulfide ausbilden. Das proteingebundene Glutathion könnte anschließend mit Hilfe des gekoppelten Biotins immunologisch nachgewiesen werden. Die Isolierung vitaler Protoplasten sowie ihre Intaktheit vor und nach der Versuchsdurchführung wurde lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 3.4.21).

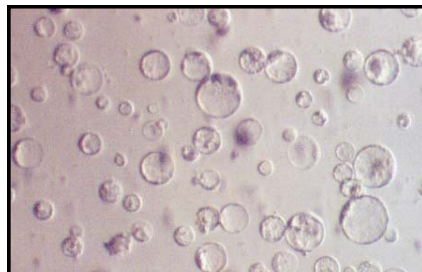


Abb. 3.4.22: Etiolierte Mais-Protoplasten nach Inkubation mit Diamide und BioGEE. Lichtmikroskopische Aufnahme. Die Mehrzahl der Protoplasten zeigte intakte, sphärische Gestalt.

Die Inkubation von isolierten Mais-Protoplasten mit BioGEE ($50 \mu\text{M}$) alleine führte zu einer Bindung von BioGEE an mehrere Proteine (Abb. 3.4.22). Im Vergleich zur unbehandelten Protoplasten-Probe (Abb. 3.4.22, Spur 1) wurden nach Inkubation mit BioGEE deutliche Banden durch Immundetektion sichtbar (Abb. 3.4.22, Spur 2). Eine Hauptbande lief auf der Höhe von etwa 70 kDa. Durch H_2O_2 und Diamide wurde oxidativer Stress simuliert. Dieser Stress sollte in vermehrter Bindung von BioGEE an Proteine resultieren. Unter Einfluss von H_2O_2 wurde nur ein schwaches Signal erhalten. Detektierbar waren die Banden, die auch ohne H_2O_2 auftraten, allerdings in abgeschwächter Intensität. Ein anderes Bild zeigte sich nach Inkubation mit Diamide (Abb. 3.4.22, Spur 5). Neben der Hauptbande um 70 kDa zeigte sich ein deutliches Signal auf der Höhe von etwa 90 kDa. Diese Bande könnte mit

SUS-Protein korrespondieren, welches ein apperentes Molekulargewicht von etwa 92 kDa pro Untereinheit besitzt. Die Reversibilität der Glutathionylierung durch BioGEE-Bindung sollte durch die Komplettierung des Inkubationsansatzes mit 5 mM DTT_{red} erreicht werden (Abb. 3.4.22, Spur 4). Die Signalstärke auf dem Film wurde nach Behandlung mit DTT_{red} wesentlich schwächer, aber das BioGEE konnte im Vergleich zur BioGEE-freien Probe nicht vollständig entfernt werden. Rekombinantes SUS-Protein zeigte in Abwesenheit von BioGEE ebenfalls kein Signal, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der verwendete Antikörper, Anti-Biotin, hochspezifisch war (Abb. 3.4.22, Spur 1).

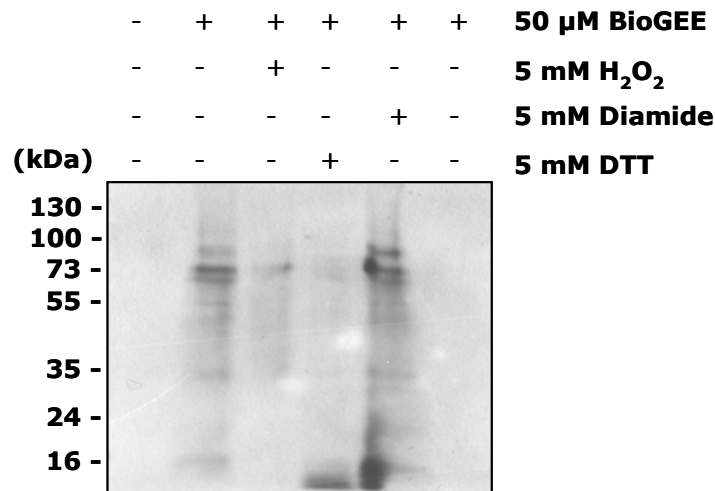


Abb. 3.4.23: Immunologischer Nachweis der Bindung von BioGEE an Proteine etiolierter Mais-Protoplasten.

Vitale Protoplasten wurden 60 min lang mit 50 µM BioGEE inkubiert, anschließend für 10 min mit und ohne 5 mM H₂O₂, 5 mM DTT_{red} oder 5 mM Diamide behandelt. Nach Ernte der Protoplasten durch Zentrifugation und Lysis der Membranen (vgl. 2.17), wurden die löslichen Proteine einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis von gebundenem BioGEE erfolgte mittels des monoklonalen Anti-Biotin-Antikörper-Peroxidase-Konjugates (1:10.000) und Entwicklung über ECL.

Spuren 1-5: Protoplasten. Spur 6: Rekombinantes SuS-Protein. Pro Spur wurde das Gesamt-Protein von 1x 10⁵ Protoplasten oder 7 µg rekombinantes Protein eingesetzt.

Der Nachweis zur Expression von SUS-Protein in Protoplasten erfolgte immunologisch. Aliquote Anteile der behandelten und unbehandelten Proteinproben wurden mit dem Anti-SuSy-Antikörper analysiert. Der Immunblot Abb. 3.4.23 zeigte, dass trotz Inkubation mit H₂O₂, Diamide und DTT in allen Proben SUS-Protein in Volllänge sowie Abbauprodukte vorhanden waren.

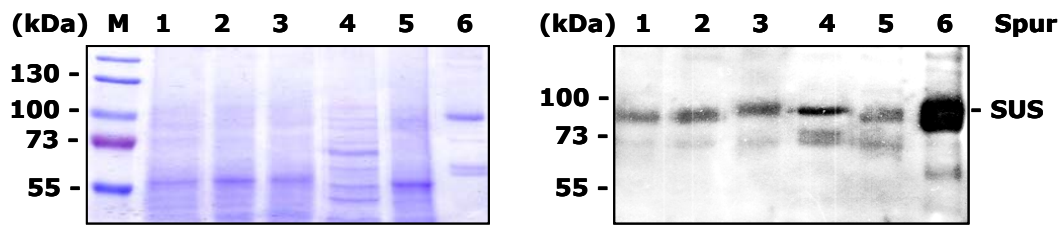


Abb. 3.4.24: Immunologischer Nachweis von SUS-Protein in etiolierten Protoplasten.

Primärantikörper: Anti-SuSy, sekundärer Antikörper Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat. Die Entwicklung erfolgte durch ECL. Belegung der Spuren erfolgte Analog zu Abb. 3.4.22.

3.4.7.2 Glutathionylierung von rekombinantem SUS-Protein durch BioGEE

Um zu überprüfen, ob das in den Protoplasten glutathionylierte Protein mit einer Molekularen Masse von etwa 90 kDa die Saccharose-Synthase darstellen könnte (vgl. 3.4.7.1), wurde die Bindung von BioGEE an dem rekombinanten SUS1-Isoform (SuSy-wt) aus *Z. mays* untersucht. Dazu wurde gereinigtes und entsalztes SuSy-wt-Protein an Affinitätsäulen gekoppelt und mit Diamide, β -ME oder ohne Zusätze im Puffer inkubiert. Zum Entfernen der Substanzen wurden die Säulen mit LEW-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des oxidierten, reduzierten oder unbehandelten Enzyms mit und ohne BioGEE. Durch erneute Waschschriffe wurde ungebundenes BioGEE entfernt, SuSy-wt von den Säulen eluiert und die Eluate immunologisch sowie mittels SDS-PAGE analysiert (2.17). Zusätzlich wurde in den Eluat-Fractionen die katalytische Aktivität bestimmt.

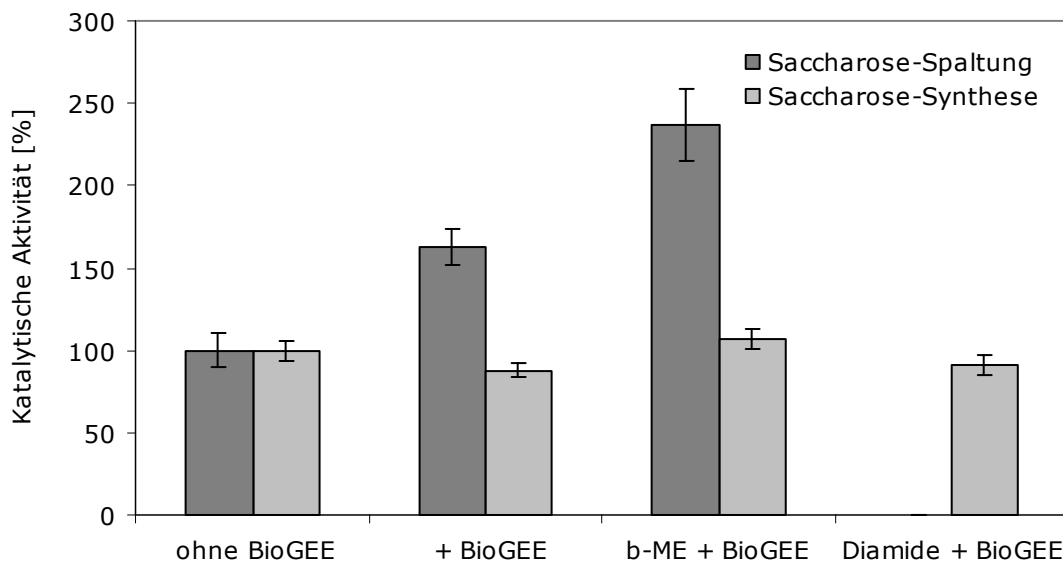


Abb. 3.4.25: Vergleich der Enzymaktivitäten von BioGEE-behandelter und unbehandelten SUS-Proben. Je 1 μ g SuSy-wt wurde direkt nach der Affinitätschromatographie, die in An- und Abwesenheit von BioGEE sowie mit und ohne β -ME oder Diamide durchgeführt wurde, zur Bestimmung der katalytischen Aktivität eingesetzt. Die ermittelten Aktivitäten für die Synthese und Spaltung von Saccharose sind relative Angaben. Die Aktivität von SuSy-wt ohne Inkubation mit BioGEE (Kategorie 1) wurde als 100% angenommen.

Die Ermittlung der Saccharose-Spaltungsaktivitäten zeigte wie erwartet eine hohe Aktivität für SuSy-wt in Anwesenheit von β -ME (Abb. 3.4.24, Kategorie 3) und einen Aktivitätsverlust durch Inkubation mit Diamide (Abb. 3.4.24, Kategorie 4). Allein die Inkubation von SuSy-wt

mit BioGEE resultierte in einer um etwa 60% gesteigerten Aktivität (Abb. 3.4.24, Kategorie 2). Die Aktivitäten der reversiblen Reaktion unterscheiden sich hingegen kaum. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.4.24, Kategorie 1) lagen die Werte der Synthesereaktion in Gegenwart von BioGEE mit und ohne β -ME oder Diamide zwischen 88% und 107%. Durch diese Messungen wurden die Ergebnisse zur Redox-Modifikation (vgl. 3.4.1 und 3.4.2) untermauert.

Die Immunologische Analyse der Proben (Abb. 3.4.25) mit dem Anti-Biotin-Antikörper (*links*) erbrachte deutliche Signale. In allen Proben, die mit BioGEE behandelt wurden, wurde eine Doppelbande mit einer Größe von etwa 20 kDa detektiert. Des Weiteren wurde in der BioGEE-Probe, die ohne weitere Zusätze inkubiert wurde und in der BioGEE-Probe mit zusätzlicher Diamide-Behandlung ein starkes Signal mit Polypeptiden im Bereich von etwa 60 kDa erhalten, die in der durch β -ME reduzierten Probe nicht detektierbar war. Die BioGEE-Diamide-Probe (Spur 3) zeigte noch eine weitere Bande, die auf eine hochmolekulare Aggregation von Polypeptiden hinweist. Schwache Signale, die mit dem Volllängen SuSy-wt-Protein korrespondierten, konnten nur in der BioGEE-Probe und BioGEE- β -ME-Probe, nicht aber in der BioGEE-Diamide-Probe detektiert werden. Der Immunblot mit dem Anti-SuS-ct-Antikörper (Abb. 3.4.25, *rechts*) detektierte, in der BioGEE-Diamide-Probe kein Volllängen SUS-Protein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BioGEE *in vitro* zwar an SUS-Protein binden kann, aber die Präferenz eher auf proteolytisch abgebauten Fragmenten als auf dem Volllängen Protein liegt.

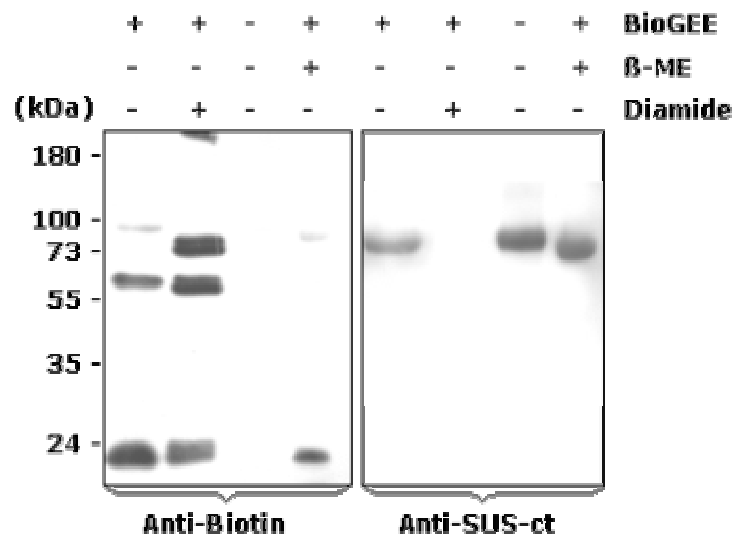


Abb. 3.4.26: Immunologische Analyse BioGEE-behandelter und unbehandelter SuSy-wt-Proben.

Je 10 μ g SuSy-wt wurde direkt nach der Affinitätschromatographie, die in An- und Abwesenheit von BioGEE sowie mit und ohne β -ME oder Diamide durchgeführt wurde (vgl. Abb. 3.4.24), in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit den Antikörpern Anti-Biotin (*links*) und Anti-SuS-ct (*rechts*) immundekoriert. Die Verdünnung der Antikörper war jeweils 1:10.000. Die Entwicklung erfolgte über ECL.

3.5 Das Hefe-2-Hybrid-System

Das Hefe-2-Hybrid-System ist ein genetischer Assay zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* (FIELDS und SONG, 1989; CHIEN et al., 1991; GUARANTE, 1993). Die Expression der Proteine im Hefesystem bietet den Vorteil, dass posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen, der Proteine stattfinden können. Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems lassen sich nicht nur bekannte Protein-Protein-Interaktionen charakterisieren, sein Potential beruht vielmehr darauf, dass auch cDNA-Banken nach unbekanntem Proteinen oder Proteindomänen, die mit dem Köderprotein interagieren, durchmustert werden können. Der Vorteil des Systems gegenüber biochemischen Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen besteht in der Empfindlichkeit der Methode und der sofortigen Verfügbarkeit der cDNA-Sequenz des interagierenden Proteins.

Das Hefe-2-Hybrid-System basiert auf der modularen Struktur des Gal4-Transkriptionsfaktors aus Hefe, der aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (AD) zusammengesetzt ist (KEEGAN et al., 1986). Hierbei bindet die DNA-Bindungsdomäne an eine „Upstream“-Aktivatorsequenz der DNA, während die Transaktivierungsdomäne die Transkription der Zielgene Gal1 und Gal10 aktiviert. Beide Domänen allein sind transkriptionell inaktiv, jedoch reicht die nichtkovalente Bindung der beiden isolierten Domänen aus, einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor zu rekonstituieren (vgl. 2.6). Eine Beschränkung des 2-Hybrid-Systems bei der Suche nach unbekanntem Interaktionspartnern ist allgemein durch die notwendige Translokation der Hybridproteine in den Zellkern gegeben. Proteine mit Transmembrandomänen sind somit von einer Bindungsanalyse im 2-Hybrid-System ausgeschlossen.

3.5.1 Durchmusterung der cDNA-Bank

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems neue proteinogene Interaktionspartner der Saccharose-Synthasen aus *Zea mays* gefunden werden. Darüber hinaus sollte dieser Ansatz einen *in vivo*-Beweis für die Bindung von Saccharose-Synthase an Elemente des pflanzlichen Cytoskeletts liefern. Die Durchmusterung einer cDNA-Bank aus *Z. mays* wurde insgesamt mit fünf Köder- bzw. *Bait*-Proteinen in Fusion mit der DNA-bindenden Domäne (DBD) des GAL4-Proteins durchgeführt (Abb. 3.5.1). Die codierenden Sequenzen der drei SUS-Isoformen (SUS1, GI:1351136; SH1, GI:135060; SuS3, GI:22121989), der SNF1-Proteinkinase (SnRK1, GI:45378905) sowie von Aktin (ACT1, GI:113220) wurden durch RT-PCR amplifiziert, in den *Bait*-Vektor pGBKT7 kloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Die konstitutive Expression der *Bait*-Konstrukte im Hefestamm Y187 wurde immunologisch nachgewiesen. Die Proteinsynthese der Fusionsproteine erfolgte im Cytosol an freien Ribosomen. Aufgrund des internen Kernlokalisierungssignals (NLS) der Gal4-DBD des Transkriptionsfaktors wurden die Fusionsproteine nach der Translation in den Kern der Hefezelle dirigiert.

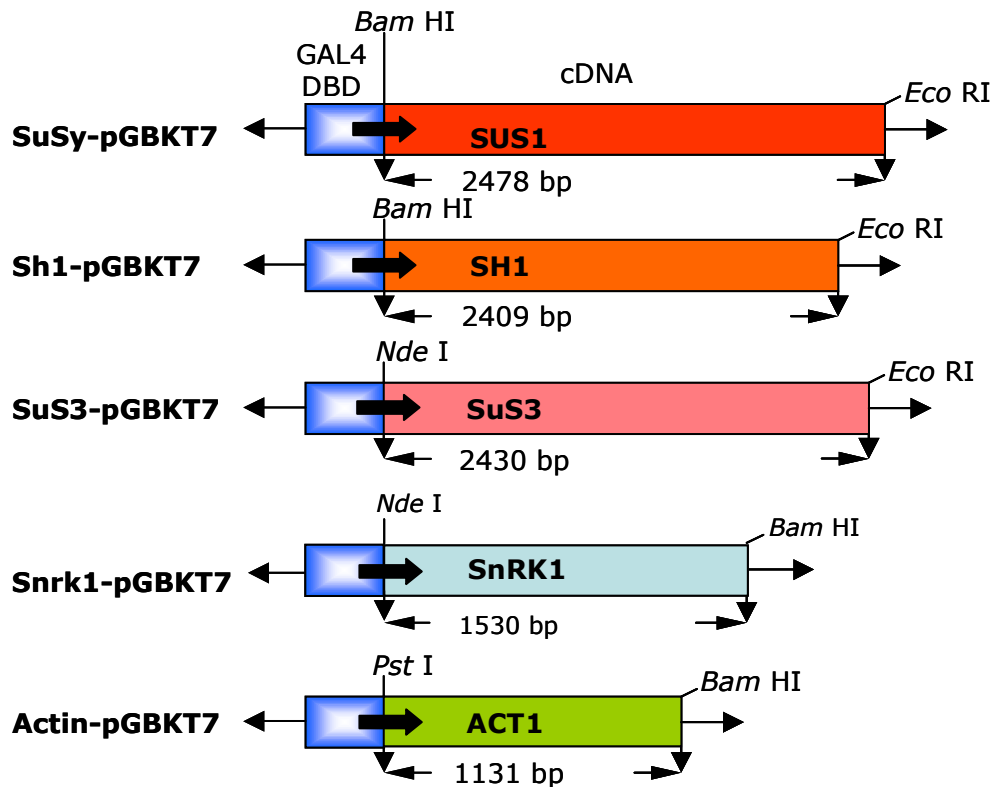


Abb. 3.5.1.: *Bait*-Konstrukte für die Durchmusterung einer cDNA-Bank aus anaerob kultiviertem Maisgewebe.

Für das Hefe-2-Hybrid-Screening wurden das jeweilige *Bait*-Konstrukt und die Gesamtheit der *Prey*-Plasmide (AD-Plasmide) einer Mais-cDNA-Bibliothek in Hefestämme unterschiedlicher Paarungs- oder *Mating*-Typen (Mat a und Mat α) transformiert (vgl. 2.4.2). Nach Selektion positiver Klone entsprechend ihrer Trp- oder Leu-Auxotrophie und Durchführung der Kontrollen zur Toxizität- sowie Autoaktivierbarkeit der Fusionsproteinkonstrukte (2.6.2) wurden die Kolonien der divergenten Hefewirtsstämmen AH109 und Y187 durch *Mating* verpaart (Abb. 3.5.2).

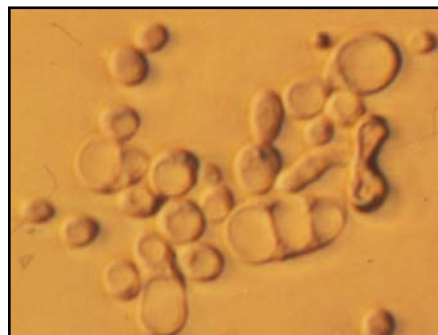


Abb. 3.5.2: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Paarungskultur von *S. cerevisiae*.

Während des Verschmelzungsansatzes von Y187[SuSy-pGBKT7]-Zellen mit AH109[cDNA-Bank]-Zellen waren kugelige haploide Hefezellen, dreilappige diploide Hefozygoten und Zellen im Teilungsstadium sichtbar.

Diploide Hefezellen, die *Prey*- und *Bait*-Plasmide trugen, wurden auf Leucin/Tryptophan-defizienten Agarplatten selektioniert. Positive Protein-Protein-Interaktionen, infolge von

konstitutiver Expression der beiden auf den Plasmiden codierten Fusionsproteine und Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors, wurden durch Wachstum auf vierfach selektivem Medium (SD/QDO) sowie deutliche α -Galaktosidaseaktivität detektiert (2.6.6). Je nach Blaufärbung wurde die α -Galaktosidaseaktivität und damit die Interaktion als schwach, mittel und stark klassifiziert. Nach Segregation von multiplen Plasmiden und negativer Selektion der *Bait*-Plasmide (DBD-Plasmide), wurden die *Prey*-Plasmid (AD-Plasmide) isoliert und durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm XL1 Blue transformiert (2.4.1.2). Durch Restriktionsspaltung der isolierten AD-Plasmide und PCR-Amplifikation der cDNA-Fragmente konnten elektrophoretisch variierende Fragmentmuster detektiert und unabhängige Klone identifiziert werden. Zur weiteren Charakterisierung der cDNA-Sequenzen wurden die AD-Plasmide sequenziert und die erhaltenen cDNA-Sequenzen mit Hilfe der NCBI BLASTN- und BLASTX-Programme auf Homologien zu bekannten cDNA-Sequenzen aus Datenbanken verglichen (ALTSCHUL et al., 1990). Nach Festlegung des durch die Gal4-BD vorgegebenen Leserahmens wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit dem NCBI BLASTP-Programm mit bekannten Proteinen verglichen. Da bis zum heutigen Tag das Mais-Genom nicht vollständig entschlüsselt ist, wurden durch das Analysieren der AD-Plasmide (pGAD-cDNA-Plasmide) wiederholt Sequenzen erhalten, die auf Nukleotid- und Aminosäureebene keinerlei Homologie zu bereits bekannten Sequenzen der Datenbanken aufwiesen. Einige der bislang unbekanntes cDNA-Sequenzen wurden bei GenBank in die Datenbank eingetragen. Die Liste der insgesamt 30 GenBank-Einträge befindet sich im Anhang.

3.5.2 Transkriptionale Aktivität und Toxizität

Eine Autoaktivierung der Reportergene wurde für keines der *Bait*-Konstrukte detektiert. Darüber hinaus zeigte nur das *Bait*-Konstrukt Sh1-pGBKT7 eine leicht toxische Wirkung auf die Hefewirtsstämme. Um die erforderliche Optische Dichte (OD_{600}) von 0,8 zu erreichen, benötigten die mit Sh1-pGBKT7 transformierten Zellen etwa 24 h, während z.B. die mit SuSy-pGBKT7 transformierten Zellen schon nach weniger als 16 h eine OD_{600} von 1,0 erzielten.

Für die fünf durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Analysen zur Durchmusterung einer cDNA-Bank wurden jeweils $2,2 \times 10^7$ Hefe-Transformanden eingesetzt. Der Titer, der von Anke Scholz (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellten Mais-cDNA-Bibliothek wurde zuerst mit 2×10^5 Kolonien/ml bestimmt. Durch Amplifikation wurde ein Titer von $2,2 \times 10^7$ Kolonien/ml erreicht. Von den pro *Screen* $2,2 \times 10^7$ untersuchten Transformanden waren je nach *Bait*-Konstrukt 58 bis 337 Kolonien auf vierfach-selektivem Medium und 18 bis 106 Kolonien im α -Galaktosidase-Test (2.6.6) positiv (Tab. 3.17). Die *Mating*- bzw. Paarungseffizienzen lagen mit Werten zwischen 16,8% und 62,3% deutlich über dem Minimalwert von 2% für ein erfolgreiches *Screening*.

Tabelle. 3.17: Eckdaten der Hefe-2-Hybrid-Analysen.

Bait-Konstrukt	Mating-Effizienz Diploide [%]	Anzahl lebensfähiger Kolonien auf SD/-QDO	Anzahl Kolonien mit starker α-Galaktosidase-Aktivität
SuSy-pGBKT7	55,8	132	30
Sh1-pGBKT7	16,8	58	19
SuS3-pGBKT7	29,9	337	54
Actin-pGBKT7	62,3	164	106
Snrk1-pGBKT7	22,7	80	53

3.5.3 Die Saccharose-Synthase als *Bait*-Protein

Die Durchmusterung der *Zea mays* cDNA-Bank wurde zunächst mit den zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannten Isoformen SUS1 (SuSy) und SH1 (Shrunken1) als *Bait*-Proteine parallel durchgeführt, um isoformspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren. Im Vergleich zeigten Hefezellen, die mit dem SuSy-*Bait*-Plasmid transformiert wurden, ein deutlich schnelleres Wachstum, als Zellen, die das Shrunken1-*Bait*-Plasmid trugen. Vermutlich steht das schlechte Wachstum in direktem Zusammenhang mit der vergleichsweise geringen *Mating*-Effizienz und der geringen Anzahl putativ positiver 2-Hybrid-Interaktionen (Tab. 3.17). Während mit dem SuSy-*Bait* 30 positive Klone identifiziert werden konnten, lag die Anzahl für das SH1-*Bait* lediglich bei 19 positiven Klonen.

Da bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob *in vivo* die Quartärstruktur der Saccharose-Synthase aus Homo- oder Heterotetrameren gebildet wird, wurde davon ausgegangen, dass bei Verwendung von SH1- oder SuSy-*Bait*-Protein überwiegend SuSy- und/oder SH1-*Prey*-Proteine als proteinogene Bindepartner identifiziert würden. Entgegen dieser Annahme wurde weder beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem SuSy-*Bait* noch mit dem SH1-*Bait* ein SH1- oder SuSy-*Prey*-Plasmid identifiziert. Statt dessen konnten durch beide Isoformen mehrfach Klone mit cDNA-Längen von 2,9-3,2 kb identifiziert werden, die nach Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleich auf den vollständigen offenen Leserahmen einer weiteren Isoform der Saccharose-Synthase hindeuteten. Nach der Klonierung und heterologen Expression der vermeintlichen codierenden Sequenz wurde Saccharose-Synthase-Aktivität gezeigt (vgl. 3.2.1). Die vollständige Sequenzinformation (2837 bp, 809 aa) der dritten Saccharose Synthase-Isoform (SuS3), einschließlich des 5'- und 3'-untranslatierten Bereichs, wurde bei GenBank eingetragen.

3.5.3.1 SH1-spezifische Interaktionspartner

Die Sequenzierung weiterer Interaktionspartner für das SH1-*Bait*-Protein identifizierte neben cDNA-Sequenzen, die für ribosomale Proteine codieren und damit als falsch Positive einzustufen sind, zwei Sequenzen, die als physiologisch sinnvoll erscheinen (Tab. 3.18). Die

Klone SH1-35 und SH1-37 trugen ein cDNA-Insert, welches nach Primärsequenzanalyse starke Homologien zu einer regulatorischen Untereinheit des 26S Proteasomes aus Reis aufwies. Des Weiteren wurde für die cDNA des Klons SH1-48 eine Sequenzhomologie auf Aminosäureebene von 63% zu Myosin XI detektiert. Die vollständige Liste aller 19 sequenzierten AD-Plasmide des SH1-Screens, die zu 10 verschiedenen cDNA-Sequenzen korrespondieren, sind in Tab. 3.18 aufgeführt. Sämtliche Klone enthielten in ihren cDNA-Sequenzen einen 3'-untranslatierten Bereich einschließlich Polyadenylierungssignal. Einige Klone waren am N-Terminus verkürzt, so dass das Start-Methionin oder sogar ganze Proteindomänen fehlten. Die relativ große Anzahl N-terminal verkürzter c-DNA-Sequenzen der cDNA-Bank ist auf die Generierung der cDNA-Bank mit Oligo-dT-Primern zurückzuführen.

Tabelle 3.18: Primär-Sequenzanalyse der positiven SH1-Interaktionspartner.

Vollständige Liste der cDNA-Sequenzen, die beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem *Bait*-Konstrukt Sh1-pGBKT7 positive Interaktionen zeigten. Angegeben sind die zu den AD-Plasmiden korrespondierenden Accession-Nr. auf Proteinebene, der Prozentwert für die Identität auf Aminosäureebene, der korrespondierende Aminosäurebereich sowie die nach Restriktionsspaltung ermittelte *Insert*-Größe. Sequenzen, die in die Datenbank GenBank eingetragen wurden, sind fett gedruckt.

AD-Plasmid	AC-Nummer (Protein)	Identität/Homologie	[%]	Korrespondierende AS	Insert-Größe [kb]
SH1-1	AAM89473	Sucrose synthase 3 (SuS3) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-Q809	3,2
SH1-48	AAD34597	Myosin XI [<i>Z. mays</i>]	63	S124-L601	2,0
SH1-35 SH1-37	AAS21759	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT3 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-K348	1,5 1,5
SH1-3	AAT00629	Putative inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase [<i>Z. mays</i>]	100	M1-P325	1,5
Sh1-31	BAD27896	Putative phosphoribosylanthranilate isomerase 1 (PAI1) [<i>O. sativa</i>]	81	M1-Q278	1,5
Sh1-51	AF466202	Putative pol protein gene [<i>Z. mays</i>]	95		0,8
SH1-5a SH1-11 SH1-19 SH1-20 SH1-27	AAW34261	Expressed protein DANA2 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-I223	1,5 1,5 1,5 1,5 1,5
SH1-8 SH1-30	AY754699	60S ribosomal protein L31 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-D124	1,3 1,3
SH1-9 SH1-18 SH1-28 SH1-44	AY758353	Putative ribosomal protein S10p/S20e [<i>Z. mays</i>]	100	M1-V126	1,3 1,0 1,5 1,3
SH1-10	AY106361	PCO118979 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]	97		1,0

3.5.3.2 SuSy-spezifische Interaktionspartner

Durch das Screening mit dem SuSy-Bait wurden 30 positive Klone, die 15 verschiedene cDNA-Sequenzen aufwiesen, identifiziert (Tab. 3.19). Es wurden neun identische Klone mit zwei verschiedenen cDNA-Längen gefunden, die alle für die SuS3-Isoform codierten. Die variierende cDNA-Länge von 2,9 kb oder 3,2 kb beziehen sich auf unterschiedlich lange 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche. Drei weitere Klone mit unterschiedlicher *Insert*-Länge (SuSy-18a; 1,1 kb, SuSy-44; 1,6 kb und SuSy-73; 1,7 kb) zeigten auf Nukleotid- und Aminosäureebene hohe Homologien zu konservierten Bereichen von Serin/Threonin-Proteinkinasen. Während SuSy-18a eine 73%ige Identität zu einer putativen Serin/Threonin-Proteinkinase aus Reis zeigte, waren die translatierten cDNA-Sequenzen der Klone SuSy-44 und SuSy-73 zu etwa 89% identisch zu der C-terminalen Domäne einer SNF1-Kinase aus Roggen. Die Kinasen untereinander waren nur zu 45% identisch. Eine weitere positive Interaktion wurde mit den Klonen SuSy-10a und SuSy-39a detektiert, die die codierende Sequenz einer putativen cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx) enthielten. Die codierende DNA-Sequenz der cGPx aus *Z. mays* umfasste knapp 500 bp. Die unterschiedlichen *Insert*-Größen der AD-Plasmide SuSy-10a und SuSy-39a zeigten, dass die beiden Sequenzen unabhängig voneinander zu einer positiven Interaktion führten. Der Klon SuSy-10a (1,7 kb) hatte gegenüber SuSy-39a (1,2 kb) eine wesentlich längere N-terminale Sequenzerweiterung, die allerdings keine weitere codierende Sequenz beinhaltete. Weiterer Interaktionspartner des SuSy-Baits mit Beteiligung an Detoxifizierungsreaktionen war eine C-terminale Domäne der Glutathion S-Transferase IV (SuSy-66a).

Ver mehrt wurden positive Klone identifiziert, deren cDNA-Sequenzen für Proteine der 26S-Proteasom-vermittelten Proteindegradation codierten. Diese Interaktionen wurden nicht als „falsch-positiv“ bewertet, weil ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und dem Abbau des SUS-Proteins durch das 26S-Proteasom bereits gezeigt worden war (HARDIN et al., 2003). Die identischen Klone SuSy-58 und SuSy-59b codierten für das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2, der Klon SuSy-79 für ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym und SuSy-113 für die regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms, eine ATPase. Neben den codierenden Bereichen enthielten alle vier Klone N- und C-terminale Sequenzerweiterungen. Die bislang unbekannt Sequenzen wurden in die Datenbank eingetragen. Die Interaktion des SuSy-Baits mit einer UDP-Glucose-Protein Transglucosylase (UGPT), die durch Sequenzierung des AD-Plasmides SuSy-98 identifiziert wurde, könnte im Zusammenhang mit einem *Metabolit-Channeling* sinnvoll sein.

Eine aus *in vitro*-Untersuchungen bekannte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem SuSy-Bait und Aktin konnte durch das cDNA-Screening nicht verifiziert werden. Statt dessen wurde eine positive Interaktion mit der Cytoskelettkomponente Tubulin durch Sequenzierung des AD-Plasmids SuSy-63 identifiziert. Das 2 kb-*Insert* aus SuSy-63 ist auf Aminosäureebene allerdings nur zu 63% identisch zu α 1-Tubulin. Von DAVIES et al. (2001) wurden neben Aktin und Tubulin noch zwei weitere Komponenten des pflanzlichen

Cytoskeletts identifiziert, daher ist es denkbar, dass die cDNA aus SuSy-63 für ein in Mais bislang unbekanntes Cytoskelettprotein mit Ähnlichkeit zu Tubulin codiert. Die *in vitro*-Bindung von rekombinantem SUS1-Protein (SuSy-wt) an Tubulin aus Rinderhirn wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt (vgl. 3.3.2). Bei der cDNA-Sequenz des AD-Plasmids SuSy-83, die 63% Identität zu einem Aktin-Depolymerisierungs-Faktor (ADF), aber keine signifikante Sequenzhomologie zu anderen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Datenbank zeigte, könnte es sich ebenfalls um ein unbekanntes Aktin-bindendes Protein (ABP) handeln.

Tabelle 3.19: Primär-Sequenzanalyse der positiven SUS1-Interaktionspartner.

Vollständige Liste der cDNA-Sequenzen, die beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem *Bait*-Konstrukt SuSy-pGBKT7 positive Interaktionen zeigten. Angegeben sind die zu den AD-Plasmiden korrespondierenden Accessions-Nummern auf Proteinebene, der Prozentwert für die Identität auf Aminosäureebene, der korrespondierende Aminosäurebereich sowie die nach Restriktionsspaltung ermittelte *Insert*-Größe. Sequenzen, die in die Datenbank GenBank eingetragen wurden, sind fett gedruckt.

AD-Plasmid	AC-Nummer (Protein)	Identität/Homologie	[%]	Korrespondierende AS	Insert-Größe [kb]
SuSy-1	AAM89473	Sucrose synthase 3 (SuS3)	100	M1-Q809	3,2
SuSy-2		[<i>Z. mays</i>]			3,2
SuSy-5					2,9
SuSy-11					3,2
SuSy-45					3,2
SuSy-61a					2,9
SuSy-92					3,2
SuSy-129					3,2
SuSy-132					3,2
SuSy-18a	XP_479524	Putative Serine/threonine Kinase [<i>O. sativa</i>]	73	K283-C443	1,1
SuSy-44	AAS59400	SNF1-related protein kinase	100	S347-L509	1,6
SuSy-72		[<i>Z. mays</i>]			1,6
SuSy-10a	AAM88847	Glutathione peroxidase (cGPx)	100	M1-S116	1,7
SuSy-39a		[<i>Z. mays</i>]			1,2
SuSy-66a	AAA20585	Glutathione S-transferase IV [<i>Z. mays</i>]	98	V134-E223	1,2
SuSy-58	AY817492	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	100	M1-L505	2,5
SuSy-59b		[<i>Z. mays</i>]			
SuSy-79	AAT01621	Putative ubiquitin-activating enzyme [<i>Z. mays</i>]	100	M1-W492	2,3
SuSy-113	AAS21759	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT3 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-K348	1,5
SuSy-63	CAA33734	α 1-Tubulin [<i>Z. mays</i>]	83	M1-Y451	2,0
SuSy-83	CAA66311	Actin depolymerizing factor (ADF) [<i>Z. mays</i>]	61	M1-R139	1,5
SuSy-131	AAP33448	Cap-binding protein CBP20 [<i>O. sativa</i>]	62	G180-R243	1,6

SuSy-17b	AAT00629	Putative inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase [<i>Z. mays</i>]	100	M1-P325	1,5
SuSy-98	P80607	α -1,4-glucan-protein synthase (UDP-glucose:protein transglucosylase) [<i>Z. mays</i>]	88	M1-K364	1,7
SuSy-20b SuSy-95	AY763108	Expressed protein (DANA) [<i>Z. mays</i>]	100	Q1-S195	0,9
SuSy-27a SuSy-13	AY758353	Putative ribosomal protein S10p/S20e [<i>Z. mays</i>]	100	M1-V126	1,3 1,3
SuSy-36 SuSy-102	AY754699	60S ribosomal protein L31 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-D124	1,3 1,3

3.5.3.3 SuS3 als *Bait*-Protein

Mit der identifizierten SuS3-Isoform als *Bait*-Protein wurde eine weitere Durchmusterung der gleichen Mais-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Insgesamt wurden durch Sequenzierung von 54 positiven AD-Plasmiden 22 divergente cDNA-Sequenzen erhalten. Wie bei allen anderen durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Analysen wurden Gruppen von identischen Klonen verschiedener cDNA-Länge identifiziert, deren Plasmide mehrfach isoliert wurden (Tab. 3.20). Generell sind die Ergebnisse des SuS3-Screens mit denen des SuSy-Screens (Tab. 3.19) vergleichbar. Eine Gruppe von neun identischen Klonen verschiedener cDNA-Länge enthielten die C-terminale Domäne von SnRK1, die bereits als putativer Interaktionspartner der SUS1-Isoform identifiziert wurde. Zusätzlich wurde die C-terminale Domäne einer weiteren putativen Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase, MKIN2, gefunden. Das SuS3-*Bait*-Protein zeigte starke Interaktionen zu Klonen, die die cDNA für die SUS1-Isoform (S3-31) oder für die der Saccharose-Synthase enthielten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die cDNA-Bank die Sequenzen für alle drei Isoformen enthielt. Wider Erwarten wurde beim Screenen mit dem SuS3-*Bait* keine cDNA-Sequenz für SuS3 isoliert.

Die cytosolische Glutathion-Peroxidase, Proteine des 26S-proteasomalen Proteinabbaus sowie Enzyme mit Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsels wurden als putative Interaktionspartner identifiziert. Ein Klon mit Homologie zur Stärke-Synthase aus Weizen (S3-324) sowie zwei Klone, die für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (S3-261, S3-265) codierten wurden sequenziert. Durch die Kombination von SUS mit einer rekombinanten dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase konnte im präparativen Maßstab mit einer Fed-Batch-Synthese dTDP-6-Desoxy-4-keto- α -D-Glucose gewonnen werden (STEIN et al., 1998). Drei Klone mit divergenten cDNA-Längen codierten für den spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC 1a. Dieser Kanal ist hauptsächlich in der äußeren Membran von Mitochondrien lokalisiert, wurde aber auch mehrfach als Protein der Plasmamembran beschrieben. Eine mögliche Interaktion von Saccharose-Synthase mit VDAC 1a könnte mit der transienten Assoziation von Saccharose-Synthase an Membranen (CARLSON und CHOUREY, 1996; WINTER et al., 1997) im Zusammenhang stehen.

Tabelle 3.20: Primär-Sequenzanalyse der positiven SuS3-Interaktionspartner.

Vollständige Liste der cDNA-Sequenzen, die beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem *Bait*-Konstrukt SuS3-pGBKT7 positive Interaktionen zeigten. Angegeben sind die zu den AD-Plasmiden korrespondierenden Accessions-Nummern auf Proteinebene, der Prozentwert für die Identität auf Aminosäureebene, der korrespondierende Aminosäurebereich sowie die nach Restriktionsspaltung ermittelte *Insert*-Größe. Sequenzen, die in die Datenbank GenBank eingetragen wurden, sind fett gedruckt.

AD-Plasmid	AC-Nummer (Protein)	Identität/Homologie	[%]	Korrespondierende AS	Insert-Größe [kb]
S3-1	AAS59400	SNF1-related protein kinase (SnRK1) [<i>Z. mays</i>]	100	S347-L509	1,6
S3-13					1,6
S3-17					1,7
S3-48					1,7
S3-93					1,7
S3-157					1,8
S3-188					1,5
S3-202					1,5
S3-248					1,5
S3-162	AAT90347	Putative Serine/threonine-specific protein kinase (MKIN2) [<i>Z. mays</i>]	100	S1-L166	1,5
S3-31	P49036	Sucrose synthase 2 (SUS1) [<i>Z. mays</i>]	97	M1-K816	2,9
S3-264	P04712	Sucrose synthase 1 (Shrunken1) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-D802	3,2
S3-268					3,2
S3-269					3,2
S3-306					3,2
S3-312					3,2
S3-C	AAM88847	Glutathione peroxidase (cGPx) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-S116	1,2
S3-160					1,7
S3-193					1,2
S3-271	AAD56651	Voltage-dependent anion channel protein 1a (vdac1a) [<i>Z. mays</i>]	99	M1-P276	1,8
S3-283					0,9
S3-285					1,1
S3-261	AAS21758	dTDP-glucose 4,6-dehydratase [<i>Z. mays</i>]	100	M1-T396	2,4
S3-265					1,6
S3-336	AAT01621	Putative ubiquitin-activating enzyme [<i>Z. mays</i>]	100	M1-W492	2,3
S3-289	AAT01622	Putative RUB1 conjugating enzyme [<i>Z. mays</i>]		M1-A184	2,3
S3-318	AAS21759	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT3 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-K348	1,5
S3-324	AAD53263	Starch synthase IIA [<i>T. aestivum</i>]	40	R21-W799	2,1
S3-206	AAK84953	Putative beta-mannosidase [<i>G. hirsutum</i>]	48	S594-L786	1,6
S3-282	AAO27794	Glycosyl hydrolase [<i>G. hirsutum</i>]	42	S784-967	1,5
S3-275	AY758353	Putative ribosomal protein S10p/S20e [<i>Z. mays</i>]	100	M1-V126	1,3
S3-63					1,3
S3-315					1,3

S3-284	AY754699	60S ribosomal protein L31	100	M1-D124	1,3
S3-270		[<i>Z. mays</i>]			1,3
S3-272E					1,3
S3-B					1,3
S3-243					3,2
S3-310					1,5
S3-255	AAP92747	Ribosomal L9-like protein [<i>Z. mays</i>]	86	M1-A190	1,6
S3-62					1,5
S3-251a	AAS72350	Unknown protein [<i>O. sativa</i>]	65	K380-L506	1,7
S3-33	AY108694	PCO116965 mRNA [<i>Z. mays</i>]	97		1,4
S3-193b	AAM65730	Unknown protein [<i>A. thaliana</i>]	61	S19-E175	1,4
S3-192	AAG13073	Unknown protein [<i>A. thaliana</i>]	58	R50-K144	1,0
S3-A	AAS77783	Peptide N-glycanase [<i>Z. mays</i>]	100	K1-K83	1,7
S3-82					
S3-29	XP_470465	Expressed protein [<i>O. sativa</i>]	59	M1-I224	1,7
S3-61					1,4
S3-217					1,4
S3-304					1,7
S3-F					
S3-286	AAP33448	Cap-binding protein CBP20 [<i>O. sativa</i>]	62	G180-R243	1,6
S3-123	AAT01623	Collagen α1-like protein [<i>Z. mays</i>]	100	P1-L113	1,3

3.5.4 Die SNF1-related Proteinkinase (SnRK1) als *Bait*-Protein

Die SnRKs gehören wie die CDPKs zu den cytoplasmatischen Proteinkinasen, die als unabhängig von den Rezeptor-Kinasen anzusehen sind.

Neben der überwiegend calciumabhängigen Phosphorylierung von Saccharose-Synthasen durch die CDPKs wurde die Phosphorylierung von SUS-Protein aus Arabidopsis durch eine SNF1-related Protein-Kinase (SnRK) gezeigt (CHIKANO et al., 2001).

HARDIN et al. (2003) publizierten die Existenz einer calciumunabhängigen Phosphorylierung des paralogen Mais-Proteins. Zur Verifizierung der Interaktion zwischen der identifizierten SnRK1 und den SUS-Proteinen aus Mais, sowie zur Identifizierung weiterer proteinogener Bindepartner wurde ein cDNA-Bankenscreen mit dem *Bait*-Konstrukt Snrk1-pGBKT7 durchgeführt. Die Aktivität einer Kinase wird selbst durch einen oder mehrere allosterische Effektoren und/oder Proteinphosphorylierung reguliert, so dass mit diesem Screen Proteine identifiziert werden sollten, die die Kinase selbst regulieren.

Insgesamt wurden 27 verschiedene cDNA-Sequenzen durch die Sequenzierung von 53 AD-Plasmiden erhalten (Tab. 3.5.21). Mit einer Anzahl von 13 Klonen wurde die cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als hauptsächliches *Target*- oder *Prey*-Protein der Kinase detektiert. Sämtliche cDNA-Inserts umfassten die vollständigen cDNA-Sequenzen der Isoformen GAPC3 oder GAPC4, welche untereinander zu 86% identisch sind. Die große Zahl gleicher cDNA-Sequenzen konnte nicht auf Teilung der

Hefezellen nach der Verpaarung zurückgeführt werden, da insgesamt vier verschiedene *Insert*-Längen vorlagen. Für die cytosolische GAPDH aus tierischem Gewebe wurde eine Phosphorylierung mehrfach gezeigt und mit einer vermehrten Bindung an das Cytoskelett in Zusammenhang gebracht (TISDALE, 2002). Die Sequenzierung des AD-Plasmides SK31, welches die cDNA der SUS1-Isoform trug, bestätigte die spezifische Interaktion der SnRK1 mit der Saccharose-Synthase. Als weitere *Prey*-Proteine wurden eine bislang unbekannte Pyruvatkinase (PK), ein RuBisCO-subunit-binding-protein (β -Untereinheit), die C-terminale Domäne eines Heat-Shock-Proteins (HSP70) aus Weizen sowie ein AAA-type ATPase-family-protein aus *Arabidopsis* identifiziert. Darüberhinaus wurden 15 verschiedene Sequenzen mit hohen Homologiewerten zu Nukleotid- und Aminosäuresequenzen unbekannter Funktion gefunden.

Während die Phosphorylierung von Serinresten der Pyruvatkinasen (PK) aus Säugerzellen (LJUNGSTROM et al., 1976) und Hefen (BRAZILL et al., 1997) lange etabliert ist, wurde kürzlich erstmals die Phosphorylierung des pflanzlichen Enzyms beschrieben (TANG et al., 2003). Die Autoren fanden in den sich entwickelnden Samen der Sojabohne zwei Typen von Kinasen, die die PK an zwei divergenten Phosphorylierungsstellen modifizieren konnten. Eine Kinase zeigte CDPK-Aktivität, die andere war vermutlich eine SnRK1. SLOCOMBE et al. (2004) fanden die Assoziation der SnRK1 aus *H. vulgare* mit einem Heat-Shock-Protein und bestätigten die Phosphorylierung dieses Proteins in Abhängigkeit der SnRK1 *in vitro*.

Tabelle 3.21: Primär-Sequenzanalyse der positiven Snrk1-Interaktionspartner.

Vollständige Liste der cDNA-Sequenzen, die beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem *Bait*-Konstrukt Snrk1-pGBKT7 positive Interaktionen zeigten. Angegeben sind die zu den AD-Plasmiden korrespondierenden Accessions-Nummern auf Proteinebene, der Prozentwert für die Identität auf Aminosäureebene, der korrespondierende Aminosäurebereich sowie die nach Restriktionsspaltung ermittelte *Insert*-Größe. Sequenzen, die in die Datenbank GenBank eingetragen wurden, sind fett gedruckt.

AD-Plasmid	AC-Nummer (Protein)	Identität/Homologie	[%]	Korrespondierende AS	Insert-Größe [kb]
SK2	AAA87580	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC4) [<i>Z. mays</i>]	99	M1-N337	2,1
SK3					2,1
SK6					2,1
SK7					2,1
SK13					2,1
SK21					2,1
SK52					2,1
SK63b					1,8
SK8	Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC3) [<i>Z. mays</i>]	98	M1-K337	2,1
SK16					2,1
SK44					2,1
SK19a					2,4
SK39					1,9
SK18	AAT41588	Pyruvate kinase (PK) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-K509	2,1
SK31	P49036	Sucrose synthase 2 (SUS1) [<i>Z. mays</i>]	99	M1-K816	2,8
SK40	AAT90346	RubisCO subunit binding-protein β-subunit [<i>Z. mays</i>]	100	E1-Y409	1,8

SK10	AAF23074	Heat shock protein 70 HSP70 [<i>T. aestivum</i>]	96	R144-N376	0,8
SK27					
SK71	AY105690	PCO065072 mRNA [<i>Z. mays</i>].			
SK12	AY740527	Expressed protein [<i>Z. mays</i>]	100	M1-Y734	3,2
SK63a	AAS77873	Putative peptide N-glycanase [<i>Z. mays</i>]	100	K1-K83	1,3
SK65b					1,7
SK17	AAL25088	Tobacco mosaic virus helicase domain-binding protein [<i>N. tabacum</i>]	77	M364-N537	1,6
	NP_182074	AAA-type ATPase family protein [<i>A. thaliana</i>]	76	M314-N487	
SK78	AY746978	20S proteasome β-4 subunit [<i>Z. mays</i>]	100	M1-A210	1,0
SK14	CAA64728	Ribosomal protein L39 [<i>Z. mays</i>].	100	M1-F51	1,1
SK28					0,7
SK34					0,8
SK37					1,2
SK47					0,5
SK50b					0,8
SK51					0,8
SK53					1,1
SK74					0,8
SK23	AAK00428	Unknown protein [<i>O. sativa</i>]	57	V138-F1190	2,1
SK35	AAC08009	DnaJ-related protein ZMDJ1 [<i>Z. mays</i>]	96	M1-Q419	2,1
SK41	AAP44613	Unknown protein [<i>O. sativa</i>]	77	K59-N116	1,5
SK49b	AY525609	Unknown mRNA [<i>Z. mays</i>]	99		
SK80b					
SK42					
SK20	AY111511	CL66163_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			2,1
SK33	AY112466	CL10221_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			2,1
SK43					
SK46	AY105091	PCO138435 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			1,2
SK50a					2,1
SK48	AY110397	CL61115_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			2,1
SK55	AY110773	CL20488_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			2,1
SK57	AY108911	PCO145520 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			1,2
SK58	AK068962	cDNA clone:J013169P12 [<i>O. sativa</i>]			1,8
SK59a	AY110679	CL28493_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			2,0
SK61	AK071801	cDNA clone:J023110J22 [<i>O. sativa</i>]			1,0
SK64	AY109089	PCO082815 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			1,6
SK68	AY109611	CL37807_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			1,7
SK75	AY110960	CL19555_1 mRNA sequence [<i>Z. mays</i>]			1,8

3.5.5. Aktin als *Bait*-Protein

Die direkte Assoziation von SUS-Protein an Aktin wurde bislang durch *in vitro*-Versuche gezeigt. Für Bindestudien wurde überwiegend muskuläres Aktin aus Kaninchenmuskel verwendet. Mit kointitutiver Expression des ACT1-Proteins aus Mais in Fusion mit der DBD des GAL4-Transkriptionsfaktors wurde die cDNA-Bibliothek nach Mais-spezifischen Aktinliganden durchmustert. Die Verwendung des 2-Hybrid-Systems mit einem Aktin-*Bait* wurde als effizienter *in vivo*-Ansatz zur Identifizierung potentieller Bindeproteine oder -domänen bereits von AMBERG und BOTSTEIN (1997) beschrieben.

Von den insgesamt 164 Kolonien, die auf aminosäuredefizientem SD/QDO-Medium wuchsen, zeigten 106 dieser Kolonien eine deutliche *MEL1*-Expression. Die 70 Kolonien mit der stärksten Reportergenaktivität wurden einer Hefe-Plasmidisolierung unterzogen und in *E. coli* vermehrt. Restriktionsspaltung dieser positiven AD-Plasmide zeigte cDNA-*Inserts* mit einer Länge von 0,8-3,7 kb (Tab. 3.22). Die Sequenzierung ergab 38 verschiedene Nukleotidsequenzen, die in vielen Fällen nur einmal identifiziert wurden.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen nach konzeptioneller Translation mit Datenbank-einträgen identifizierte eine Reihe glykolytischer Enzyme. Während für glykolytische und andere Zucker-metabolisierende Enzyme in tierischen Zellen die räumliche und zeitliche Organisation als Metabolons am Cytoskelett (zur gezielten Energiebereitstellung für die Muskelkontraktion unter anaeroben Bedingungen) bereits gezeigt wurde, gibt es bislang noch relativ wenige Befunde für die Assoziation von löslichen Enzymen mit dem pflanzlichen Cytoskelett. Neben drei Isoformen der cytosolischen GAPDH (GAPC2, GAPC3 und GAPC4) wurden die zwei bekannten Isoformen der Enolase (ENO1 und ENO2) sowie die cytosolische Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (ALD) als Interaktionspartner des Aktin-*Baits* gefunden. Abbildung 3.5.3 zeigt ein exemplarisches Restriktionsmuster nach *Hind III*-Verdau der positiven AD-Plasmide. Die *Insert*-Länge der insgesamt acht GAPDH-AD-Plasmide variierte sowohl zwischen den Vollängenklonen (A17, A52, A89, A39, A92 und A97b) als auch zwischen den N-terminal verkürzten Klonen (A8 und A103). Die kürzesten GAPDH-Sequenzen, die identifiziert wurden, sind identisch zu GAPC2 (337 aa), beginnen jedoch mit dem Histidinrest an Position 181 (A8) oder an Position 198 mit einem Tryptophanrest (A103). Die Bindefähigkeit der C-terminalen Domäne steht in gutem Einklang mit Ergebnissen von LOWE et al. (2003), die demonstrierten, dass die Aktinbinderegion der menschlichen GAPDH in der C-terminalen Hälfte im Bereich der Aminosäuren 252-267 lokalisiert ist. Alle sechs AD-Plasmide mit einem Enolase-cDNA-*Insert* waren am N-Terminus unvollständig. Auch hier wurde wieder die Unabhängigkeit verschiedener *Target*-Sequenzen festgestellt. Alignments zeigten, dass den Sequenzen zwischen 70 bp (~ 23 aa) und 471 bp (157 aa) fehlten.

Als weiterer möglicher Interaktionspartner mit Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsel wurde die codierende Sequenz für den C-terminalen Bereich der Pyruvat-Decarboxylase (PDC) detektiert. Eine Interaktion mit der Saccharose-Synthase wurde nicht gefunden.

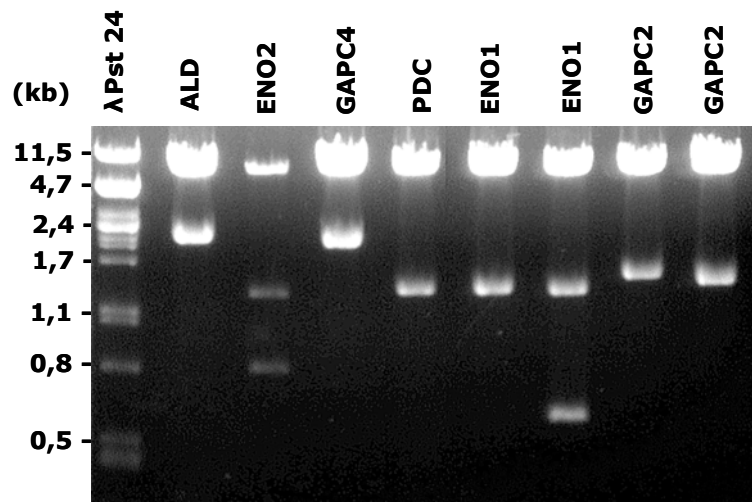


Abb. 3.5.3: Restriktionsanalyse positiver AD-Plasmide aus der cDNA-Durchmusterung mit Aktin. Agarosegelelektrophorese (1%) von *Hind III* geschnittenen AD-Plasmiden, die für glycolytische Enzyme codieren.

Von links nach rechts: **Marker** λ *Pst* 24; **ALD**: Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, (A102); **ENO2**: Enolase 2 (A4); **GAPC4**: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase cytosolische Isoform 4 (A97b); **PDC**: Pyruvat-Decarboxylase (A12); **ENO1**: Enolase 1 (A45); **ENO1**: Enolase 1 (A46); **GAPC2**: Glyceraldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase cytosolische Isoform 2 (A8); **GAPC2**: Glyceraldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase cytosolische Isoform 2 (A103).

Elf unterschiedliche AD-Plasmide trugen die vollständige codierende Sequenz (A6, A11, A25b, A37, A38, A42, A59b, A69, A82, A106), oder zumindest den größten Teil (A36), für bislang unbekannte Mais-Proteine. Die translatierten Nukleotidsequenzen erreichten Identitätswerte von 83-96% zu bekannten Proteinen anderer Organismen, besonders Reis und Weizen. Diese Sequenzinformationen wurden in die Datenbank GenBank eingetragen.

Für einige konservierte Domänen dieser Proteine oder andere Mitglieder einer Proteinfamilie ist die Cytoskelett-Assoziation bereits nachgewiesen worden. Das durch Klon A82 codierte Protein (Senescence-associated protein DH) enthielt eine Tetraspanin-Domäne. Für Tetraspanin CD82 wurde die spezifische Assoziation mit Komponenten des Cytoskeletts in T-Lymphocyten gezeigt (DELAGUILLAUMIE et al., 2002).

Immunophilin, als FKBP-Typ Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) wurde durch die Sequenzierung dreier Plasmide (A38, A43 und A55) identifiziert. Die Co-Präzipitation der PPIase-Domäne mit Tubulin und Dynein wurde in NIH 3T3-Fibroblasten beobachtet (GALIGNIANA et al., 2004). Die Assoziation einiger Kinasen und Transkriptionsfaktoren an Aktinfilamenten ist ebenfalls bekannt. Bet v I, codiert durch das Plasmid A11, gehört zur gleichen Familie wie das Allergen und G-Aktin-Bindeprotein Profilin (GROTE et al., 1993).

Die Primär-Sequenzanalyse weiterer AD-Plasmide ergab für neun Nukleotidsequenzen hohe Identitäten zu bekannten mRNA-Sequenzen aus Mais, jedoch keine signifikanten Homologien zu Sequenzen anderer Organismen.

Eine weitere Gruppe sequenzierter AD-Plasmide codierte für ribosomale Proteine, die als typische sogenannte „Falsch-Positive“ des Hefe-2-Hybrid-Systems bekannt sind. Eine

vollständige Liste aller sequenzierten AD-Plasmide mit ihren Identitäten oder Homologien bietet die Tabelle 3.22.

Tabelle 3.22: Primär-Sequenzanalyse der positiven Aktin-Interaktionspartner.

Vollständige Liste der cDNA-Sequenzen, die beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem *Bait*-Konstrukt Actin-pGBKT7 positive Interaktionen zeigten. Angegeben sind die zu den AD-Plasmiden korrespondierenden Accessions-Nummern auf Proteinebene, der Prozentwert für die Identität auf Aminosäureebene, der korrespondierende Aminosäurebereich sowie die durch Restriktionsspaltung ermittelte *Insert*-Größe. Sequenzen, die in die Datenbank GenBank eingetragen wurden, sind fett gedruckt.

AD-Plasmid	AC-Nummer (Protein)	Identität/Homologie	[%]	Korrespondierende AS	Insert-Größe [kb]
Glykolytische Enzyme					
A17	Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC3) [<i>Z. mays</i>]	98	M1-K337	2,1
A52					2,1
A89					2,4
A39	AAA87580	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC4) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-N337	2,1
A92					2,1
A97b					2,1
A8	Q09054	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC2) [<i>Z. mays</i>]	100	H181-Q337	1,6
A103				W198-Q337	1,5
A4	P42895	Enolase 2 (ENO2) [<i>Z. mays</i>]	100	V24-Y446	2,4
A29	P26301	Enolase 1 (ENO1) [<i>Z. mays</i>]	98	G36-Y446	1,3
A29a			97	G36-Y446	2,0
A46			96	A42-Y446	2,1
A47			100	A42-Y446	2,3
A45			98	Q158-Y446	1,5
A102	P08440	Fructose-bisphosphate aldolase [<i>Z. mays</i>]	100	M1-Y355	2,3
Weitere Proteine					
A12	P28516	Pyruvate decarboxylase (PDC1) [<i>Z. mays</i>]	97	I353-Q610	1,6
A6	AY649984	Thioesterase family protein [<i>Z. mays</i>]	100	M1-I169	1,7
A11	AY754698	Pathogenesis-related protein Bet v I [<i>Z. mays</i>]	100	M1-N154	0,8
A25b	AY38148	Isopentenyl-diphosphat delta isomerase 2 (IDI2) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-K368	1,2
A44					1,8
A19			100	G240-K368	1,5
A27					1,5
A51a					1,5
A72					1,5
A73					1,5
A74					1,5
A36	AAT90347	Putative Serine/threonine-specific protein kinase (MKIN2) [<i>Z. mays</i>]	100	S1-L166	1,6
A37	AY672654	Ethylene-responsive factor-like protein 1 (ERF1) [<i>Z. mays</i>]	100	M1-E229	1,7
A38	AY754697	Immunophilin [<i>Z. mays</i>]	100	M1-Q112	1,3
A43					1,9
A55					1,9

A106	AY744160	Putative 14-3-3 protein [<i>Z. mays</i>]	100	M1-257Q	1,7
A82	AY758355	Putative senescence-associated protein DH [<i>Z. mays</i>]	65	M1-A276	2,3
A42	AY746978	20S proteasome β-4 subunit [<i>Z. mays</i>]	100	M1-A210	1,0
A59b	AY754696	Brain protein 44-like [<i>Z. mays</i>]	100	M1-Q107	1,7
A18 A25a	P24067	Lumenal binding protein cBiPe2 [<i>Z. mays</i>]	98	G163-L663	1,7 1,7
A1	NP_182074	AAA-type ATPase family protein [<i>A. thaliana</i>]	55	M314-N487	0,8
A2	Q9FVI6	Homeobox protein FWA [<i>A. thaliana</i>]	30	S441-T686	1,5
A56a	AAW34261	Expressed Protein DANA2 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-I223	1,8
A30a A28a	AAM29178	Biostress-resistance-related protein [<i>T. aestivum</i>]	88	T65-S323	1,5
	AY109240	PCO097762 mRNA [<i>Z. mays</i>]	79 99	V92-S323	3,7
A15	P47917	O-Methyltransferase ZRP4 (OMT) [<i>Z. mays</i>]	66	M1-P364	2,0
A88	AAP52725	Unknown protein [<i>O. sativa</i>]	81	S59-D167	1,3
Ribosomale Proteine					
A16 A31 A61b A68 A81 A83 A84	Q41852	40S ribosomal protein S21 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-Q81	2,0 1,3 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5
A7 A29b	P51425	60S ribosomal protein L39 [<i>Z. mays</i>]	100	M1-F51	1,0 0,8
A60a	Y09636	40S ribosomal subunit protein S21	94		1,9
A69	AY758353	Putative ribosomal protein S10p/S20e [<i>Z. mays</i>]	100	M1-V126	1,5
A79	M95062	Putative ribosomal protein S22 homolog [<i>Z. mays</i>]			1,5
mRNA Sequenzen					
A30 A49 A80 A101 A105	AY106081	PCO081588 mRNA [<i>Z. mays</i>]	97		1,5 1,5 1,5 2,1 3,0
A14b	AY108452	PCO067739 mRNA [<i>Z. mays</i>]	98		1,7
A50 A100	AY105022	PCO085279 mRNA [<i>Z. mays</i>]	97		2,2 2,2
A61a	AY106539	PCO098449 mRNA [<i>Z. mays</i>]	100		1,9
A86	AY104144	PCO100898 mRNA [<i>Z. mays</i>]	100		1,8
A99	AY107550	PCO084802 mRNA [<i>Z. mays</i>]	99		1,3

A35	AY525609	Unknown mRNA, partial [<i>Z. mays</i>]	99	1,8
A32	AY112466	CL10221_1 mRNA [<i>Z. mays</i>]	100	0,8
A13	AY111734	CL44044_1 mRNA [<i>Z. mays</i>]	96	1,1

3.5.6 Verifizierung von Interaktionen mit dem Hefe-2-Hybrid-System

Nachdem mit dem 2-Hybrid-System Hinweise auf neue Interaktionspartner der Saccharose-Synthase Isoformen aus Mais erhalten wurden, sollten diese im gleichen System verifiziert werden. Zusätzlich sollten Interaktionen, die aus alternativen Bindestudien sowie aus Literaturdaten naheliegend sind, wie die Interaktion von SUS mit Aktin oder der Cellulose-Synthase, *in vivo* nachgewiesen werden. Für den Test auf positive Hefe-2-Hybrid-Interaktion wurden die Hefezellen der unterschiedlichen Paarungstypen gezielt mit jeweils nur einem *Bait*- oder *Prey*-Plasmid transformiert und auf die autokatalytische Aktivierung des *LacZ*-Reportergens getestet. Durch Verpaarung („Mating“) der Transformanden wurden diploide Hefezellen erhalten, die Wachstum auf dem entsprechenden Minimalmedium (SD/-Leu/-Trp) zeigten. Die Interaktion der Hybridproteine wurde durch Reporterogenaktivität der diploiden Zellen und Wachstum auf vierfachselektivem Medium bestätigt.

Durch diesen Ansatz konnte die direkte Interaktion der SUS1- und SuS3-Isoform der Saccharose-Synthase mit Aktin nachgewiesen werden (Abb. 3.5.4). Die beidem Durchmustern der cDNA-Bibliothek identifizierten AD-Plasmide mit den codierenden Sequenzen für SUS1 und SuS3 (vgl. Tab. 3.18 und Tab. 3.21) wurden mit dem Aktin-*Bait*-Plasmid in einem direkten Hefe-2-Hybrid-Versuch eingesetzt und zeigten bei diesem *in vivo*-Ansatz Reporterogenaktivität (Abb. 3.5.4, Felder 2 und 3). Das Hybridprotein aus cytosolischer Glutathion-Peroxidase und Aktivierungsdomäne wurde parallel als Kontrolle eingesetzt und zeigte keine Interaktion mit dem Aktin-Hybridprotein; jedoch eine Interaktion mit den SUS-Hybridproteinen wie sie im 2-Hybrid-Screen bereits identifiziert wurde (vgl. Tab. 3.19 und Tab. 3.20).

Beim Durchmustern der cDNA-Bibliothek mit den SUS-Isoformen als *Bait*-Proteine wurde in keinem Fall eine Sequenz für die identische Isoform gefunden. Im direkten Hefe-2-Hybrid-Versuch wurden Hefezellen mit *Bait*- und *Prey*-Plasmiden der SUS1-Isoform transformiert. Durch Reporterogenaktivität co-exprimierender Hefezellen konnte gezeigt werden, dass eine Homodimerisierung des Enzyms auch im Hefe-2-Hybrid-System möglich ist (Abb. 3.5.4, Feld 7).

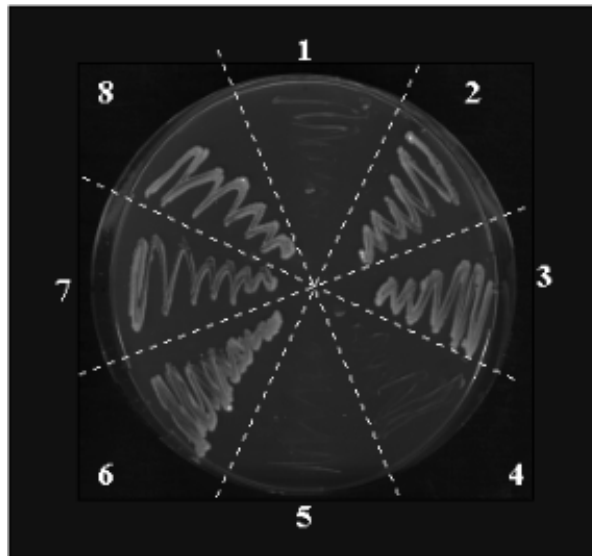


Abb. 3.5.4: Test auf positive Hefe-2-Hybrid-Interaktion zwischen SUS1 und Aktin.

Diploide Hefezellen wurden nach der Verpaarung auf SD/-Leu/-Trp-Medium selektiert und auf vierfach selektivem Medium (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp) unter Zugabe von X- α -Gal kultiviert (Felder 1-8). Hefezellen mit einer positiven Interaktion (Felder 2,3 und 6-8) wuchsen unter diesen Bedingungen und zeigten die Expression des Reportergens *MEL1* durch ein blaues Hefebild.

Feld 1: AH109[pGAD-RecT] \times Y187[pGBKT7-Lam] Negativkontrolle

Feld 2: AH109[pGAD-SUS1] \times Y187[ACT1-pGBKT7]

Feld 3: AH109[pGAD-SuS3] \times Y187[ACT1-pGBKT7]

Feld 4: AH109[pGAD-GPx] \times Y187[ACT1-pGBKT7]

Feld 5: AH109[pGAD-SUS1] \times Y187[pGBKT7]

Feld 6: AH109[pGAD-GPx] \times Y187[SUS1-pGBKT7]

Feld 7: AH109[pGAD-SUS1] \times Y187[SUS1-pGBKT7]

Feld 8: AH109[pGAD-RecT] \times Y187[pGBKT7-53] Positivkontrolle

Die Felder 1 und 8 beziehen sich auf Kontrollen, die durch das *BD Matchmaker Library Construction & Screening Kit* vorgegeben werden.

3.6 Verifizierung von Hefe-2-Hybrid-Interaktionen

An den genetischen Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Proteinen im Hefe-2-Hybrid-System schloss sich die Verifizierung einiger dieser Interaktionen auf Proteinebene an. Die biochemischen Nachweise sind notwendig, weil die Interaktionen der Fusionsproteine aufgrund missgefalteter Proteine oder unter Vermittlung eines Hefeproteins zustandekommen können (FIELDS und STERNGLANZ, 1994).

3.6.1 Bindung glykolytischer Enzyme an Aktinfilamente

Die Interaktion glykolytischer Enzyme untereinander sowie deren Assoziation an Aktinfilamente ist in muskulären und neuronalen Geweben von Säugetieren sowie in Hefen umfassend untersucht (CLARKE und MASTERS, 1975; KNULL und WALSH, 1992). Solch eine Interaktion könnte ein effizientes und reguliertes „Channeling“ von Metaboliten begünstigen (AL HABORI, 1995). Auch für Mais-Endosperm wurde ein Vorkommen von Kohlenhydrat-metabolisierenden Enzymen in der Cytoskelettfraktion beschrieben (AZAMA et al., 2003), eine direkte Bindung wurde jedoch bislang nicht dokumentiert.

3.6.1.1 Assoziation von GAPDH an Aktinfilamente

Die Assoziation cytosolischer Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.13) an Aktinfilamente wurde *in vitro* durch Co-Sedimentationsversuche bestätigt. Studien zur Bindung von rekombinanter *Arabidopsis*-GAPDH mit nativem Aktin aus Kaninchenmuskel wurde wie unter 2.10.6 beschrieben durchgeführt. SDS-PAGE-Analysen der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach Co-Polymerisation und Ultrazentrifugation zeigten ein Sättigungsverhalten der GAPDH-Aktin-Assoziation (Abb. 3.6.1).

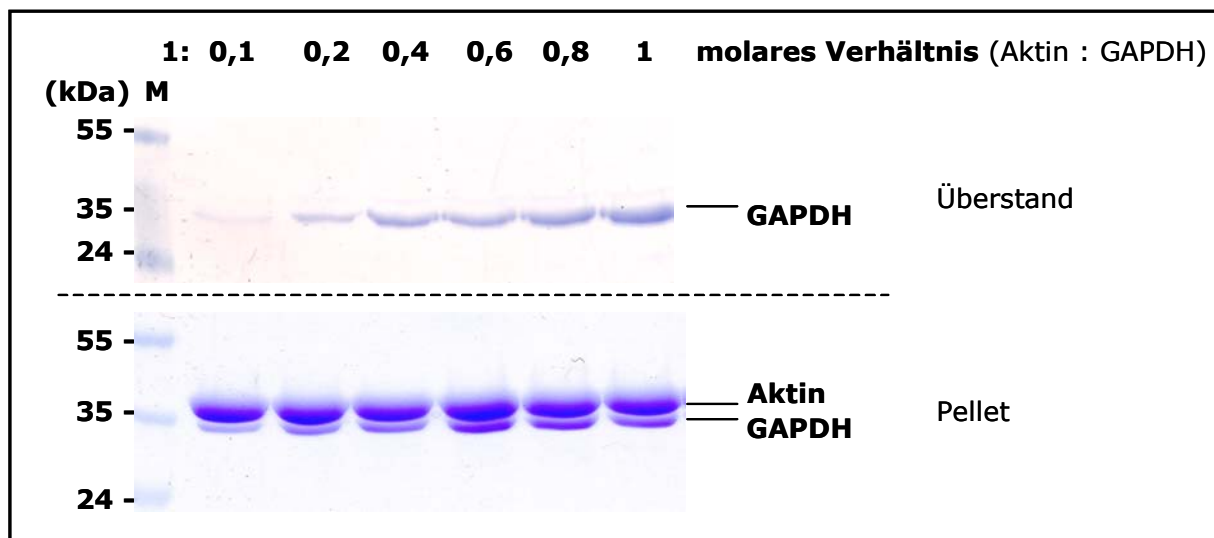


Abb 3.6.1: Lösliche und Aktin-gebundene GAPDH im Co-Sedimentationsversuch.

Zunehmende Mengen rekombinanter GAPDH (0,05-1 nmol; Monomer) wurden mit und ohne Aktin (0,5 nmol, Monomer) in einem Volumen von 200 μ l für 30 min bei 20°C co-polymerisiert. F-Aktin und gebundene GAPDH wurden durch Zentrifugation co-sedimentiert. SDS-PAGE (10%) von 25% der Überstand- und 50% der Pelletfraktionen.

Kompetitionsversuche zwischen GAPDH und Saccharose-Synthase zeigten, dass beide Enzyme gleichzeitig an Aktinfilamente binden können (Abb. 3.6.2). Die Assoziation von GAPDH an Aktin war unter Anwesenheit von rekombinantem SUS-Protein vermindert. Ebenso war die Aktin-Assoziation von SUS-Protein in Kompetitionsversuchen mit GAPDH eingeschränkt. Die beiden Enzyme konkurrierten *in vitro* um die Bindung an Aktinfilamente, die jeweilige Assoziation der Enzyme konnte jedoch nicht vollständig inhibiert werden.

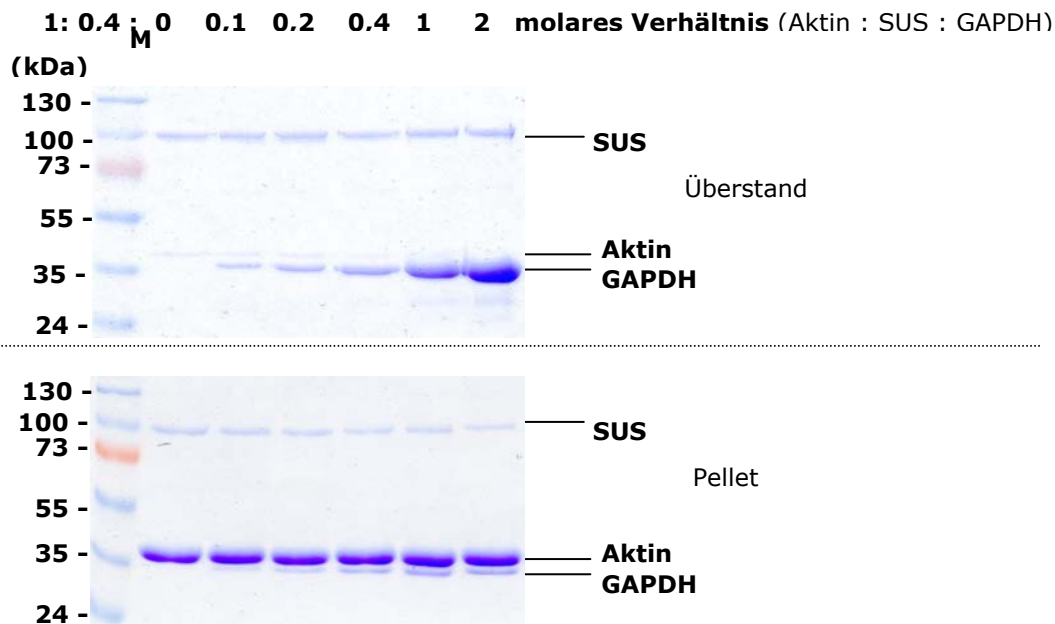


Abb. 3.6.2: Wettbewerbsversuch zur Bindung von GAPDH und SUS an Aktinfilamente.

Zunehmende Mengen rekombinanter GAPDH (0-1 nmol, Monomer) und konstante Mengen rekombinantes SUS-Protein (0,2 nmol; Monomer) wurden mit Aktin (0,5 nmol, Monomer) in einem Volumen von 200 μ l für 30 min bei 20°C co-polymerisiert. F-Aktin und gebundene GAPDH wurden durch Zentrifugation co-sedimentiert. SDS-PAGE (10%) von 25% der Überstand- und 50% der Pelletfraktionen.

Quantifizierung im ELISA mit dem Anti-GAPDH-*A.th.* Antikörper und densitometrische Auswertung der Proteinbanden ermittelten ein maximales monomeres Bindeverhältnis von etwa 0,13 mol GAPDH pro Aktin-Monomer mit einem K_D -Wert von 0,25 μ M für GAPDH. Bei Anwesenheit von SUS-Protein im Polymerisationsansatz wurde ein geringeres maximales Bindeverhältnis von etwa 0,12 mol GAPDH pro Aktin-Monomer ermittelt. Zusätzlich sank die Affinität der GAPDH zu Aktin bei Co-Inkubation mit SUS (Abb. 3.6.3).

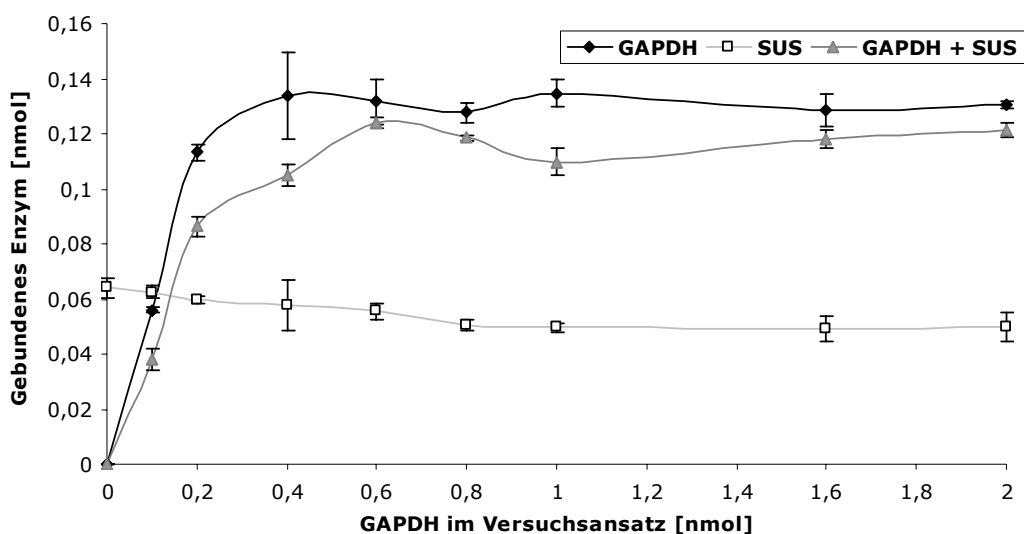


Abb. 3.6.3: ELISA-Quantifizierung Aktin-gebundener Enzyme.

Zunehmende Mengen GAPDH (0-2 nmol) wurden mit einer konstanten Menge SUS-Protein (0,2 nmol) inkubiert, bevor der Polymerisationsansatz mit Aktin (0,5 nmol) komplettiert wurde. Die Menge der assoziierten Enzyme wurde unter Verwendung der primären Antikörper Anti-GAPDH-*A.th.* und Anti-SuSy im ELISA quantifiziert.

3.6.1.2 Assoziation von Aldolase an Aktinfilamente

Die im 2-Hybrid-System identifizierte Assoziation der Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (Aldolase, ALD) mit Aktin wurde ebenfalls durch Co-Sedimentationsversuche bestätigt. Das heterolog in *E. coli* exprimierte Maisprotein bindet an Aktinfilamente. Wettbewerbsversuche zwischen SUS-Protein und Aldolase um die Bindung an Aktinfilamente zeigten ein konkurrierendes Verhalten zu Gunsten der Aldolase (Abb. 3.6.4). Wurden beide Enzyme gleichzeitig mit Aktin inkubiert, schien das Bindeverhalten der Aldolase unbeeinflusst, während die Assoziation von SUS-Protein deutlich vermindert war. Ein vergleichbares kompetitives Verhalten zwischen SUS-Protein und tierischer Aldolase ist aus der Literatur bekannt (WINTER et al., 1998).

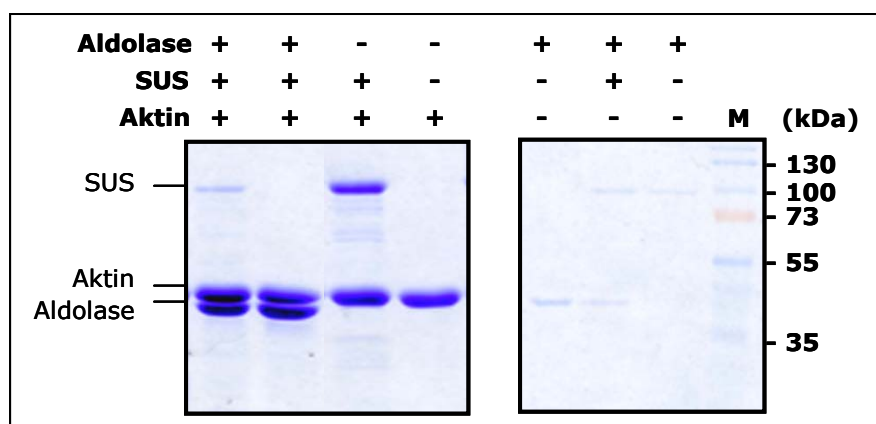


Abb. 3.6.4: Co-Sedimentation von Aldolase und SUS in An- und Abwesenheit von Aktin.

SDS-PAGE gleicher Volumina der Pelletfraktionen nach Ultrazentrifugation. Co-polymerisiert wurde rekombinante Aldolase und/oder SUS-Protein mit und ohne muskulärem Aktin aus Kaninchen.

Die Charakterisierung der Assoziation von rekombinanter Aldolase aus Mais an Aktinfilamenten wurde in der Arbeitsgruppe durchgeführt (A. SCHOLZ, Dissertation 2004).

3.6.1.3 Assoziation von Enolase an Aktinfilamente

Die im Hefe-2-Hybrid-System identifizierten Enolase-Klone waren am N-Terminus verkürzt (3.5.5). Zur Verifizierung der Interaktion von Enolase, als weiteres Enzym der Glykolyse, mit Aktin wurde zunächst die vollständige cDNA der Enolase 2 aus Mais (ENO2) mittels RT-PCR amplifiziert, subkloniert und als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-tag in *E. coli* überexprimiert. Die gereinigte, rekombinante Enolase hatte eine katalytische Aktivität von 47 U/mg. In standardisierten Co-Polymerisationsversuchen konnte keine Assoziation der Enolase mit Aktin nachgewiesen werden. Optimierung des Versuchsansatzes durch Zugabe von 25 mM MgCl₂ und 3 mM GTP (Endkonzentrationen) induzierten die Bindung von Enolase an Aktin (Abb. 3.6.6).

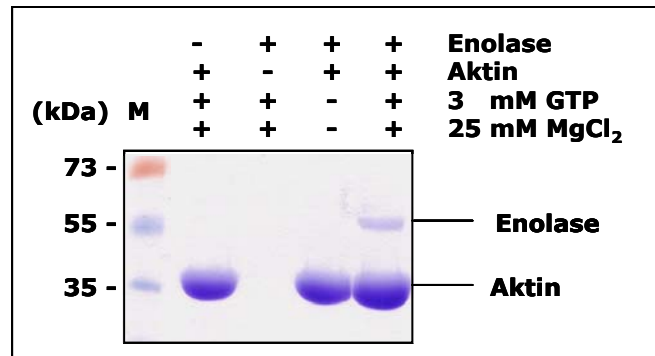


Abb. 3.6.6: Induktion der Enolase-Aktin-Bindung durch MgCl₂ und GTP.

SDS-PAGE der Pelletfraktionen eines Co-Polymerisationsversuches mit und ohne 25 mM MgCl₂ und 3 mM GTP. Die geringe Assoziation von Enolase und Aktin konnte durch die Zugabe von GTP und MgCl₂ induziert werden, während die Aktinpolymerisation unbeeinflusst blieb.

Das Polymerisationsverhalten von Aktin veränderte sich in Gegenwart von GTP und MgCl₂ nicht. Demgegenüber wurde die GAPDH-Aktinbindung in Anwesenheit von GTP und MgCl₂ weitgehend inhibiert.

3.6.2 Glutathion-Peroxidase als möglicher Bindepartner von SUS

Üblicherweise schließt sich nach der Isolierung und Klonierung der cDNA eines putativ codierten Proteins dessen biochemische Charakterisierung an. Hierzu muss zunächst rekombinantes Protein in einem pro- oder eukaryontischen Expressionssystem angereichert werden, bevor es nach Abtrennung der Fremdproteine des Systems für die eigentliche biochemische Charakterisierung herangezogen werden kann. In 2-Hybrid-Versuchen wurde mit den SUS-Isoformen SUS1 und SuS3 mehrfach die cDNA-Sequenz der putativen, cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx) aus *Z. mays* als *Prey*-Plasmid isoliert (vgl. 3.5.3). Der Vergleich der Primärsequenz mit anderen, funktionell bereits beschriebenen Proteinen zeigte einen hohen Grad an Homologie zu den Glutathionperoxidasen aus *Arabidopsis* und Kartoffel (*S. tuberosum*). Bei der Identifizierung der cGPx erlaubten Enzym-Assays die eindeutige Zuordnung von Protein und Funktion.

3.6.2.1 Klonierung und Expression der cGPx aus *Z. mays*

Die codierende Sequenz von cGPx wurde ohne Stoppcodon über *Eco31I*-Schnittstellen in den Expressionsvektor pPR-IBA1 kloniert, um ein Fusionsproteins mit C-terminalem Strep-tag zu generieren. Durch den Strep-tag wurden die Bindeversuche mit rekombinantem SUS-Protein, das einen His-tag besitzt, ermöglicht. Sequenzierungen zeigten, dass das cGPx-Gen fehlerfrei und im korrekten Leseraster in den Expressionsvektor inseriert worden war. Die heterologe Expression der Strep-tag-erweiterten cGPx erfolgte in *E. coli*-Zellen. Für das rekombinante Protein wurde ein Molekulargewicht von 18,6 kDa ohne Strep-tag berechnet. Durch Fusion mit dem Strep-tag (1,2 kDa) ergab sich ein Molekulargewicht von 19,8 kDa. Das Fusionsprotein lag in der löslichen Fraktion der Expressionskultur vor und wurde an

einer Strep-Taktin-Affinitätsmatrix säulenchromatographisch (vgl. 2.8.4.3) als etwa 20 kDa Protein angereichert (Abb. 3.6.7). Die Ausbeute an gereinigter cGPx aus 100 ml Kultur betrug ca. 2,8 mg.

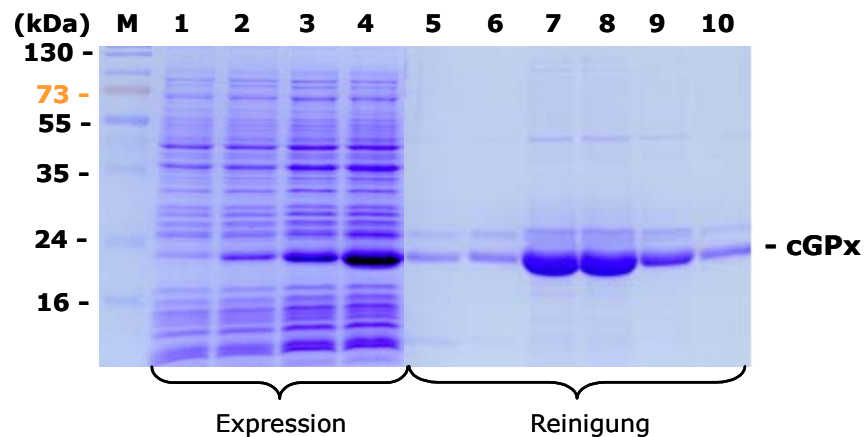


Abb. 3.6.7: Heterologe Expression und Anreicherung von cGPx.

Verschiedene Fraktionen der heterologen Expression von cGPx in *E. coli* (Spuren 1-3) und Eluatfraktionen der Säulenchromatographie (Spuren 5-10) wurden durch SDS-PAGE analysiert. M: Molekulargewichtsstandard # 671 (Fermentas).

3.6.2.2 Nachweis der cGPx-Aktivität von rekombinanter cGPx (*Z. mays*)

Eine katalytische GPx-Aktivität der putativen cGPx wurde anhand des erfolgreich rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteins in einer kontinuierlichen Aktivitätsmessung, in Anlehnung an die Methode von DROTAR et al. (1985), überprüft (vgl. 2.9.3). Als Substrat der Reaktion diente H_2O_2 , das von GPx mit GSH zu H_2O und GSSG umgesetzt wird. GSSG kann in einem gekoppelten Enzymtest unter Zugabe von NADPH mithilfe des Enzyms Glutathion-Reduktase (GR) nachgewiesen werden. Daten zur katalytischen GPx-Aktivität in Mais oder anderen pflanzlichen Organismen existieren bislang nur aus Pflanzenrohextrakten. Die katalytische Aktivität einer GPx war eindeutig für das rekombinant exprimierte Protein nachweisbar. Die Gesamtaktivität (Tab 3.22) des rekombinanten Enzyms belief sich nach Bildung der Differenz aus Kontrollen (Ansätze 1-5) und Messwerten (Ansatz 6) auf 104 pmol/(min*mg).

Tabelle 3.23: Aktivitätsmessung rekombinanter cGPx.

Aufgeführt sind Mittelwerte aus zwei Messungen mit unterschiedlichen Enzym-Chargen.

Ansatz	cGPx-Aktivität [pmol/(min*mg)]
Ansatz 1: ohne GSH	$3,6 \pm 0,2$
Ansatz 2: ohne NADPH	n.n.**
Ansatz 3: ohne GR	$3,7 \pm 0,7$
Ansatz 4: ohne H_2O_2	$13,5 \pm 1,5$
Ansatz 5: ohne cGPx	$312,2 \pm 5,4$
Ansatz 6: alle Komponenten	$416,3 \pm 7,9$

**n.n.: nicht nachweisbar

3.6.2.3 „Northern-Blot“-Analyse zur Transkription von cGPx

Zur Untersuchung der Transkription der cGPx wurde ein Northern-Blot mit Gesamt-RNA-Extrakten von verschiedenen Maisgeweben hergestellt und mit der radioaktiv-markierten cGPx-cDNA-Sonde analysiert (Abb. 3.6.8). Hybridisierungssignale der Sonde, die mit allen untersuchten Geweben detektiert wurden, deuten auf ein ubiquitäres Vorkommen des cGPx-Transkriptes hin. Ein erhöhtes Vorkommen der cGPx-mRNA in Koleoptilen-Gewebe konnte anhand des stärkeren Signals belegt werden.

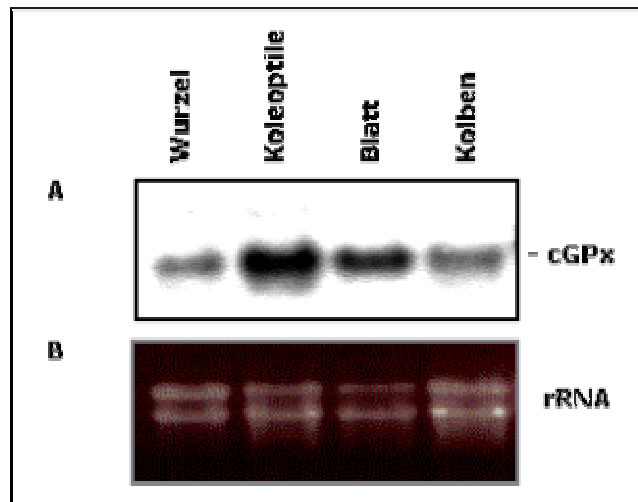


Abb. 3.6.8: „Northern-Blot“-Analyse der Transkription von cGPx in Mais-Geweben.

Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA von Wurzel-, Koleoptile-, Blatt- und Kolbengewebe aufgetragen und mit der radioaktiv-markierten cGPx cDNA-Sonde hybridisiert. **A:** Autoradiogramm des Hybridisierungssignals. **B:** Agarosegel zur Kontrolle der Beladung und Integrität der ribosomalen RNA.

3.6.2.4 Nachweis einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen SUS und cGPx

Zum Nachweis einer direkten Bindung zwischen SUS- und cGPx-Protein, die als putative Interaktionspartner in Hefe-2-Hybrid-Analysen identifiziert wurden, wurden drei unterschiedliche Affinitätschromatographien durchgeführt (vgl. 2.14). In einem ersten Versuch wurde teilgereinigte, rekombinante SuSy-wt-Proteinlösung auf eine zuvor mit cGPx beladene *Strep-Tactin*-Säulenmatrix gegeben und nach den Waschschritten gemeinsam mit cGPx co-eluiert. Das Proteinmuster der verschiedenen Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurde in SDS-Gelen aufgetrennt und analysiert (Abb. 3.6.9).

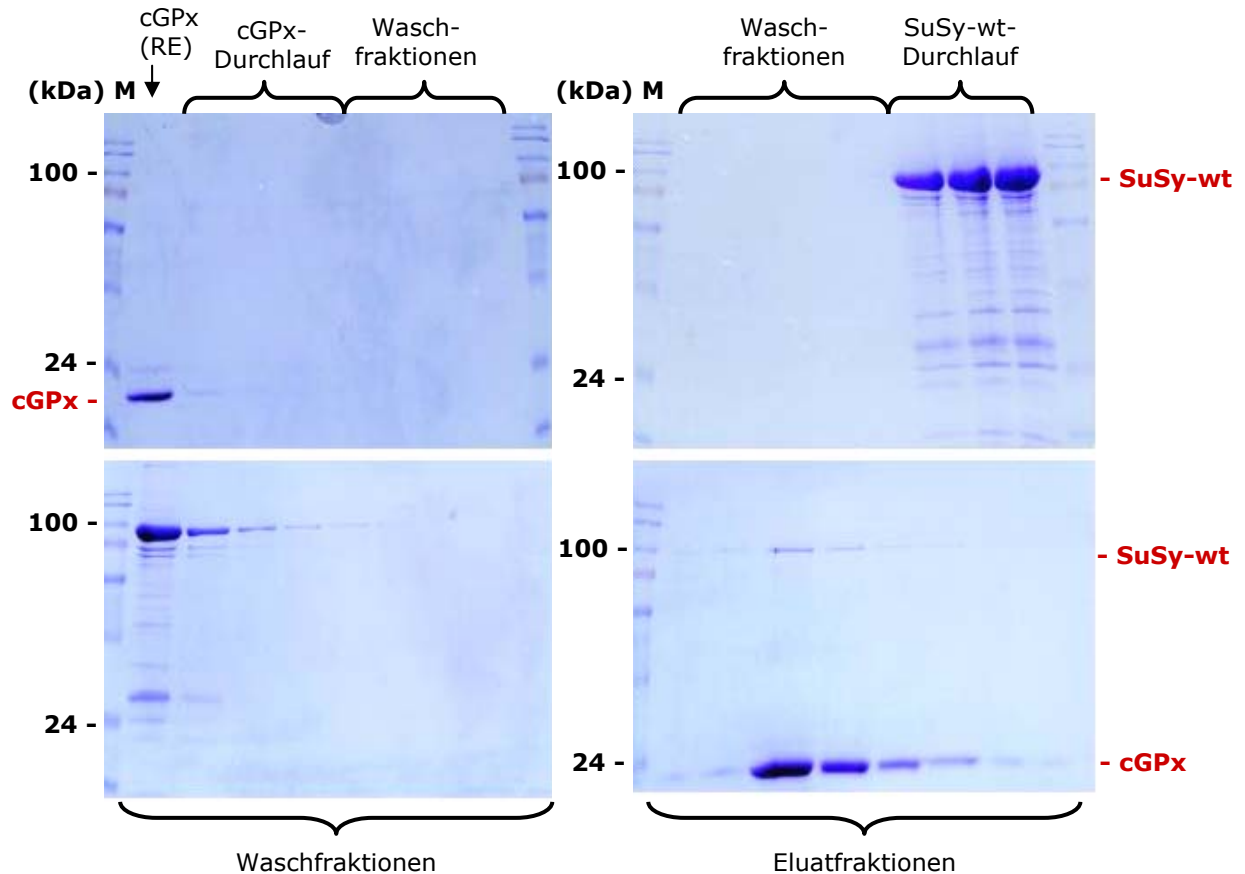


Abb. 3.6.9: Affinitätschromatographie zur Bindung von SuSy-wt an cGPx.

12%-SDS-PAGE von Fraktionen der Affinitätschromatographie von SuSy-wt und cGPx an *Strep-Tactin*-Säulenmatrix

Aus Abb. 3.6.9 wird deutlich, dass in den letzten Waschfraktionen nach dem Beladen der Affinitätssäule mit rekombinantem SUS1-Protein (SuSy-wt) keine Proteine von der Säule eluierten und somit alle unspezifischen Bindungen gelöst waren. In den Eluatfraktionen wurden durch Proteinfärbung korrespondierende Proteinbanden sowohl für cGPx (~ 19,8 kDa) als auch für SuSy-wt (~ 95 kDa) ersichtlich. Westernblot-Analysen bestätigten in sämtlichen Fraktionen die Co-Elution der beiden rekombinanten Proteine, wobei die Elution von cGPx im Vergleich zu SuSy-wt stets deutlich stärker war.

In zwei weiteren Versuchen wurden SuSy-wt und cGPx zunächst zur Initiation der Interaktion gemeinsam vorinkubiert und anschließend im *Batch*-Verfahren an eine *Strep-Tactin*-Säulenmatrix oder Nickel-NTA-Matrix gekoppelt. Die Protein-beladenen Affinitätsmatrices wurden in Säulenröhrchen überführt und durch Waschschrte von unspezifischen Bindungen befreit. Die Elution spezifischer Bindungen erfolgte entsprechend der verwendeten Matrix durch einen Imidazolgradienten oder Desthiobiotin.

Unter Verwendung beider Affinitätsmatrices wurden SuSy-wt und cGPx parallel von der Säule eluiert. Von der NTA-Matrix wurde die größte Menge cGPx bereits durch Imidazolkonzentrationen von 60 mM eluiert, während SuSy-wt hauptsächlich in Anwesenheit von 300-400 mM Imidazol eluierte. Zur einwandfreien Zuordnung der Proteinbanden auf der SDS-PAGE wurde eine Immundekoration ausgewählter Fraktionen

mit einem Anti-Strep-*tag*-Antikörper durchgeführt (Abb. 3.6.10). Die cGPx wurde einwandfrei als co-eluierendes Protein von SuSy-wt identifiziert.

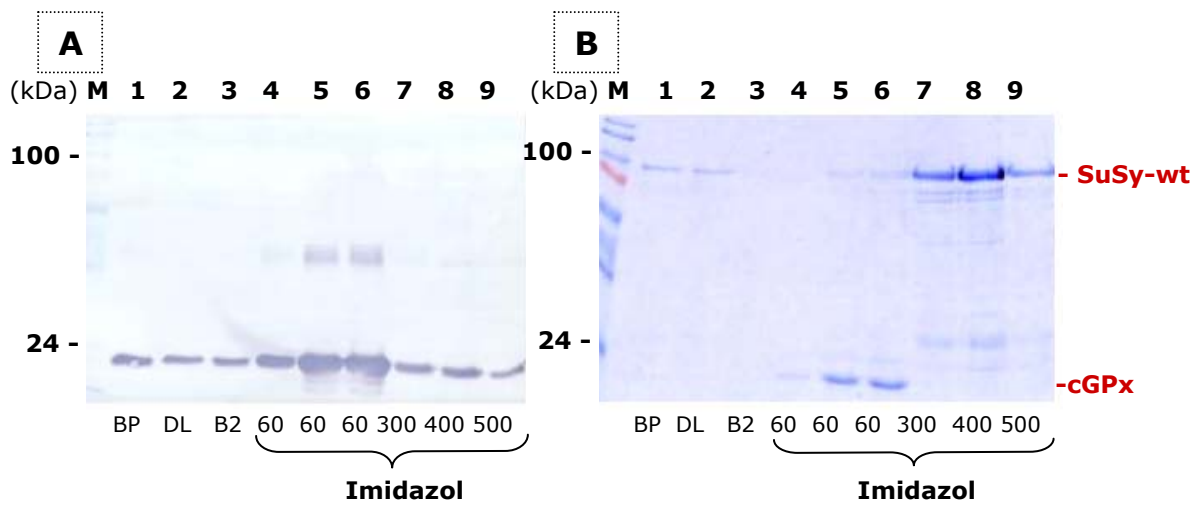


Abb. 3.6.10: Identifikation von cGPx durch Strep-*tag*-Antikörper.

Ausgewählte Fraktionen der Affinitätschromatographie von SuSy-wt und cGPx an Ni-NTA-Matrix. **A:** Immundekoration. Es wurde der primäre Antikörper Maus-Anti-Strep in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. **B:** Coomassie-Färbung. M: Molekulargewichtsstandard. BP: Bindeprobe (SuSy-wt und cGPx im *Batch*). DL: Durchlaufraktion. B2: Bindefraktion 2. 60, 60, 60, 300, 400, 500: Imidazolgradient-Fraktionen; Angabe der Imidazolkonzentration in [mM].

Die Kontrollen zur unspezifischen, alleinigen Bindung von cGPx an der Nickel-NTA-Matrix bzw. SuSy-wt an der *Strep-Tactin*-Matrix wurden durch Affinitätschromatographien mit jeweils nur einem Protein durchgeführt. Die Binde-, Wasch- und Elutionsschritte der Kontrollen waren identisch zu den oben beschriebenen Versuchen. Beide Proteine wurden kontinuierlich ausgewaschen. In den letzten Waschsritten sowie in den Elutionsfraktionen wurden weder im SDS-Gel noch immunologisch cGPx oder SuSy-wt detektiert. Eine unspezifische Bindung der Proteine an die Matrices konnte somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

3.6.2.5 Affinitätschromatographie mit Mais-Rohextrakt

Die Affinitätschromatographie von rekombinanter cGPx mit Rohextrakt aus *Z. mays* wurde durchgeführt an einer *Strep-Tactin*-Matrix zeigte in der Protein-Färbung der Desthiobiotin-Elutionsfraktionen (Abb. 3.6.11, *links*) zahlreiche schwache Banden. Durch immunologische Analyse der Eluate mit dem Antikörper gegen den C-Terminus von SUS1 konnte eine Co-Elution von nativer Saccharose-Synthase mit rekombinanter cGPx nachgewiesen werden (Abb. 3.6.11, *rechts*). Die stärksten Signale für das SUS-Protein wurden in den ersten beiden Elutionsfraktionen erhaltenen, während die cGPx hauptsächlich in der dritten Fraktion vorlag. In der parallel durchgeführten Kontrollchromatographie wurden keine Signale mit dem SuS-ct-Antikörper erhalten.

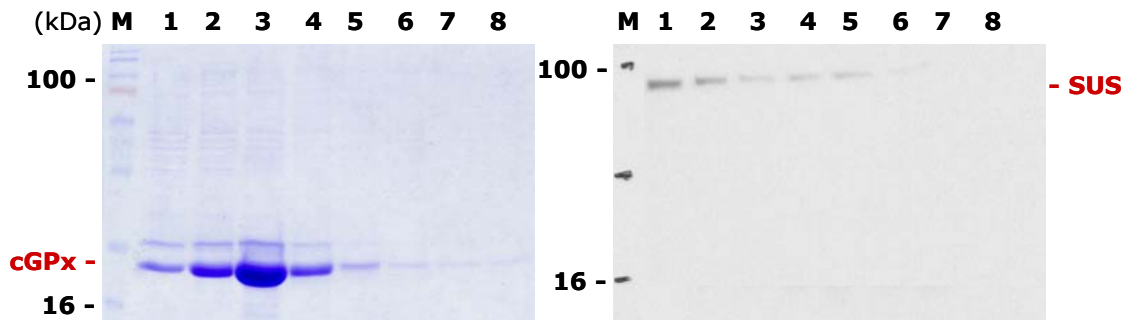


Abb. 3.6.11: Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie mit Mais-Rohextrakt.

Die acht Eluate (Spur:1-8) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt (*links*) und zur Immundekoration mit dem SuS-ct-Antikörper (1:5000) verwendet (*rechts*). Die Elution erfolgte mit Desthiobiotin-haltigem Puffer

3.6.2.6 Sandwich-ELISA und Co-Sedimentationsversuch

Der Sandwich-ELISA als Methode (2.8.3.9) zu Verifizierung von Protein-Protein-Interaktionen bietet gegenüber der Affinitätschromatographie Vorteile. Die Proteine werden nicht zwangsläufig über His- oder Strep-*tag* an die feste Phase gekoppelt, so dass Interaktionen, die durch *tag*-nahe Proteindomänen vermittelt werden, wahrscheinlich besser detektiert werden. Außerdem wirken weniger Scherkräfte auf die mögliche Bindung. Zusätzlich werden im Sandwich-ELISA geringere Proteinmengen benötigt, um die Bindung zu detektieren und zu quantifizieren.

Mittels Sandwich-ELISA wurde versucht, die Bindung von rekombinanter cGPx und SuSy-wt nachzuweisen und zu quantifizieren. In die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte wurden verschiedene Mengen cGPx gegeben und freie Bindestellen durch BSA abgesättigt. Für die Messreihen wurden die Vertiefungen mit gleichen Mengen SUS-Protein überschichtet. Die Negativkontrollen erfolgten ohne SUS-Protein. Nach Entwicklung der Platte mit dem SuSy-Antikörper konnte nach Subtraktion der Kontrollen die Bindung von cGPx und SuSy-wt nachgewiesen werden (Abb. 3.6.12). Weil die Signalstärke in drei unabhängigen Versuchen stark variierte, wurde die Berechnung des Bindeverhältnisses für die drei Versuchsreihen separat durchgeführt. Die Mittelwerte für den Anteil an gebundenem Protein reichten von etwa 17–30 ng SuSy-wt pro 1 µg cGPx (Tab. 3.24). Die Berechnung des molaren Bindeverhältnisses deutet mit einem Verhältnis von weniger als 6 nmol SuSy-wt pro mol cGPx auf eine sehr schwache Bindung hin.

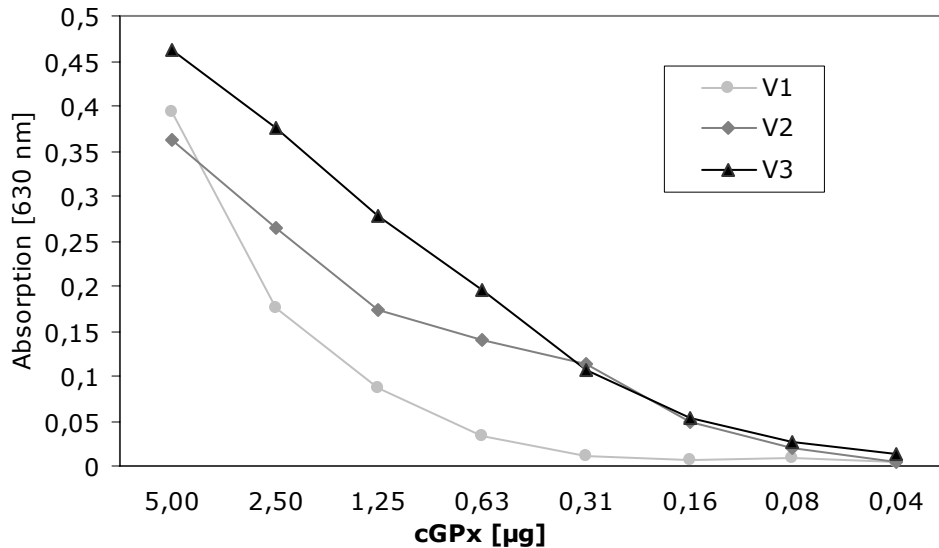


Abb. 3.6.12: Absorption der SUS/cGPx-Bindeproben im Sandwich-ELISA.

Dargestellt sind durch die immunologische Reaktion des SuSy-Antikörpers erhaltene OD-Werte in Abhängigkeit von eingesetzter Menge cGPx nach Subtraktion der Negativkontrolle. Die Messwerte beziehen sich auf die drei unabhängigen Versuche (V1, V2, V3). Geradengleichungen der SUS-Eichreihen: V1: $y = 4,80x + 0,039$; V2: $y = 4,39x + 0,021$; V3: $y = 4,51 + 0,048$.

Tabelle 3.24: Bindekonstanten von SuSy-wt und cGPx im Sandwich-ELISA.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Bindeverhältnisse von SuSy-wt und cGPx der drei unabhängigen Versuche (V1, V2, V3) aus Abbildung 3.6.12.

Versuch	SuSy-wt/cGPX	
	[ng/µg]	[nmol/mol]
V1	$16,90 \pm 2,15$	3,35
V2	$22,16 \pm 8,36$	4,39
V3	$29,85 \pm 15,82$	5,91

Alternativ zu den oben beschriebenen Bindestudien wurde versucht, die Bindung von cGPx und SUS-Protein mit der Aktin-SUS-Assoziation zu koppeln. Die Co-Polymerisation von cGPx und Aktin zeigte keine Assoziation der beiden Proteine. Auch in Versuchen mit allen drei Proteinen (SuSy-wt, cGPx und Aktin) kam es zu keiner Anreicherung der cGPx in der sedimentierten Bindefraktion. Der Verbleib von cGPx in der löslichen Fraktion wurde immunologisch im ELISA und anhand von SDS-PAGE-Analysen nachgewiesen (nicht gezeigt).

3.7 Die SNF1-Proteinkinase 1 aus *Z. mays* (SnRK1)

Bei Durchmusterung der cDNA-Bank mit den SUS-Isoformen SUS1 und SuS3 als *Bait*-Proteine wurde eine Sequenz mit Homologien mit bekannten SNF1-Proteinkinasen (SnRK1) anderer Organismen identifiziert (vgl. 3.5). Mitglieder der SNF1-Kinase-Familie fungieren als heterotrimere Enzymkomplexe, die aus α -, β - und γ -Untereinheiten bestehen. Die Primärsequenz der pflanzlichen α -Untereinheit, auch SnRK1 genannt, umfasst generell mehr als

500 Aminosäuren. Die katalytische Domäne der Serin-/Threonin-Kinase ist am N-Terminus gelegen, während die C-terminale Hälfte eine regulatorische Domäne mit zum Teil assoziativen Eigenschaften beinhaltet. Eine calciumunabhängige Phosphorylierung, wie sie durch eine SNF1-Proteinkinase vermittelt wird, wurde in der Literatur für SUS-Protein beschrieben. Die Sequenzumgebung eines zu phosphorylierenden Ser/Thr-Restes stellt eine wesentliche Determinante der Substratspezifität der Kinase dar (Abb. 3.7.1). Alle drei SUS-Isoformen in Mais besitzen vier Sequenzabschnitte, die mit dem Minimalmotif für eine Phosphorylierung durch die SNF1-Proteinkinase übereinstimmen (Tab. 3.25).

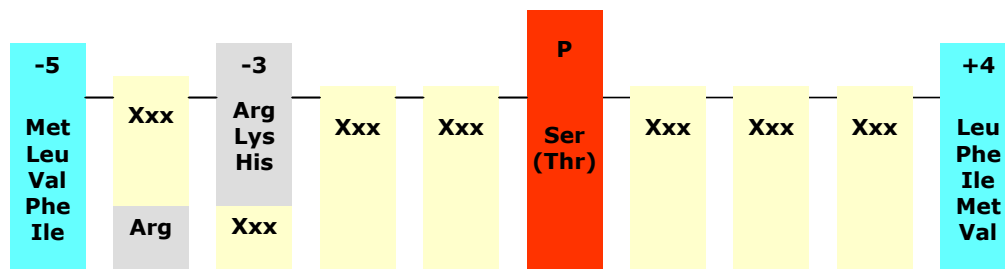


Abb. 3.7.1: Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch SnRK1.

Als Erkennungsmotif für SnRK1 werden bestimmte Aminosäurereste benötigt:

- Zu phosphorylierendes Serin (die Phosphorylierung von Threonin ist weniger effizient).
- Hydrophobe Aminosäurereste an den Positionen -5 und +4, relativ zum Serin.
- Basische Aminosäurereste an den Positionen -3 oder -4, relativ zum Serin.

Tabelle 3.25: Mögliche SnRK1-Kinase-Phosphorylierungsdomänen der SUS-Isoformen.

SUS-Isoform	Aminosäuren	mögliche Phosphorylierungsdomäne
SUS1	164 – 174	f L n R h l S s k l F
	378 – 388	i V r K w i S r f e V
	705 – 715	I I v H g v S g y h I
	780 – 790	n L e R r e F r r y L
SuS3	159 – 169	f L n R h l S I m l F
	373 – 383	I V r K w I S r f e V
	701 – 711	I I e H g v S g f h I
	772 – 782	k L e R l e F r r y L
SH-1	156 – 166	f L n R h l S s k l F
	370 – 380	i L r K w i S r f d V
	446 – 456	y L d K f d S q y h F
	772 – 782	n L e R r e F r r y I

Aufgrund des hohen Homologiegrades der im Hefe-2-Hybrid-System identifizierten Kinase-Sequenz zu der SnRK1 α -Untereinheit aus *H. vulgare* und *O. sativa* wurde angenommen, dass auch die vollständige codierende Sequenz des Mais-Pendants etwa 1500-1600 bp umfasst. Bei der identifizierten Ausgangssequenz mit ~ 490 bp handelte es sich demnach nur um die C-terminale Domäne der SnRK1.

3.7.1 Amplifikation der SnRK1-cDNA

Zur Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenz der SnRK1 aus Mais wurde anhand der Identitäten von 85% auf Nukleotidebene zu Sequenzen aus *H. vulgare* und *O. sativa* der *Sense*-Primer, *Snrk-fw*, designed und in Kombination mit dem genspezifischen *Antisense*-Primer, *Snrk-rev* in der RT-PCR eingesetzt. Aufgrund der möglichen Heterologität des *Sense*-Primers gegenüber der Zielsequenz wurde die RT-PCR im Gradientencycler mit einem Spektrum für die Annealingtemperatur von 55°C bis 65°C durchgeführt. Zuvor revers-transkribierte mRNA aus Wurzeln, Blättern, sich entwickelnden Kolben und etioliertem Sprossgewebe von Mais-Pflanzen wurde als DNA-*Template* für die RT-PCR eingesetzt. Wie in Abbildung 3.7.2 zu sehen, erbrachte die RT-PCR unter Verwendung der mRNA aus Wurzel- und Sprossgewebe ein Amplifikat in der erwarteten Größe von etwa 1,5 kb. Die Klonierung und Sequenzierung dieses Fragments bestätigte die Amplifikation der vollständigen cDNA der putativen SnRK1.

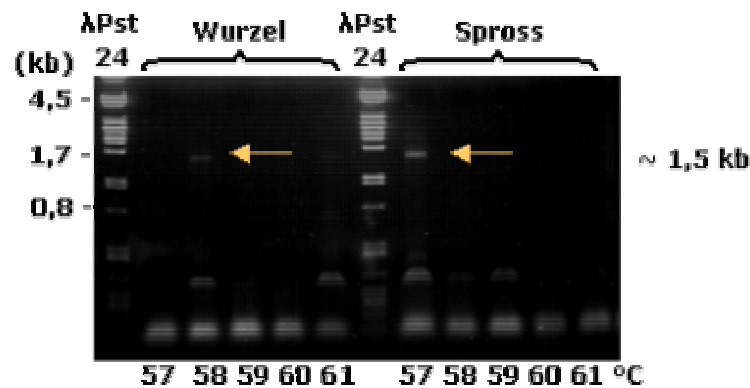


Abb. 3.7.2: RT-PCR zur Amplifikation der SnRK1-cDNA.

Agarosegel (1%) der Amplifikate einer RT-PCR im Gradientencycler mit Annealingtemperaturen von 57-61°C. Revers transkribierte Wurzel-mRNA erbrachte bei einer Annealingtemperatur von 58°C und Spross-mRNA bei einer Annealingtemperatur von 57°C ein Amplifikat von etwa 1,5 kb.

3.7.2 Analyse der Transkriptgehalte für SnrK1 in *Z. mays*

Die SnRK1 Genfamilie der Cerealien kann aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen und Expressionsmuster weiter in die zwei Gruppen, *SnRK1a* und *SnRK1b* unterteilt werden. *SnRK1a* wird in allen Gewebetypen exprimiert, während die für Cerealien spezifische *SnRK1b* hauptsächlich in Samen exprimiert wird. Die physiologische Funktion dieser Unterteilung in Getreidepflanzen ist bislang unbekannt. Durch Northern-Blot-Experimente sollten Hinweise für die Zuordnung der SnrK1 in eine dieser Gruppen erhalten werden. Dabei wurden Gesamt-RNA-Präparationen aus Wurzeln, Koleoptilen, autotrophem Sprossgewebe, Blättern, Pulvini und sich entwickelndem Kolben analysiert. Als Matrize für die Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde die gesamte SnrK1-cDNA verwendet. Das Autoradiogramm zeigte, dass das Transkriptniveau offensichtlich sehr niedrig war. Selbst bei Beladung mit 30 µg Gesamt-RNA pro Spur wurde ein eindeutiges Signal nur in Koleoptilen-Gewebe erhalten (Abb. 3.7.3).

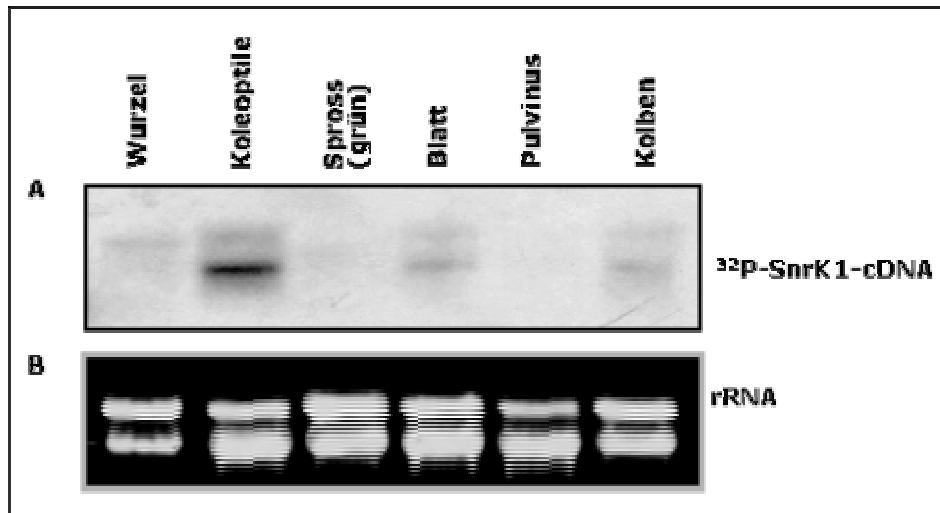


Abb. 3.7.3: „Northern-Blot“-Analyse der Transkription von SnrK1 in verschiedenen Mais-Geweben. Pro Spur wurden 30 µg Gesamt-RNA von Wurzel-, Koleoptile-, Spross-, Blatt-, Pulvinus und Kolbengewebe aufgetragen und mit der radioaktiv-markierten SnrK1-cDNA-Sonde hybridisiert. **A:** Autoradiogramm des Hybridisierungssignals. **B:** Agarosegel zur Kontrolle der Beladung und Integrität der ribosomalen RNA.

Da die SnrK1-Sequenz in der RT-PCR mit einem cDNA-*Template* aus Wurzel- und Sprossgewebe amplifiziert werden konnte und die Northern-Blot-Analyse ein deutliches Transkript in Koleoptilen-Gewebe zeigte, ist es naheliegend, dass die identifizierte SnrK1 eher in die Gruppe der SnRK1a einzuordnen ist.

Untersuchungen zur Expression und katalytischen Aktivität der SnRK1 entfielen aus zweierlei Gründen. Zum einen konnte die kodierende Sequenz zwar erfolgreich in den Expressionsvektor pET-16b kloniert, aber nicht überexprimiert werden, zum anderen wurden im Hefe-2-Hybrid-System die bislang unbekanntenen β - und γ -Untereinheiten des Enzymkomplexes nicht identifiziert.

3.7.3 Untersuchungen zur Phosphorylierung der GAPDH

Im Hefe-2-Hybrid-System wurden vermehrt Vollängen-Klone der GAPDH als putativer Interaktionspartner der SnRK1 (α -Untereinheit) gefunden (vgl. 3.5.4). Die postranslationale Modifikation der GAPDH durch Phosphorylierung ist aus tierischem Gewebe bekannt. Zunächst wurde von KAWAMOTO et al. (1985) eine Autophosphorylierung des Enzyms aus Kaninchenmuskel durch MgATP dokumentiert, später wurde zusätzlich die Phosphorylierung durch eine Proteinkinase C (PKC) sowie die direkte Assoziation von GAPDH und regulatorischen Untereinheit der Kinase gezeigt (REISS et al., 1996b, TISDALE, 2002). Die Phosphorylierung führte im muskulären Gewebe nicht nur zur vermehrten Assoziation des Enzyms an Mikrotubuli, sondern wurde auch mit einer Forcierung der Mikrotubuli-Membranbindung in Zusammenhang gebracht (TISDALE, 2002). Den Ergebnissen von TISDALE (2002) entsprechend erfolgt die PKC-abhängige Phosphorylierung der GAPDH vermutlich an mindestens einem Serinrest. Sequenzinformationen bezüglich der Phosphorylierungs-

domäne(n) sind bislang unbekannt, das Kaninchenenzym besitzt jedoch vier Serinreste mit hoher Phosphorylierungswahrscheinlichkeit.

3.7.3.1 Vorhersage von Phosphorylierungsstellen der GAPDH

Die computergestützte Vorhersage von Phosphorylierungsstellen in den Sequenzen cytosolischer GAPDH-Proteine aus *A. thaliana* und *Z. mays* mit dem Programm NetPhos 2.0 (BLOM et al., 1999) zeigte, dass auch das pflanzliche Pondont die vier Kinase-Konsensussequenzen mit hochkonservierten Serinresten besitzt. Zusätzlich deuteten die pflanzlichen Sequenzen auf eine weitere mögliche Phosphorylierungsstelle am Serin-146 hin. In Tabelle 3.26 wurden die Serin-Positionen und Sequenzkontexte für die möglichen Phosphorylierungsstellen der cytosolischen GAPDH-Proteine aus *Z. mays* und *A. thaliana* sowie der muskulären GAPDH aus *O. cuniculus* aufgelistet. Die putativen Phosphorylierungsdomänen sind innerhalb der Spezies hoch konserviert, so dass die Tabelle exemplarisch für sämtliche Isoformen ist. Bemerkenswert ist, dass die Sequenzkontexte der hier aufgeführten cytosolischen Isoformen 3, GAPC3 (*Z. mays*) und G3PC (*A. thaliana*) zu 100% identisch sind.

Tabelle 3.26: Vorhergesagte Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten.

Serin-Phosphorylierungsstellen in den Sequenzen cytosolischer GAPDH-Proteine aus *Z. mays* (GAPC3, Q43247) und *A. thaliana* (G3PC; P25858) und dem muskulären GAPDH-Protein aus *O. cuniculus* (G3P, P46406) mit dem Programm NetPhos 2.0 (BLOM et al., 1999).

Protein	Position	Sequenzkontext	Phosphorylierungswahrscheinlichkeit [0,000-1,000]
GAPC3 [<i>Z. mays</i>]	144	HEYK S DLDI	0,986
G3PC [<i>A. thaliana</i>]	146	HEYK S DLDI	0,986
GAPC3 [<i>Z. mays</i>]	194	VDGP S MKDW	0,998
G3PC [<i>A. thaliana</i>]	196	VDGP S MKDW	0,998
G3P [<i>O. cuniculus</i>]	198	VDGP S GKLW	0,982
GAPC3 [<i>Z. mays</i>]	243	TVDV S VVDL	0,989
G3PC [<i>A. thaliana</i>]	245	TVDV S VVDL	0,989
G3P [<i>O. cuniculus</i>]	238	TPNV S VVDL	0,980
GAPC3 [<i>Z. mays</i>]	295	DNR S SIFDA	0,997
G3PC [<i>A. thaliana</i>]	297	DNR S SIFDA	0,997
G3P [<i>O. cuniculus</i>]	290	ATH S STFDA	0,917
GAPC3 [<i>Z. mays</i>]	314	VKLV S WYDN	0,997
G3PC [<i>A. thaliana</i>]	316	VKLV S WYDN	0,997
G3P [<i>O. cuniculus</i>]	309	VKLI S WYDN	0,996

3.7.3.2 Immunologische Detektion der Phosphorylierung

Der Nachweis einer möglichen Phosphorylierung wurde mit gereinigter cytosolischer GAPDH aus Spinat (*Spinacia oleracea*) erbracht. Sequenzen cytosolischer GAPDH-Isoformen aus

Spinat sind bislang unbekannt. Das nativ gereinigte Protein stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurde immunologisch untersucht. Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers, Anti-P-Ser, wurde ein deutliches Signal für das gereinigte Enzym im Immunblot erhalten (Abb. 3.7.4 Spur 1). Wurde das Enzym vor der SDS-PAGE und dem Transfer auf die PVDF-Membran mit Alkalischer Phosphatase behandelt, wurde kein Immunsignal erhalten (Abb. 3.7.4 Spur 2).

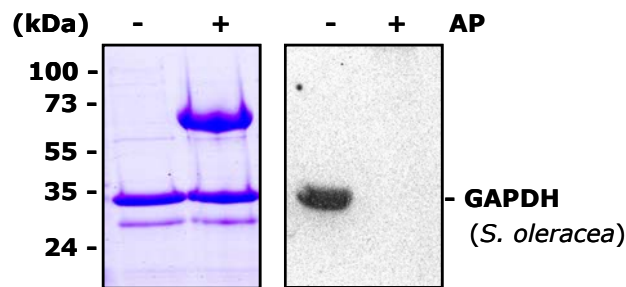


Abb. 3.7.4: Immunologischer Nachweis der Serin-Phosphorylierung von GAPDH.

Nativ gereinigte GAPDH aus Spinat wurde vor und nach einer Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (AP) (vgl. 2.12) auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Phosphorylierungsnachweis erfolgte mit dem Antikörper Anti-P-Ser in einer Verdünnung von 1:5.000. Die Entwicklung erfolgte über ECL.

Das in *E. coli* heterolog exprimierte, cytosolische GAPDH-Protein aus *A. thaliana* zeigte wider Erwarten ebenfalls bei der Immundetektion von phosphorylierten Serinresten ein Signal (Abb. 3.7.5). Somit wurde nicht eindeutig nachgewiesen, dass die detektierte Phosphorylierung des nativen pflanzlichen Enzyms aus Spinat durch eine assoziierte Kinase erfolgte. Die für tierische GAPDH beschriebene Autophosphorylierung könnte auch hier ursächlich sein.

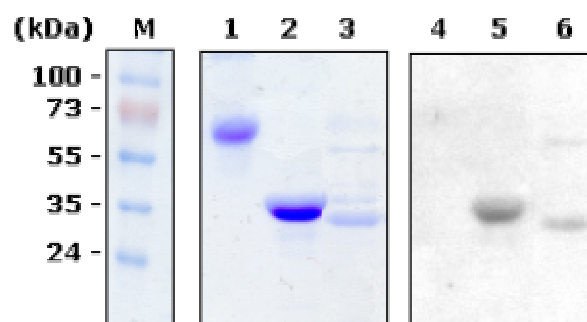


Abb. 3.7.5: Immunblot der Phosphorylierung von rekombinanter und nativer GAPDH.

Native GAPDH (*S. oleracea*), rekombinante cytosolische GAPDH (*A. thaliana*) und BSA (Negativkontrolle) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (*links*) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der Phosphorylierung (*rechts*) erfolgte mit dem Antikörper Anti-P-Ser in einer Verdünnung von 1:5.000. Die Entwicklung erfolgte über ECL. Spur 1 und 4: BSA; Spur 2 und 5: Rekombinante cytosolische GAPDH (*A. thaliana*); Spur 3 und 6: Native GAPDH aus Spinat.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Regulationsmechanismen, die sowohl die katalytische als auch die assoziative Aktivität und damit die intrazelluläre Lokalisation der Saccharose-Synthase aus Mais in der Zelle beeinflussen können, untersucht. Neben der Isoform-spezifischen Charakterisierung unter Einbeziehung posttranslationaler Modifikationen des Enzyms *in vitro* wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems neue proteinogene Bindepartner der Isoenzyme identifiziert (vgl. 4.7.1). Die Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mit zwei möglichen Interaktionspartnern der Saccharose-Synthase, Aktin und eine Kinase, sollte Aufschluss über die Beteiligung weiterer Proteine an der Organisation der subzellulären Lokalisation von SUS erbringen. Eine Bestätigung der *in vivo*-Daten durch *in vitro*-Experimente erfolgte dann für einige der gefundenen Interaktionen (vgl. 4.8).

Die Saccharose-Synthase (SUS) als Schlüsselenzym im Saccharose-Stoffwechsel katalysiert die reversible Umwandlung von Saccharose und UDP zu UDP-Glucose und Fructose. Die Aktivität des Enzyms wurde hauptsächlich in pflanzlichem Gewebe untersucht; nachgewiesen sind Saccharose-Synthasen seit einiger Zeit auch in verschiedenen Cyanobakterien (PORCHIA et al., 1999; CURATTI et al., 2000).

In den meisten höheren Pflanzen ist Saccharose die Haupttransportform photosynthetisch assimilierten Kohlenstoffs zur Versorgung von heterotrophem Gewebe („Sink“-Gewebe) wie z. B. Wurzeln oder Früchte. Die regulatorischen Mechanismen, die der Verteilung der importierten Saccharose in die unterschiedlichen Energie- und Stoffwechselwege oder der Speicherung zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Seit einigen Jahren weisen Arbeiten auf die zentrale Bedeutung der Saccharose-Synthase (SUS) im "sugar sensing" und der Verteilung von Saccharose auf verschiedene Stoffwechselwege, darunter die Synthese von Speicher- und Strukturglucanen und die Glykolyse, hin (HESSE und WILLMITZER, 1996; STURM und TANG, 1999).

Im Leitgewebe scheint die SUS-Aktivität eine Schlüsselrolle bei der Energiebereitstellung von Substraten für die Respiration in den Geleitzellen für die Phloembeladung zu spielen (FU und PARK, 1995; HÄNGGI und FLEMING, 2001). Einer weitgehend akzeptierten Hypothese zur Folge wird das Produkt der SUS-vermittelten Spaltung von Saccharose, die UDP-Glucose, durch direkte oder indirekte Assoziation von SUS mit dem Cellulose-Synthase-Komplex in der Plasmamembran in die Biosynthese von Cellulose-Mikrofibrillen geschleust (DELMER und AMOR, 1995; HAIGLER et al., 2001; RUAN et al., 2003).

Die Spaltungsaktivität des Enzyms korreliert mit der Aufnahmekapazität von Speicherorganen und liefert Substrate als Vorläufer für die Stärke-Synthese in Kartoffelknollen, Maiskörnern oder Erbsen-Embryonen (SUN et al., 1992; ZRENNER et al., 1995; DÉJARDIN et al., 1997). Ebenso steht die Expression von SUS mit wichtigen Prozessen wie der Entwicklung von Wurzelknöllchen und dem Stoffwechsel von Leguminosen (CRAIG et al., 1999; HOHNJEC et al., 1999) sowie Funktionen des Apikalmeristems der Tomate (PIEN et al.,

2001) in Verbindung. Für die Assoziation des typischerweise löslichen, cytosolischen Enzyms mit der Plasmamembran wurden verschiedene Hinweise gesammelt (AMOR et al., 1995; CARLSON und CHOUREY, 1996). Eine Tonoplast-assoziierte Form der SUS wurde neuerdings in der Roten Bete beschrieben (ETXEBERRIA und GONZALEZ, 2003). AZAMA et al. (2003) fanden SUS als eines der Kohlenhydrat-metabolisierenden Enzyme in der Cytoskelettfraction von Mais-Endosperm. Eine direkte Assoziation von SUS-Protein mit Aktinfilamenten wurde erstmals von WINTER et al. (1998) für das Enzym aus Mais *in vitro* gezeigt und von MATIC et al. (2004) für SUS-Protein aus Tabak bestätigt.

Die subzelluläre Lokalisation von SUS als lösliches Enzym oder in Assoziation mit der Plasmamembran oder dem Aktin-Cytoskelett ist vermutlich sowohl metabolisch als auch durch posttranslationale Modifikation von SUS reguliert. Somit würde die Saccharose-Synthase eine "Schnittstelle" zwischen Primärstoffwechsel und Cytoarchitektur der Zelle darstellen. Funktion und Regulation beteiligter Mechanismen sind *in vivo* und *in vitro* weitgehend unbekannt.

Die überwiegende Mehrheit der bis heute charakterisierten *Sus*-Gene in monokotylen und dikotylen Pflanzen gehören zu kleinen Multigen-Familien (KOMATSU et al., 2002). Infolge der zum Teil redundanten Expressionsmuster ist eine Isoform-spezifische Funktionszuordnung, falls es diese überhaupt gibt, derzeit noch überaus unbestimmt. Vielmehr noch könnten die *Sus*-Genfamilien, die bis heute untersucht wurden, sogar noch unvollständig sein (CARLSON et al., 2002), was das umfassende Verständnis der SUS-Familie offensichtlich behindert.

4.1 Vergleichende biochemische Charakterisierung von SUS-Isoformen

Sämtliche Vorarbeiten zu den katalytischen und assoziativen Eigenschaften der SUS waren an nativ gereinigtem Enzym mit unbestimmten Verhältnissen der Isoenzyme durchgeführt worden. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich das Vorkommen von zwei SUS-Isoformen SH1 und SUS1 in Mais bekannt. Eine Funktion wurde für keine der Isoformen bislang spezifiziert; gezeigt worden war allerdings, dass die Transkription der Isogene abhängig vom Gewebe und dem Entwicklungsstadium der Pflanze reguliert ist.

Für die beiden bekannten Isoformen SUS1 und SH1 wurde die Bildung von Homo- oder Heterotetramern postuliert. Die Isoform-spezifische Durchmusterung einer cDNA-Bank, die aus Gesamt-RNA von unter anaeroben Bedingungen kultivierten jungen Maiskeimlingen (Spross und Wurzel) generiert worden war, führte wiederholt zur Identifizierung eines cDNA-Klones, dessen Primärsequenz hohe Homologien zu den SUS-Sequenzen aus Mais und anderen Organismen zeigte. Die Existenz einer dritten Isoform (SuS3) in *Z. mays* wurde nach Amplifikation, Klonierung und heterologer Expression der codierenden Sequenz durch Enzym-Assays bestätigt. In Übereinstimmung mit SUS-Isoformen von anderen monokotylen und dikotylen Pflanzen kommt es infolge von Sauerstoffmangel zur vermehrten Expression der SUS-Gene aus Mais (MARANA et al., 1990; RICARD et al., 1998; ZENG et al., 1998). Die

Expression der SUS1-Isoform wird bevorzugt unter hypoxischen (3% O₂) und die SH1-Isoform unter anoxischen Bedingungen (0% O₂) induziert (ZENG et al., 1998). Das Auffinden von SuS3-Transkripten in der anaeroben cDNA-Bank deutet darauf hin, dass auch die SuS3-Isoform vermehrt unter anaeroben Bedingungen amplifiziert wird. Untermuert wird diese These durch die Ergebnisse der RT-PCR, bei denen die SuS3-cDNA bevorzugt aus anaerobem Keimlings-Gewebe amplifiziert wurde, während die cDNA der SUS1-Isoform über RT-PCR auch aus aerob kultiviertem Gewebe erhalten wurde. Die cDNA der SH1-Isoform konnte hingegen ausschließlich aus anaerobem Gewebe nach Induktion der Genexpression durch Saccharose amplifiziert werden (vgl. 3.1.1).

Die Primärsequenzanalyse der SuS3 zeigt größere Homologien auf Aminosäure- und Nukleotidebene zu Saccharose-Synthasen anderer monokotiler und dikotiler Organismen, darunter Roggen, Weizen usw., als zu den Isoformen SH1 und SUS1 aus Mais. Seit wenigen Jahren wird eine Klassifizierung der pflanzlichen Saccharose-Synthasen basierend auf dem Vergleich von Aminosäuresequenzen und der Intron/Exonstruktur der Gene in vier unterschiedliche Gruppen favorisiert (KOMATSU et al., 2002; BAUD et al., 2004). Die vier Gruppen umfassen die Neue Gruppe (new group; NG), die SUSA-Gruppe, (dicot SUSA group), die monokotyle SUS1-Gruppe (Monocot SUS1 group) und die dikotyle SUS1-Gruppe (Dicot SUS1 group) (KOMATSU et al., 2002; BAUD et al., 2004). Während die Mais-Isoformen SH1 und SUS1 demnach beide zur monokotylen SUS1-Gruppe gehören, ist die SuS3-Isoform als erste monokotyle Isoform in die SUSA-Gruppe einzuordnen (BAUD et al., 2004).

4.1.1. Kinetische Eigenschaften der SUS-Isoenzyme

Verschiedene Arbeiten zeigten sowohl an nativen als auch an rekombinanten SUS-Isoenzymen aus Erbse und Zuckerrohr Unterschiede in den kinetischen Konstanten der Synthese- und Spaltreaktion von Saccharose und in den pH-Optima (SUNG und Su, 1977; BUCZYNSKI et al., 1993; BARRATT et al., 2001).

Die vergleichende Betrachtung der neu identifizierten Isoform SuS3 mit der Isoform SUS1 ergab, dass obwohl tendenziell die Synthese- und die Spaltungsaktivität der rekombinanten SUS1-Isoform gegenüber der SuS3-Isoform zwar leicht erhöht war, die katalytischen Eigenschaften der beide Isoenzyme *in vitro* jedoch ähnlich sind. Sowohl die Substratspezifitäten als auch die kinetischen Parameter sowie die pH-Optimumsbereiche der reversiblen Saccharose-Synthase-Aktivität sind vergleichbar, so dass auf der Grundlage biochemischer Charakteristika keine Hinweise für eine SuS3-spezifische Funktion erhalten wurden (vgl. 3.2.1). Die Untersuchungen zur katalytischen Substrat-Spaltung der rekombinanten Isoenzyme zeigten, dass die SuS3-Isoform ebenso wie die SUS1-Isoform spezifisch für Saccharose ist. UDP als Nukleotid wurde bevorzugt genutzt, wenngleich SuS3 auch eine signifikante Affinität zu ADP zeigte. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Spaltungsreaktion und die Affinitäten zu den Substraten lagen mit Werten für die V_{\max} von 2,5-3,5 U mg⁻¹ und mit K_m -Werten von 30-60 mM für Saccharose zum einen in der

gleichen Größenordnung und zum anderen im für native Saccharose-Synthasen angegebenen K_m -Bereich (AVIGAD, 1982). Das pH-Optimum der durch SUS katalysierten Saccharose-Spaltung liegt generell zwischen pH 6,0-7,0, während das pH-Optimum für die Synthese-Reaktion um pH 7,5 liegt. Für die heterolog exprimierte SuS3-Isoform aus Mais wurde im Vergleich zur SUS1-Isoform in der Saccharose-Spaltreaktion unter Anwesenheit von UDP kein verschobenes, sondern lediglich ein leicht gespreiztes pH-Optimum ermittelt. Die SUS1-Isoform hatte ihre höchste Aktivität bei einem pH-Wert 6,5; bei einem pH-Wert von 7,5 oder 5,5 blieben lediglich 56-70% dieser Aktivität erhalten. Im Gegensatz dazu waren unter Verwendung von SuS3, bei pH-Werten von 5,5 und 6,5 die Aktivitäten nahezu identisch und auch bei einem pH-Wert von 7,5 wurden noch etwa 82% der maximalen Aktivität erreicht.

Aus der Literatur sind Unterschiede der kinetischen Parameter insbesondere in Richtung der Saccharose-Synthese bekannt. Für die in *E. coli* heterolog exprimierten Erbsen-Isoenzyme (SUS1, 2 und 3) wurden insbesondere Unterschiede in der Affinität zu UDP-Glucose und in der Substratinhibition durch Fructose (BARRATT et al., 2001) festgestellt. Bezüglich der Synthesereaktion wiesen die analysierten, rekombinanten Mais-Isoformen keine bedeutenden Unterschiede in der Substratspezifität und Substrataffinität auf. Mit beiden Mais-Enzymen wurden die höchsten Syntheseraten mit UDP-Glucose erreicht. Somit sind prinzipiell beide Isoenzyme fähig, UDP-Glucose als wichtige Vorstufe für die Biosynthese von Stärke und die in die Zellwandbiosynthese eingehenden Bausteine UDP-Xylose, UDP-Arabinose und UDP-Glucuronsäure (AVIGAD, 1982; FEINGOLD, 1982) zu bilden. Ferner ist auch die Synthese von ADP-Glucose als direktes Substrat für die Stärke-Synthase, wie sie von BAROJA-FERNANDEZ et al. (2003) als durchaus *in vivo* wahrscheinlich beschrieben wurde, möglich (vgl. Tab. 3.2).

4.1.2. Immunologischer Nachweis von SuS3-Fragmenten in *Zea mays*

Der gewebespezifische, immunologische Nachweis des SuS3-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper, der durch Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinantem SuS3-Protein generiert wurde. Die Isoformspezifität sollte erreicht werden, indem unspezifische Bindestellen des SuS3-Immunsersums mit rekombinantem SUS1-Protein abgesättigt wurden. Der erhaltene Antikörper Anti-SuS3 detektierte in Rohextrakt aus etiolierendem Sprossgewebe sowie aus grünem Sprossgewebe und reifen Maisblättern deutliche Proteinbanden jeweils im Bereich von 70 kDa (vgl. 3.2.3). Das Molekulargewicht der SUS-Isoformen liegt allerdings bei etwa 92 kDa pro Monomer, so dass hier vom Nachweis degradierteter SuS3-Fragmente ausgegangen werden muss. Die Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen den C-Terminus von SUS1 auf derselben Blotmembran zeigte die Existenz von SUS-Protein in Volllänge. SUS1-Protein konnte in allen analysierten Maisgeweben, einschließlich Wurzel, Pulvinus und sich entwickelnder Kolben, nachgewiesen werden. Auffällig war, dass wie erwartet zwar nur geringe SUS1-Proteinmengen im

autotrophen Blatt gefunden wurden, der SuS3-Antikörper hier aber die deutlichsten Signale erbrachte. Dies könnte auf eine gewebespezifische Expression der SuS3-Isoform hinweisen, obwohl CARLSON et al. (2002) eine konstant niedrige Expression des SuS3-Proteins postulierten. Für den verfehlten Nachweis des vollständigen SuS3-Proteins nach Verarmung des Antikörpers mit SUS1-Protein können mehrere Faktoren ursächlich sein. Zum einen ist es möglich, dass einige Epitope des polyklonalen Immuserums Anti-SuS3 gegen hochkonservierte Domänen der Saccharose-Synthasen gerichtet waren und somit als unspezifische Bindestellen durch SUS1-Protein abgesättigt wurden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass SuS3 *in vivo* einem raschen Proteinabbau unterliegt und daher im Gewebe nur minimale Mengen des Volllängen-Proteins enthalten sind. Die Erklärung der Instabilität des SUS-Proteins *in vivo* und *in vitro* mit dem selektiven Abbau über den Ubiquitin-vermittelten Proteasomweg würde im Einklang mit Ergebnissen von HARDIN et al. (2003) stehen. Eine entsprechend geringere Stabilität und die Degradierung des SUS3-Proteins über das 26S-Proteasom würde daher erklären, warum mittels Western-Blot-Analyse (trotz hoher Transkriptakkumulation) nach Verarmung des Antikörpers gegen SUS1-Protein kein SuS3-Protein in Volllänge in den verschiedenen Geweben detektiert wurde.

In Untersuchungen von CARLSON et al. (2002) an Doppelmutanten, die bezüglich der SUS1- und der SH1-Isoform defizient waren, wurde weiterhin schwache SUS-Aktivität nachgewiesen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass wenigstens temporär SuS3 als katalytisch aktives Protein exprimiert wird. Außerdem wurden bei den Durchmusterungen mit dem Hefe-2-Hybrid-System ausschließlich Plasmide isoliert, die die vollständige SuS3-cDNA enthielten. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist ferner die späte Identifizierung der SuS3-Isoform im Vergleich zur SUS1 und SH1-Isoform und das Publizieren einer N-terminal verkürzten SuS3-Sequenz von CARLSON et al. (2002).

4.1.3 Untersuchungen zur N-terminalen Phosphorylierung von SuS3

Die Analyse des N-Terminus von SuS3 wies auf eine Erkennungssequenz für eine mögliche reversible Phosphorylierung hin, wie sie für die beiden Mais-Isoformen SUS1 und SH1 *in vivo* bereits gezeigt wurde (HUBER et al., 1996). Die Autoren zeigten die Phosphorylierung der SUS-Proteine aus Mais durch eine Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase (CDPK) und spezifizierten später anhand synthetischer Peptide die Konsensussequenz der CDPK im Vergleich zur calciumunabhängig phosphorylierenden SnRK. Beide Kinasen gehören zur Gruppe der Calmodulin-ähnlichen bzw. -abhängigen Proteinkinasen (HARDIE, 2000). Daher sind sie spezifisch für Serin- oder Threoninreste und verfügen über ähnliche minimale Konsensusmotive (HANKS und HUNTER, 1995). Der generell große Einfluss der Aminosäureabfolge innerhalb der Erkennungssequenz auf die Substratspezifität von Ser/Thr-Kinasen ist seit langem bekannt (KENNELLY und KREBS, 1991; KEMP et al., 1994). Neuere Arbeiten zeigten die Bedeutung von Prolinresten in unmittelbarer Umgebung der Phosphorylierungsstelle

(HUANG und HUBER, 2001). Ein Prolinrest an Position 4 in Relation zur Phosphorylierungsstelle inhibiert eine Phosphorylierung durch die CDPK, während die Phosphorylierbarkeit durch die SnRK begünstigt wird (HUANG und HUBER, 2001). Die Bedeutung eines Prolinrestes an Position +2 relativ zur Phosphorylierungsstelle wurde in einem 14-3-3-Protein als essentiell für die Formierung einer Bindestelle erachtet (YAFFE et al., 1997). Da Prolinreste eine Polypeptidstruktur signifikant verändern können, wurde mittels Peptidphosphorylierung überprüft, ob der N-Terminus von SuS3 *in vitro* durch maisendogene Kinasen phosphoryliert werden kann. Ebenso wie das Kontrollpeptid, welches zum N-Terminus von SUS1 korrespondierte, konnte die SuS3-homologe Peptidsequenz spezifisch in Abhängigkeit von Calcium phosphoryliert werden (vgl. 3.2.2). Die Proline an Position -1 und -7 relativ zum phosphorylierbaren Serin an Position 11 zeigten keinen inhibitorischen Einfluss auf die CDPK-vermittelte Phosphorylierung. Versuche zur Phosphorylierung des reifen SuS3-Proteins wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Ferner deuteten Untersuchungen zur posttranslationalen Redox-Modifikation der Isoenzyme, die unter 4.2 diskutiert werden, auf keinen SuS3-spezifischen Regulationsmechanismus hin. Das rekombinante SuS3-Protein ist in Co-Sedimentationsversuchen ebenso wie die SUS1-Isoform befähigt an filamentöses Aktin zu binden. Zusammengenommen mit den zuvor diskutierten Ergebnissen der SuS3-Charakterisierung weisen die Befunde auf keine immensen funktionalen Unterschiede zwischen den Isoformen SUS1 und SuS3 hin, sondern eher auf eine unterschiedliche Feinregulierung der Isoenzyme. Darüber hinaus scheint die SuS3-Isoform in Mais unter wenig extremen Bedingungen eher eine untergeordnete Rolle *in vivo* zu spielen; das vermehrte Auftreten der SuS3 in der anaeroben cDNA-Bank könnte bereits auf eine Bedeutung der SuS3-Isoform unter Stressbedingungen hinweisen.

4.2 Posttranslationale Redox-Modifikation von SUS-Isoformen

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Thiolgruppen an der Aufrechterhaltung der katalytisch aktiven Konformation der SUS stammten aus Untersuchungen an gereinigtem Rohextrakt aus Weizen, wo eine unidirektionale Modulation der SUS-Enzymaktivität festgestellt wurde (PONTIS et al., 1981). Messungen zeigten eine Verminderung der Spaltungsaktivität durch Oxidation des Enzyms mit DTT_{ox}, oxidiertem chloroplastidärem Thioredoxin (Td) oder oxidiertem Glutathion (GSSG). Dieser Effekt war *in vitro* reversibel. Im Gegensatz zur Spaltungsaktivität blieb die Syntheseaktivität in den Untersuchungen nahezu unbeeinflusst von Redoxreagenzien. Die Saccharose-Synthase kommt überwiegend als lösliches Enzym im Cytosol von „Sink“-Gewebe vor. Eine Aktivitätsänderung von cytosolisch lokalisierten Enzymen im „Sink“-Gewebe durch Redox-Modifikation wurde bisher *in vivo* nicht nachgewiesen; aufgrund der Anwesenheit von Glutathion und Td *h* im Cytosol wäre eine derartige Regulation jedoch denkbar.

Das aus Glycin, Cystein und γ -Glutamat bestehende Tripeptid Glutathion (GSH) ist das in Pflanzen am häufigsten vorkommende, niedermolekulare freie Thiol. Der zelluläre Glutathionpool besteht unter normalen Bedingungen hauptsächlich aus der reduzierten Form (GSH) (KRANNER und GRILL, 1995). In höheren Pflanzen ist Glutathion die Transportform für reduziertem Sulfat (RENNENBERG, 1982). Glutathion wird zum Schutz der Zellen vor oxidativem Stress benötigt, indem es wahrscheinlich die Oxidation der Sulfhydrylgruppen in Proteinen verhindert. Außerdem ist Glutathion an der Regulation von Enzymaktivitäten beteiligt (MEISTER, 1995; OCHERETINA und SCHEIBE, 1994). Als eine Funktion von Glutathion (GSH) gilt das Schützen von Thiolgruppen in Proteinen vor Oxidation bzw. der Schutz vor Bildung intramolekularer Disulfidbrücken. Die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) enthält zwei Moleküle Glutathion, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Bei einem „Überschuss“ von GSSG können Proteine oxidiert werden. Neben den Untersuchungen von PONTIS et al. (1981) sprechen zwei stark konservierte Cysteinreste in der Aminosäuresequenz unterschiedlicher SUS-Isoformen aus verschiedenen mono- und dikotylen Pflanzen sowie aus Blaualgen für die Möglichkeit einer Modulation der katalytischen SUS-Aktivität über die reversible Bildung einer intra- oder intermolekularen Disulfidbrücke. Am Enzym könnte so durch Oxidation oder Reduktion eine Strukturmodifikation des aktiven Zentrums erfolgen, was sich wiederum in Veränderungen der Aktivität niederschlagen könnte. In den Untersuchungen von PONTIS et al. (1981) lagen die verschiedenen Isoformen vermutlich als Gemisch im Rohextrakt vor. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit die Redox-Modifikation der rekombinanten und nahezu frei von Fremdprotein vorliegenden SUS-Isoformen SUS1 (SuSy-wt) und SuS3 separat untersucht, um eventuelle Isoform-spezifische Unterschiede in der Regulation transparent zu machen. Der Einfluss von anderen Saccharose-verstoffwechselnden Enzymen wie beispielsweise der Saccharose-Phosphat-Synthase, die die Messungen eventuell verfälschen könnten, wurde somit ausgeschlossen.

4.2.1 Einfluss auf die Spaltungsreaktion

Die katalytische Aktivität der SUS-Isoformen SUS1 (SuSy-wt) und SuS3 in Richtung der Saccharose-Spaltung wurde unter oxidierenden Bedingungen unabhängig vom verwendeten Thiolreagenz inhibiert. Unter reduzierenden Bedingungen hingegen wurde eine generelle Steigerung der Spaltungsaktivität festgestellt, die für beide Isoenzyme positiv mit den eingesetzten Konzentrationen an reduziertem DTT korrelierte (vgl. 3.4.1). Die Aktivierung beider SUS-Isoformen zeigte sich deutlich in den kinetischen Parametern. Reduzierende Bedingungen führten zu einer erhöhten Affinität zu Saccharose sowie zu einem gesteigerten V_{\max} -Wert. Während in DTT-freien Proben K_m -Werte für Saccharose von 96-130 mM bestimmt wurden, halbierten sich diese Werte bereits in Gegenwart von 2 mM DTT_{red} und sanken in Anwesenheit von 10 mM DTT_{red} auf 11-23 mM ab. Obwohl die Änderungen der kinetischen Parameter für beide Isoformen in der gleichen Größenordnung lagen, wurde unter bestimmten Pufferbedingungen eine höhere Aktivität der SuS3-Isoform festgestellt, was vermutlich auf die höhere Grundaktivität im leicht alkalischen Bereich dieser Isoform gegenüber SUS1 zurückzuführen ist. Ein anderer Erklärungsansatz wäre eine im Vergleich zu SUS1 effizientere Aktivierung der SuS3-Isoform durch Thiolreagenzien, als Mechanismus zur Feinregulation der Aktivität in der Zelle. Durch Reduktion mit DTT_{red} konnte die Spaltungsaktivität nach vorausgehender Oxidation weitestgehend für beide Isoenzyme wieder hergestellt und somit die Reversibilität dieser posttranslationalen Enzymregulation bestätigt werden (vgl. 3.4.3; Abb. 3.4.3). Da synthetische Reagenzien nur theoretische Aussagen über die wirkliche Situation in der Zelle zulassen, wurden neben DTT auch die *in vivo* relevanten Redoxreagenzien Glutathion und Thioredoxin in die Untersuchungen der Spaltungsrichtung einbezogen. Beide Reagenzien sind im Cytosol heterotropher Gewebe vorhanden und wären so potentielle Faktoren einer Saccharose-Synthase-Redoxregulation *in vivo*. Messungen unter Einfluss von Glutathion bestätigten die Beobachtungen der DTT-Messungen. So ließ sich die Spaltungsaktivität sowohl von SUS1 als auch von SuS3 durch GSH regenerieren, während bei zunehmendem Einfluss von GSSG keine Spaltungsaktivität der Enzyme detektierbar war. Die eingesetzten Konzentrationen bis 50 mM GSH zeigten bei der Aktivierung von SUS1 oder SuS3 (vgl. 3.4.1) noch keinen sättigenden Effekt. Nach DICKINSON et al. (2002) liegt Glutathion als häufigstes Nicht-Protein-Thiol in den meisten Zellen in millimolaren Konzentrationen vor. Frühe Daten von RENNENBERGER (1982) geben für das Cytosol von Mesophyllzellen aus *Arabidopsis* GSH-Konzentrationen von etwa 60 μM an. In Trichomzellen aus *Arabidopsis* wurden cytosolische GSH-Konzentrationen von 238 μM determiniert (GUTIÉRREZ-ALCALÁ et al., 2000). HARTMANN et al. (2003) ermittelten für die Blätter der Pappel einen GSH-Gehalt von gut 400 nmol pro Gramm Frischgewicht. Eigene HPLC-Messungen zur Quantifizierung von Glutathiongehalten verschiedener Maisgewebe mit deutlicher SUS-Expression (vgl. 3.4.6) ergaben Werte von bis zu 600 nmol an freiem GSH pro Gramm Frischgewicht für etioliertes Sprossgewebe. Somit wäre ein regulatorischer Effekt von GSH auf Saccharose-Synthase *in vivo* tatsächlich vorstellbar.

4.2.2 Thioredoxine als mögliche Mediatoren der Redoxmodulation

Die Steigerung der Saccharose-Spaltungsaktivität unter Einfluss von Thioredoxinen (Td) untermauerte die physiologische Relevanz der Redoxmodulation von SUS. Für die SUS1-Isoform wurde durch Thioredoxin ein deutlich aktivierender Effekt festgestellt, während die SuS3-Isoform in ihrer Spaltungsaktivität nicht signifikant beeinflusst wurde. Mehrere Gründe könnten für diese Beobachtung ursächlich sein. Zum einen könnte durch die im Vergleich zur SUS1-Isoform erhöhte Grundaktivität von SuS3 infolge der Vorinkubation in einem leicht alkalischen Puffermedium den Effekt weitgehend verdecken. Versuche mit zuvor oxidiertem Enzym könnten hier Aufschluss geben. Ferner könnte die Verwendung von physiologisch irrelevanten Td-Isoformen nicht ausreichend effizient und spezifisch für die Aktivierung der SuS3-Isoform sein. Sowohl bei dem verwendeten Td *f* als auch bei den Td *mb* und Td *mc* handelte es sich um chloroplastidär lokalisierte Proteine (BUCHANAN, 1980), die *in vivo* keine Reduktion der cytosolisch lokalisierten SUS vermitteln können.

Neben chloroplastidären Td wurden auch mitochondriale und cytosolische Td identifiziert (FLORENCIO et al., 1988; LALOI et al., 2001). Die cytosolischen Td, die wegen ihrer Verbreitung in heterotrophem Gewebe auch Td *h* genannt werden, wären für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten zur Redoxmodulation von SUS physiologisch relevant. Weitere Analysen mit diesem Td-Typ könnten die hier gesammelten Hinweise nachhaltiger verdeutlichen, vor allem weil die katalytischen Eigenschaften der Td sich voneinander unterscheiden und eine Beteiligung von Td *h* bei der Keimung und in frühen Stadien der Keimlingsentwicklung in Getreide nachgewiesen wurde (SCHÜRMAN und JACQUOT, 2000). Bereits bekannt sind verschiedenste Proteine, die als Zielenzyme der Reduktion durch Thioredoxin *h* gelten, so beispielsweise verschiedene Peroxiredoxine (KÖNIG et al., 2003). Durch Oxidation von Gewebeextrakten aus Roggen-Endosperm mit H₂O₂ und Reduktion mit dem NADP/Thioredoxin-System wurden nach anschließender 2-D-Gelelektrophorese weitere Zielproteine von Thioredoxin *h* identifiziert (MARX et al., 2003), einschließlich einer Peptidsequenz mit 87,5% Homologie zu einer bislang in Roggen unbekanntem Glycosyltransferase. Basierend auf der Identifizierung verschiedener Thioredoxin-modifizierter Protein wird für die Thioredoxine *h* neben der Beteiligung an einem intrazellulären Schutzmechanismus gegen reaktive Sauerstoffspezies eine Rolle bei der Dormanz sowie an Translation und Mobilisierung von Speicherproteinen postuliert (MARX et al., 2003).

4.2.3 Die Syntheseaktivität

Im Gegensatz zur Spaltungsreaktion der SUS1 und SuS3 Enzyme wurde die Synthesereaktion durch oxidierende Bedingungen nicht vollständig inhibiert. Selbst Konzentrationen an oxidiertem DTT von bis zu 50 mM führten lediglich zu einer etwa 15-30%igen Inhibition der Syntheseaktivität der analysierten SUS-Enzyme. Reduzierende Bedingungen führten zwar zu einer Steigerung der Syntheseaktivität, aber anders als bei

der Spaltungsreaktion wurde hier keine positive, konzentrationsabhängige Korrelation zwischen reduzierendem Reagenz und Enzymaktivität im Sinne von je mehr, desto mehr beobachtet (vgl. 3.4.2). Dies deutet darauf hin, dass leicht reduzierende Bedingungen für den grundsätzlichen Erhalt der aktiven Konformation des Enzyms essentiell sind, die eigentliche katalysierte Reaktion jedoch nicht separat beeinflusst wird. Dies manifestierte sich besonders deutlich bei der SuS3-Isoform (Abb. 3.4.11), bei der in Gegenwart von 1 mM DTT_{red} die Aktivität um etwa 120%, verglichen mit DTT-freien Messungen gesteigert wurde, zunehmend reduzierende Bedingungen jedoch keine weitere Aktivitätssteigerung des Enzyms nach sich zogen. Konzentrationen von 10-50 mM DTT_{red} führten sogar zum Absinken der katalytischen Aktivität bis auf etwa 95% des Ausgangswertes. Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen zur Redox-Modifikation ein ähnliches Verhalten der beiden rekombinanten Enzyme, so dass für beide Isoenzyme *in vivo* die Möglichkeit dieser posttranslationalen Regulation bzw. Modifikation besteht.

4.2.4 Untersuchungen zur Identifizierung inter- oder intramolekularer Disulfidbindungen

Die Tertiärstruktur der Saccharose-Synthase ist unbekannt, somit können bislang keine signifikanten Aussagen über die Lokalisation der katalytischen Zentren im Protein angestellt werden. Da die Redox-Modifikation einen Effekt auf die Enzymaktivität hat, muss das native SUS-Enzym Disulfidbindungen ausbilden können.

Die Bedeutung einer Redox-Regulation der Saccharose-Synthase-Spaltungsaktivität sowie die Lokalisation beteiligter Cysteine könnten Untersuchung an mutagenisierten Proteinen, welche anstatt der konservierten Cysteinreste beispielsweise die strukturell sehr ähnliche Aminosäure Serin in der Aminosäuresequenz inseriert haben, klären. Der Austausch der Cysteine gegen Serin hätte zur Folge, dass die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen bei Oxidation nicht mehr möglich wäre. Folglich müsste am rekombinant exprimierten Protein die Fähigkeit zur Redox-Modifikation verloren gehen und die Saccharose-Spaltung dauerhaft unabhängig vom Redoxzustand mit konstanter Stärke katalysiert werden.

Aufgrund der Aminosäuresequenzanalyse verschiedener SUS-Isoform wurden zwei hochkonservierte Cysteine (Cys-352 und Cys-437) für die ortsspezifische Mutagenese der rekombinanten SUS1-Isoform ausgewählt (vgl. 3.4.3). Die gezielte Mutagenese zum Austausch der SH-Gruppen-tragenden Cysteine gegen Serinreste verlief auf Nukleotidebene erfolgreich, jedoch konnte in *E. coli* lediglich die Mutante C352S in ausreichenden Mengen exprimiert werden. Die C352S-Mutante war bezüglich der Saccharose-Spaltung und Saccharose-Synthese aktiv. Wider Erwarten waren jedoch die Enzymreaktionen in Synthese- und Spaltungsrichtung im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp stark vermindert. Da reduzierende Bedingungen das C352S-Protein weiterhin aktivierten, muss davon ausgegangen werden, dass der Cysteinrest an Position 352 in der SUS1-Sequenz

zwar an der katalytischen Kapazität des Proteins beteiligt, aber nicht allein entscheidend für Redox-Modifikation des Enzyms ist. Neuste Arbeiten von RÖHRIG et al. (2004) zeigten an SUS-Protein aus Sojabohne, dass ein Cysteinrest an Position 264 eine Disulfidbindung mit einer cysteinhaltigen Peptidsequenz des frühen Nodulin-Proteins ENOD40 eingehen kann. Ferner demonstrierten die Autoren, wie diese S-Thiolierung des SUS-Proteins die katalytische Aktivität in Richtung der Saccharose-Spaltung aktiviert, während die Syntheserichtung unbeeinflusst bleibt. Der Cysteinrest Cys-264 sowie die umgebende Sequenz ist in SUS-Isoformen vieler Pflanzenspezies, so auch in Luzerne, Bohnen, Melonen, Orange, Erbse, Kartoffel und Tomate, konserviert, während Cys-264 nicht in SUS-Proteinen von Mais, Weizen, Roggen, Karotte und Tabak zu finden ist. Da im Rahmen dieser Arbeit die Redox-Modifikation an SUS-Protein aus Mais und durch PONTIS et al. (1981) an Enzym aus Weizen die Thiol-abhängige Inaktivierung der Spaltungsreaktion gezeigt wurde, wird offensichtlich, dass in diesen Organismen der von RÖHRIG et al. (2004) identifizierte Cysteinrest Cys-264 nicht ursächlich für eine S-Thiolierung und eine damit einhergehende Aktivitätsmodulation sein kann. Die überwiegende Zahl der SUS-Isoformen, die bezüglich des Cys-264 aus Sojabohne defizient sind, besitzen innerhalb des konservierten Sequenzabschnittes an dieser Position einen Serinrest; weniger häufig ist ein Alaninrest zu finden.

Die einfachste Erklärung für die Redox-Modifizierbarkeit der Saccharose-Synthase wäre eine Konformationsänderung des katalytisch aktiven Zentrums. Da die Quartärstruktur der Saccharose-Synthase überwiegend als Tetramer beschrieben wird und auch rekombinantes SUS-Protein aus Mais in einer nativen Gelelektrophorese überwiegend als dimerer und tetramerer Enzymkomplex nachgewiesen wurde (Abb. 3.4.14); ist ein Einfluss intermolekularer Disulfidbrücken auf die katalytische Aktivität des Enzyms denkbar. Das Lösen solcher Bindungen durch Reduktion führt zu Konformationsänderungen in der Quartärstruktur des nativen Proteins. Diese Konformationsänderungen haben ihrerseits wiederum Einfluss auf die Konformation der Tertiärstruktur und auf die Kooperation zwischen den einzelnen Polypeptidketten. Native Gelelektrophorese von C352S zeigte, dass der Austausch des Cysteinrestes an Position 352 gegen einen Serinrest nicht die Di- bzw. Tetramerisierung des Enzyms blockiert (Abb. 3.4.16 A). Selbst wenn das Cystein C352 an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt sein sollte, scheint diese somit intra- und nicht intermolekular vorzuliegen. Fluoreszenzemissionsspektren von SUS-Protein in Gegenwart von reduzierenden und oxidierenden Reagenzien zeigten den deutlichen Einfluss von Oxidation auf die räumliche Struktur des SUS-Proteins (vgl. 3.4.5). In Gegenwart von Redoxreagenzien oder Saccharose wurde das Fluoreszenzemissionsspektrum von SUS-Protein zwar nicht verschoben, aber bei Inkubation mit den Oxidanzien GSSG und DTT_{ox} wurde eine Fluoreszenzlöschung beobachtet, die auf einen quencheden Einfluss neu formierter Disulfidbrücken zurückzuführen sein könnte (Abb. 3.4.18). Einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Disulfidbrücken und einer veränderten Fluoreszenz-

intensität ist aus der Literatur bekannt (HOLMGREN, 1972; GLEASON und HOLMGREN, 1981; WHITTAKER und GLEASON, 1984). Bei den *in vitro* beobachteten Redox-Effekten könnte es sich möglicherweise lediglich um Reparatureffekte bei außergewöhnlichen (Stress-) Situationen in der Zelle, nicht aber um einen Regulationsmechanismus handeln. Der Beantwortung der Frage nach der physiologischen Bedeutung einer Redoxmodulation von SUS-Spaltungsaktivität in heterotrophen Pflanzengeweben könnte mit Versuchen an pflanzlichen Protoplasten nähergerückt werden. Es müssten oxidierende bzw. reduzierende Verhältnisse in den Zellen geschaffen werden. Diese würden im Falle einer echten SUS-Redoxregulation zu veränderten Aktivitätsprofilen der Protoplasten-SUS führen. Um einen ersten Einblick in die mögliche Regulation der SUS-Enzymaktivitäten durch S-Glutathionylierung *in vivo* zu erhalten, wurden etiolierte Mais-Protoplasten mit dem membranpermeablen, Biotin-konjugiertem Glutathionester inkubiert und anschließend Veränderungen der Redox-Homöostase durch Zugabe von Oxidations- (H_2O_2 , Diamide) und Reduktionsmitteln (DTT, GSH) ausgesetzt (vgl. 3.4.7.1). Die Bildung gemischter Disulfide infolge von Thiol-Disulfidaustauschen zwischen Glutathion und Proteinen wurde immunologisch über das Biotin-Konjugat nachgewiesen.

In tierischen Zellen wurde die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten von Proteinen und GSH (Glutathionylierung) und die damit einhergehende Modulation der Proteinfunktion schon mehrfach gezeigt (COTGREAVE und GERDES, 1998; SULLIVAN et al., 2000; FRATELLI et al., 2002). Bei oxidativem Stress beeinflusst die reversible Glutathionylierung die Aktin-Polymerisationsrate in menschlichen Epidermiszellen (WANG et al., 2001). ITO et al. (2003) erbrachten erstmals den Beweis für glutathionylierte Proteine in Pflanzen. Zwei der unter Stressbedingungen in *Arabidopsis* als glutathionylierbar beschriebenen Proteine waren Schlüsselenzyme des Kohlenstoffmetabolismus (Aldolase und Triose-Phosphat-Isomerase, TPI).

Für verschiedene Proteine der etiolierten Mais-Protoplasten konnte eine Glutathionylierung durch die veränderte Redox-Homöostase infolge von Inkubation mit Diamide festgestellt werden (Abb. 3.4.23). Da die Inkubation mit osmolarem, oxidierendem Puffermedium die Vitalität der Protoplasten nicht signifikant verminderte (Abb. 3.4.22) und deutliche immunologische Signale für das proteingebundene biotinylierte Glutathion erhalten wurden, kann angenommen werden, dass eine Glutathionylierung von Proteinen in heterotrophem Gewebe *in vivo* relevant ist. Die Glutathionylierung von Saccharose-Synthase wurde mit diesem System weder eindeutig bestätigt noch widerlegt. Es wurde ein Polypeptid im Molekulargewichtsbereich von SUS detektiert (Abb. 3.4.23), außerdem wurde SUS eindeutig immunologisch in dem etiolierten Gewebe nachgewiesen (Abb. 3.4.24); eine exakte Zuordnung der erhaltenen Signale im Bereich von 90 kDa war jedoch aufgrund der unterschiedlichen Signalstärke der verschiedenen indirekten Nachweismethoden nicht möglich. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Mengen an SUS-Protein mit Volllänge in Protoplasten unter induzierten Stressbedingungen und in Kontroll-Protoplasten

vergleichbar waren. Ein beschleunigter proteolytischer Abbau infolge der veränderten Redox-Homöostase scheint nicht stattgefunden zu haben. Aus weiteren Untersuchungen *in vitro* wurde ersichtlich, dass das biotinylierte Glutathion (BioGEE) an Abbauprodukte von SUS-Protein (Abb. 3.4.26) binden kann und allein die Inkubation des Enzyms mit dem Glutathionkonjugat zur Steigerung der Saccharose-Spaltungsaktivität führt (Abb. 3.4.25). Andererseits vermochte durch Gegenwart von BioGEE ein SUS-Aktivitätsverlust infolge einer Oxidation mit Diamide nicht abgeschwächt werden (Abb. 3.4.25), was für eine wenig effiziente Bindung des Glutathionkonjugates, oder einen Effekt an einer divergenten Stelle im Enzym sprechen würde.

Geringe interne Sauerstoffkonzentrationen wurden in wachsenden Kartoffelknollen (GEIGENBERGER et al., 2000), sich entwickelnden Samen (QUEBEDEAUX und HARDY, 1976; PORTERFIELD et al., 1999; GIBON et al., 2002; ROLLETSHECK et al., 2002), Früchten (KE et al., 1995), Wurzeln (LUSHUK und SALVEIT, 1991; THOMSON und GREENWAY, 1991), und Phloem-Geweben (VAN DONGEN et al., 2003) nachgewiesen.

Die Quantifizierung der Sauerstoffgehalte innerhalb wachsender Kartoffelknollen ergab in Abhängigkeit von der Knollengröße Werte, die bis auf 2% (gegenüber 21% in der äußeren Atmosphäre) sinken können (GEIGENBERGER, 2003). Begleitet wurde das Absinken der Sauerstoffkonzentration von der Peripherie (8-10%) zum Zentrum der Knolle (2-4%) von einer abnehmenden ATP-Konzentration, einem sinkenden Stärkegehalt sowie einer Hemmung von Glykolyse und Atmung. Eine Redoxregulation im heterotrophen Gewebe wurde für die Aktivität der plastidären ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) in Kartoffelknollen beschrieben (TIESSEN et al., 2002). Die posttranslationale Redoxaktivierung der AGPase erfolgte als Reaktion auf eine steigende Verfügbarkeit von Saccharose und resultierte in einer gesteigerten Stärkesynthese sowie einem Absinken der glykolytischen Intermediatgehalte. Für die positive Korrelation zwischen Saccharosegehalt und Redoxaktivierung der AGPase wird ein zelluläres Signalsystem als ursächlich postuliert. Da die Synthese von Stärke in der Kartoffelknolle eng verbunden ist mit der SUS-vermittelten Spaltung von Saccharose, ist denkbar, dass auch die SUS-Aktivität in diesem Zusammenhang posttranslational durch Thiol-Modulation reguliert wird. Wahrscheinlicher wird diese Hypothese unter der Annahme, dass nicht nur die plastidäre AGPase redoxmoduliert wird, sondern dass dieser Mechanismus generell und damit auch für die cytosolische AGPase von Weizen und Mais (vgl. Einleitung) relevant ist. BOLOGA et al. (2003) fanden bei sinkenden Sauerstoffgehalten weniger SUS-Aktivität in der mikrosomalen Fraktion, während vergleichsweise mehr SUS-Aktivität in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden konnte. Unter der Annahme, dass die Assoziation von SUS mit der mikrosomalen Fraktion an einem Kohlenstoff-„Channeling“ für die Zellwand-Synthese (WINTER et al., 1997), womöglich durch Interaktion mit der Membran-gebundenen Cellulose-Synthase (AMOR et al., 1995), beteiligt ist, diskutierten die Autoren eine physiologische Relevanz für die Regulation der subzellulären Lokalisation in Abhängigkeit von der

Sauerstoffkonzentration (BOLOGA et al., 2003). Eine verminderte Membran-Assoziation von SUS-Protein bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen steht im Einklang mit der Inhibition der Zellwand-Biosynthese unter diesen Bedingungen (ALBRECHT und MUSTROPH, 2003) und könnte Teil einer adaptiven Reaktion sein, die zur Inhibition biosynthetischer Prozesse und damit zum Sparen von ATP bei geringen Sauerstoffgehalten führt (GEIGENBERGER et al., 2000). Eigene Untersuchungen dieser Arbeit zeigten keine augenscheinlich veränderte Aktinassoziation des SUS-Proteins in Abhängigkeit von Oxidation oder Reduktion *in vitro* (Abb. 3.4.14), weitere Untersuchungen stehen hier allerdings noch aus.

4.3 Einfluss von Phosphorylierung auf katalytische und assoziative Aktivität der SUS-Isoformen

Eine posttranslationalen Modifikation durch reversible Proteinphosphorylierung von SUS-Isoformen verschiedener Organismen, einschließlich Mais (HUBER et al., 1996), Mungbohne (NAKAI et al., 1997), Sojabohne (ZHANG und CHOLLET, 1997; KOMINA et al., 2002), Nashi-Frucht (TANASE et al., 2002), Tomate (ANGUENOT et al., 1999) und Reis (ASANO et al., 2002), wurde nachgewiesen. Als *in vivo* übergeordnet wurde die Phosphorylierungsstelle am N-Terminus (Ser-15 der SUS1-Isoform aus Mais) nachgewiesen (HUBER et al., 1996; HARDIN et al., 2003). In diesen Arbeiten wird ein regulatorischer Einfluss der reversiblen posttranslationalen Proteinphosphorylierung auf die Lokalisation von SUS postuliert. *In vivo* liegt das im Cytosol lösliche Mais-Enzym stärker phosphoryliert vor, was in einer verringerten Hydrophobizität und somit in einer vergleichsweise verminderten Membran-Assoziation resultiert (WINTER et al., 1997; ZHANG et al., 1999). Aus Hinweisen auf die weiterhin partielle Bindung der phosphorylierten, löslichen Form an das Aktin-Cytoskelett im Cytosol (WINTER et al., 1998) wurde ein Modell (WINTER und HUBER, 2000) zur Regulation und subzellulären Lokalisation der SUS aus Mais in Abhängigkeit von der Proteinphosphorylierung entwickelt (Abb. 4.1).

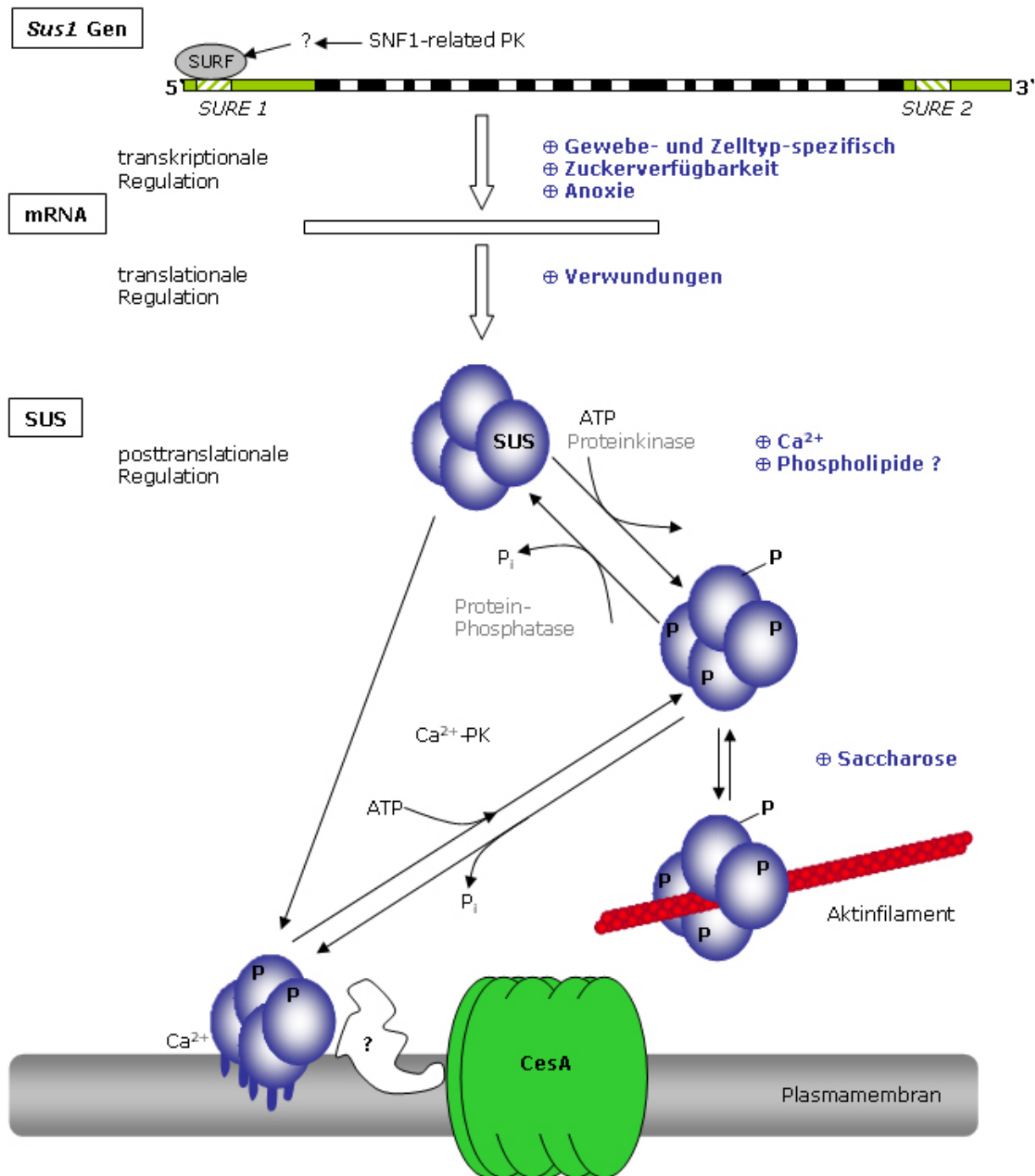


Abb. 4.1: Modell zur Regulation der subzellulären Lokalisation der Saccharose-Synthase aus Mais durch Proteinphosphorylierung. (Modifiziert nach WINTER und HUBER, 2000)

Unterschiede im Phosphorylierungsgrad von löslicher und Membran-gebundener Form konnten dagegen für SUS-Protein aus Baumwolle nicht festgestellt werden (HAIGLER et al., 2001). Eindeutige Beweise für die Steuerung der intrazellulären Lokalisation von SUS durch Phosphorylierung fehlen bislang. Über einen Einfluss der N-terminalen Phosphorylierung auf die katalytische Aktivität des Enzyms existieren ebenfalls wenig einhellige Befunde. NAKAI et al. (1997) zeigten, dass bei Einführung einer negativen Ladung (S11E und S11D) in rekombinanter, mutagenisierter SUS aus Mungbohne, ebenso wie bei *in vitro*-

Phosphorylierung des nativen Proteins aus Mungbohne, es zu einer bis zu zehnfach höheren Affinität des Enzyms zu Saccharose für die Spaltungsaktivität kam, während die Syntheseaktivität nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu konnten ZHANG und CHOLLET (1997) mit rekombinantem, mutagenisiertem oder phosphoryliertem gereinigtem Protein aus Sojabohnen keinerlei Einfluss der Phosphorylierung auf deren enzymatische Aktivität feststellen.

Wie unter 3.3.1.2 beschrieben, wurden nur geringe, physiologisch eher irrelevante Effekte der Einbringung einer negativen Ladung am Serin-15 in SUS1 aus Mais auf deren Affinität für Saccharose in der Spaltungsreaktion (vgl. Tab. 3.6) festgestellt. Untersuchungen zur Synthesereaktion erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Es scheint somit unwahrscheinlich, dass die physiologische Funktion der Phosphorylierung eine Aktivitätsänderung des Enzyms bewirkt wie z.B. bei der Saccharose-Phosphat-Synthase. Gleichermäßen wenig deutliche Effekte der negativen Ladung (SuSy-D und SuSy-E) wurden auf die Saccharose-Induzierbarkeit der Aktinbindung (vgl. 3.3.1.1) von rekombinantem SUS1-Protein beobachtet (vgl. 3.3.1.2). Dies mag daran liegen, dass für das rekombinante Enzym im Vergleich zum nativ gereinigten Protein auch in Abwesenheit von Zuckern eine signifikante Aktinbindung nachweisbar ist. *In vitro*-Phosphorylierung des rekombinanten SUS1-Proteins (SuSy-wt) sowie von Mutanten mit Alanin-Substitutionen an je einer oder beiden Phosphorylierungsstellen (Ser-15, Ser-170), zeigten keinen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Aktinbindung.

4.4 Metabolische Regulation der Aktinbindung

Neben der reversiblen Phosphorylierung der Saccharose-Synthase wurde der metabolischen Regulation der SUS-Aktin-Interaktion durch lösliche Zucker eine Rolle zugeordnet (WINTER und HUBER, 2000). Zusätzlich zum Substrat Saccharose vermögen verschiedene Di- und Trisaccharide die Assoziation von nativ gereinigtem SUS-Protein mit Aktin zu induzieren, konkurrieren aber nicht mit der Saccharose um die Bindung an das katalytische Zentrum (vgl. Tab. 3.5). Diese Befunde stehen im Einklang mit der Hypothese, dass SUS neben einer katalytischen Zucker-Bindestelle auch über eine regulatorische Bindestelle verfügt (WINTER und HUBER, 2000). Obwohl die am nativen Enzym beobachtete Zucker-Induzierbarkeit der Aktinbindung bei Verwendung von heterolog exprimiertem SUS-Protein nicht reproduzierbar war und das rekombinante Protein auch ohne Saccharose deutlich mit Aktin interagierte, konnten Hinweise auf eine verändertes assoziatives Verhalten in Anwesenheit verschiedener Metabolite gesammelt werden. Bedingungen, die die Spaltungsaktivität von SUS begünstigen (Saccharose, UDP), erhöhten die Menge an assoziiertem Protein, während die zusätzliche Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors der katalytischen Aktivität (Arbutin) einen gegenläufigen Effekt zeigte (vgl. Tab. 3.7). Eine vermehrte Assoziation von SUS mit Elementen des Cytoskeletts bei optimaler Metabolitversorgung könnte physiologisch relevant sein. Da die Saccharose-Synthase in heterotrophem Gewebe am respiratorischen

Stoffwechselweg zur Bereitstellung von Energie beteiligt ist, aber auch ein beträchtlicher Anteil der importierten Saccharose für die Synthese von Strukturglukanen der Zellwand aufgewendet werden muss, könnte die Verfügbarkeit von Substraten und Metaboliten ausschlaggebend für die Regulation der subzellulären Lokalisation sein. Die Saccharose-Synthase könnte bei Assoziation mit Cytoskelett-Elementen effektiv Metabolite an die Cellulose- oder Callose-Synthase, für die ebenfalls eine Interaktion mit den Elementen des Cytoskeletts postuliert wird, weiterleiten. Denkbar wäre allerdings auch eine Inaktivierung des Enzyms infolge der Aktinbindung mit dem Resultat der vorübergehend verminderten Saccharose-Spaltung ohne die Notwendigkeit eines proteolytischen Proteinabbaus. Um eine dieser Thesen festigen zu können, wurde der Einfluss der Aktinbindung auf die katalytische Aktivität von SUS untersucht. Aktin-assoziiertes SUS-Protein besaß katalytische Aktivität. Sowohl für nativ gereinigtes, als auch für rekombinantes SUS-Protein wurde eine Steigerung der Spaltungsaktivität in Gegenwart von Aktin festgestellt (vgl. 3.3.1.4). Somit scheint die These eines gezielten Substrat-„Channeling“ von SUS in bestimmte Stoffwechselwege bei Assoziation mit Cytoskelett-Elementen eher wahrscheinlich. Ferner vermochte die Aktinbindung das SUS-Protein nicht vor Inaktivierung durch Arbutin zu schützen. Diese Beobachtungen könnten Hinweise auf die Divergenz der katalytischen Bindestelle und der Aktin-bindenden Domäne von SUS sein. Ungeklärt ist allerdings, ob die Bindung von SUS-Enzym, welches durch Oxidation oder durch Arbutin katalytisch inaktiv wurde, als ein Artefakt des rekombinanten Proteins anzusehen ist oder hier eine weitere Regulationsebene zum Tragen kommen könnte. Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde sind mit neusten Literaturdaten verträglich. Ergebnisse von MATIC et al. (2004) zeigten, dass Aktin mit zwei SUS-Isoformen aus Tabakzellen interagiert, aber die katalytische Aktivität der Isoformen unterschiedlich beeinflusst. Während für die katalytisch wenig aktive Isoform (SuSy1) in Gegenwart von Aktin eine zunehmend verringerte Enzymaktivität verzeichnet wurde, zeigte die Isoform mit höherer Grundaktivität (SuSy2) eine zusätzliche katalytische Aktivierung. Hinweise auf eine metabolische Regulation erhielten die Autoren, indem die Grundaktivität und die in Gegenwart von Aktin stimulierte Enzymaktivität der SuSy-2-Isoform durch mikromolare Konzentrationen von Fructose-2,6-bisphosphat, einem Signalmolekül im Kohlenhydratstoffwechsel, nochmals weiter gesteigert werden konnte.

4.5 Identifizierung der potentiellen Aktinbindestelle der Saccharose-Synthase

Die regulierte Bildung von Aktinfilamenten sowie die Anordnung und Umstrukturierung dieser Filamente in Bündel und Netzwerke ist für Zellgestalt, -teilung und -dynamik aller eukaryotischen Zellen unentbehrlich (vgl. 1.3.1). Die Formierung des Aktins und die Lokalisation der Filamente im Aktin-Cytoskelett wird durch Aktin-Bindeproteine (ABPs) initiiert, die ihrerseits durch intra- und extrazelluläre Signale reguliert werden. Einige ABPs haben eine Aktinbindestelle, deren Aminosäuresequenz zur Sequenz einer der vier Aktin-Bindestellen (TELLAM et al., 1989) homolog ist. Ein solches Motif kann Proteine befähigen, mit Aktin um die Filamentbildung zu konkurrieren oder an andere ABPs zu binden. Die Saccharose-Synthase wurde als pflanzenspezifisches ABP identifiziert (WINTER et al., 1998). Der Vergleich der Aminosäuresequenz der Saccharose-Synthase mit anderen bekannten ABPs zeigte in der SUS-Sequenz Abschnitte mit Homologien zu vielen pflanzlichen und tierischen ABPs, darunter auch Aktin, Aldolase sowie das Arp2-Protein des Arp2/3-Komplexes (Abb. 3.3.8). Co- und Post-Polymerisationsversuche von Aktin und synthetischen Peptiden, die von STEVEN C. HUBER (NCSU, Raleigh; Urbana) analog zu den identifizierten Sequenzabschnitten synthetisiert wurden, zeigten für einige dieser Peptide eine deutliche Aktin-Binde- oder Aktin-Bündelfähigkeit (Abb. 3.3.10). Sowohl in Untersuchungen nur mit Aktin und synthetischen Peptiden als auch in Kompetitionsstudien in zusätzlicher Gegenwart von nativ gereinigtem SUS-Protein, deutete sich eine besondere Spezifität des zu Aktin und Arp-Proteinen homologen Sequenzbereiches der Saccharose-Synthase (Abb. 4.2) an.

Speziell die Peptide SuSpH und SS12 vermochten nicht nur Aktin in geringen molaren Verhältnissen vollständig zu bündeln, sondern assoziierten auch selbst mit dem SUS-Protein in Kompetitionsversuchen, während ein zu SS12 ähnliches Peptid (SS18) mit Homologie zu Mais-Aktin und SUS eine vergleichsweise geringe assoziative Aktivität zeigte (Abb. 3.3.13). Der Arp2/3-Komplex ist ein beständiger Proteinkomplex, der aus sieben Protein-Untereinheiten besteht. Zwei dieser Untereinheiten sind die Arp-Proteine (Actin-related-protein) Arp2 und Arp3. Die Arp-Proteine sind in allen eukaryotischen Zellen konserviert. Studien haben gezeigt, dass die Anordnung und der Erhalt zahlreicher aktinestützter Strukturen in der Zelle, also die Kontrolle der Aktin-Polymerisation, von der Aktivität der Arp-Proteine Arp2 und Arp3 abhängig ist. Der Arp2/3-Komplex ist befähigt, die Nukleation neuer Aktinfilamente zu initiieren, an bereits bestehende Aktinfilamente in einem bestimmten Winkel seitlich („branching“) oder endständig („capping“) zu binden und Aktinfilamente zu dichten Netzen oder lockeren Maschen anzuordnen („crosslinking“) (MACHESKY und GOULD, 1999).

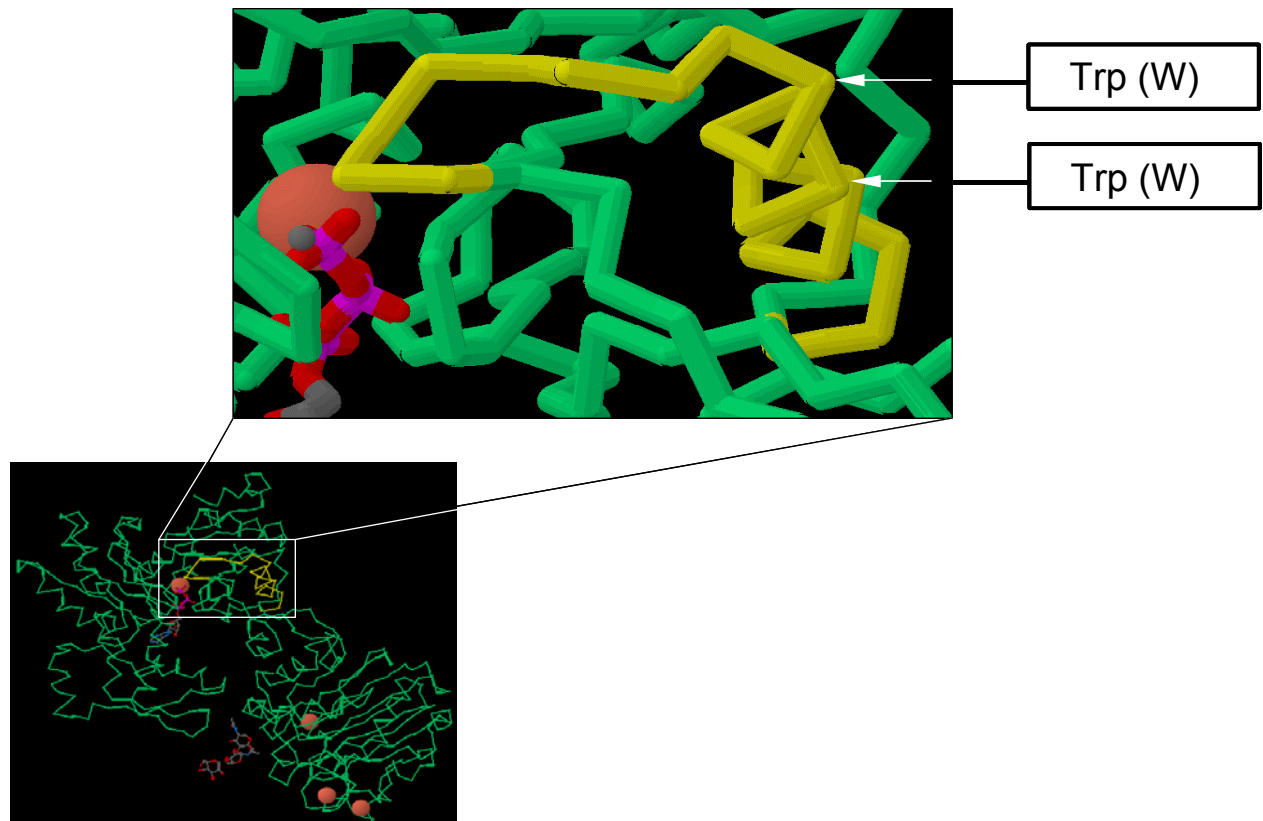


Abb. 4.3: 3D-Struktur des Aktin-DnaseI-Komplexes (Cn3d, NCBI) (Lorenz et al., 1993).

DnaseI bindet monomeres Aktin. Der zur Saccharose-Synthase homologe Sequenzabschnitt des Aktins stellt eine Helix dar und ist gelb hervorgehoben. Die weißen Pfeile in der Vergrößerung markieren die Positionen der Tryptophane (W) in der Aktinsequenz.

Die Substitution von jeweils einer Aminosäure (Glutamat, Arginin oder Tryptophan) im rekombinanten SUS1-Protein gegen Alanin genügte nicht, um die SUS-Aktinbindung *in vitro* signifikant zu inhibieren (Abb. 3.3.1.16). Ursächlich hierfür kann zum einen sein, dass die angenommene Aktinbindedomäne nicht mit der tatsächlichen Bindedomäne übereinstimmt. Anders als bei der Aktinbindedomäne in tierischer Aldolase könnten aber auch einzelne Aminosäuren nicht ausreichend Einfluss auf die Interaktion haben. Immunologische Untersuchungen der Aktin-gebundenen und löslichen Fraktion von nativer SUS bestätigten die Annahme, dass die Aktinbindedomäne der Saccharose-Synthase innerhalb des N-terminalen Proteinbereichs von etwa 450 Aminosäuren lokalisiert sein muss (Abb. 3.3.13).

Subklonierungen einzelner Domänen von SUS und Expression der rekombinanten Peptide oder Enzymfragmente, die durch tryptischen Verdau generiert werden, könnten bezüglich ihrer Aktinbindefähigkeit untersucht werden und zu einer detaillierteren Identifizierung der Aktinbindedomäne in SUS dienen.

4.6 Die mögliche Assoziation von SUS mit Membranproteinen

Die Aktivität der Saccharose-Synthase ist essentiell für die Zellwandsynthese. Möglicherweise ist bei der Zellulosesynthese die Aktivität der membranassoziierten SUS maßgeblich. UDP-Glucose, als Produkt der SUS-vermittelten Saccharosespaltung stellt

außerdem das Substrat für die Callose-Synthase dar. Eine direkte oder eine indirekte, proteinvermittelte Interaktion der Saccharose-Synthase mit der Cellulose- oder Callose-Synthase wird allgemein postuliert (ROBINSON, 1996; Delmer, 1999) Beweise fehlen jedoch bislang. Zunehmende SUS-Aktivität in Wurzeln aus Weizen korreliert mit einem steigenden Cellulosegehalt und mit Änderungen der Zellwandstruktur (ALBRECHT et al., 2000). Ferner korreliert auch das Ablagerungsmuster der Mikrofibrillen mit den Regionen hoher SUS-Aktivität (ALBRECHT und MUSTROPH, 2003). Dem pflanzlichen Cytoskelett wird seit langem eine Rolle bei der Cellulose-Synthese zugeschrieben. Verschiedene Studien weisen auf die Beteiligung der kortikalen Mikrotubuli bei der geordneten Ablagerung der Mikrofibrillen in der Zellwand hin (als Überblick BASKIN, 2001). Baumwollfasern und Tracheen-Elemente von *Zinnia*, bei denen die Organisation entweder der Mikrotubuli oder der Aktinfilamente zerstört wurde, zeigten ein wirres, unorganisiertes Muster der abgelagerten Cellulose-Mikrofibrillen, was darauf schließen ließ, dass auch das Aktin-Cytoskelett an der gerichteten Ablagerung der Fibrillen beteiligt ist (SEAGULL, 1990). Aktin könnte an der Organisation der kortikalen Mikrotubuli beteiligt sein, die ihrerseits die Ablagerung der Cellulosefibrillen organisieren (DELMER und AMOR, 1995). In einem neueren Modell wird postuliert, dass ein Gerüst aus Polysacchariden der Zellwand und Membranprotein in direkter Assoziation mit Mikrotubuli die Orientierung der Mikrofibrillen in der Zellwand bestimmen (BASKIN, 2001). Eine direkte Assoziation der Cellulose-Synthase (CesA) mit den Mikrotubuli erscheint dabei sehr wahrscheinlich (MIZUNO, 1996). Eluatfraktionen einer mit solubilisierten Plasmamembran-Fragmenten beladenen Anti-Tubulin-Affinitätsmatrix enthielten granuläre Strukturen, die in Anwesenheit von UDP-Glucose und Mg^{2+} , (1,4)- β -Glucan produzierten (Mizuno, 1996). Die Dissoziation dieser granulären Strukturen resultierte in acht Polypeptiden, von denen zwei als α - und β -Tubulin identifiziert wurden (MIZUNO, 1996) und drei Polypeptide mit Molekulargewichten von 120 kDa, 93 kDa und 65 kDa, möglicherweise Untereinheiten der CesA, Saccharose-Synthase und des Korrigens repräsentieren könnten.

Da Interaktionen von Membranproteinen mit den herkömmlichen Hefe-2-Hybrid-Systemen nicht nachweisbar sind, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt, um die direkte oder indirekte Interaktion von CesA mit SUS zu charakterisieren. Zum einen wurde eine vermutlich cytosolisch lokalisierte Domäne (HVR) der Cellulose-Synthase heterolog exprimiert und für eine Affinitätschromatographie mit geklärtem Rohextrakt aus Mais verwendet. Die Funktion der pflanzenspezifischen HVR-Domäne ist ungeklärt, ZHONG et al. (2003) postulierten jedoch die Beteiligung an Interaktionen mit cytosolischen Proteinen. Eine Assoziation der Saccharose-Synthase, speziell der SUS1-Isoform, mit der HVR-Affinitätsmatrix konnte immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3.2). Somit ist naheliegend, dass die HVR-Region der CesA an der Interaktion mit SUS beteiligt ist. Da jedoch weitere Polypeptide, die nicht durch Peptid-Sequenzierung identifiziert wurden, eine spezifische Bindung an die Affinitätsmatrix zeigten, bleibt ungeklärt, ob die HVR-vermittelte Interaktion von SUS und CesA direkt ist oder durch weitere proteinogene Bindepartner

vermittelt wird. Die Reporterogenaktivität infolge einer Hefe-2-Hybrid-Analyse mit dem HVR-*Bait* und dem *SUS1-Prey* macht eine direkte Interaktion wahrscheinlich (Tab. 3.13), besonders vor dem Hintergrund, dass für einen Callose-Synthase-Komplex eine direkte Interaktion mit einer UDP-Glucose-Transferase bestätigt wurde (HONG et al., 2001).

Die Transformation etiolierter Mais-Protoplasten mit einem *SUS*-GFP-Fusionsprotein-konstrukt sollte dazu dienen, die subzelluläre Lokalisation von *SUS in situ* zu visualisieren. Ausgehend von der These, dass zellwandlose Protoplasten bei guter Kohlenstoffversorgung rasch mit der Neu-Synthese der Zellwand beginnen und *SUS* das Substrat UDP-Glucose bereitstellt, wurde die Akkumulation der Fluoreszenz im Zellwandbereich erwartet. Konfokale Laserscan-Mikroskopie transformierter Protoplasten zeigte jedoch keine spezifische Fluoreszenzakkumulation in der Zellperipherie, sondern eine subzelluläre Lokalisation an Organellen. Bei diesen Organellen könnte es sich um Golgi-Vesikel oder Amyloplasten handeln. BUCKERIDGE et al. (1999) beschreiben das Vorkommen von *SUS*-Protein in der mit Golgi-Membran angereicherten Proteinfraction aus Mais-Koleoptilen, eben dem Gewebe, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Isolierung von Protoplasten verwendet wurde. Während Cellulose durch den Plasmamembran-ständigen Cellulose-Synthase-Komplex synthetisiert wird, findet die Bildung von Hemicellulose und den Pektin-Polysacchariden am Golgi-Apparat statt (DOBLIN et al., 2002; RIDLEY et al., 2001; REITER, 2002). Die Annahme eines direkten Substrat-„Channeling“ von *SUS* in die Cellulose-Synthase kann jedoch trotzdem nicht abgelehnt werden. Die isolierten und transient transformierten Protoplasten enthielten, da sie aus Wildtyp-Pflanzen generiert wurden, große Mengen *SUS*-Protein (Abb. 4.3.24). Verschiedene Autoren geben für *SUS* einen Proteinanteil von 3-8% im heterotrophen Gewebe an, so dass wahrscheinlich das konstitutiv exprimierte fluoreszierende Fusionsprotein nur sehr wenig oder gar nicht am Metabolismus der Zelle partizipiert. Die Retransformation von *SUS*-defizienten Mais-Protoplasten wäre hier von größtem Interesse. Durch Doppeltransformation mit lokalisiertem XFP (Golgi, ER, PM, cytosolisch) könnte die subzelluläre Lokalisation der Saccharose-Synthase sowie der zeitliche Verlauf der Lokalisation untersucht werden. Ebenso sollte ein Vergleich mit *SuS3*- oder *SH1-YFP*-Konstrukten durch Doppelmarkierung zukünftig untersucht werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss verschiedener Entwicklungsstadien und Faktoren (z.B. Saccharose, Cytokinin) auf die Lokalisation untersucht werden.

Da eine stabile Transformation von Maispflanzen ein mehrjähriger Prozess ist, der nicht durchgeführt werden konnte, wurden als genetischer Hintergrund für die Untersuchung der Lokalisation und deren physiologischer Funktionen *Arabidopsis*-Pflanzen nach "SUS-Knockout"-Mutanten durchsucht. Diese K.O.-Mutanten hätten dann mit *SUS*-GFP-Konstrukten oder/und mutagenisierten *Sus*-Genen transformiert werden können; aufgrund der vermutlichen Existenz von sieben *Sus*-Genen in *Arabidopsis* wurde dieser Ansatz jedoch ohne befriedigendes Ergebnis verworfen.

4.7 Identifizierung proteinogener Bindepartner mit dem 2-Hybrid-System

Die Formierung kooperierender Proteine zu makromolekularen Komplexen ist im zellulären Metabolismus von zentraler Bedeutung. Die räumliche und zeitliche Organisation von Enzymen ermöglicht im Gegensatz zur freien Diffusion ein effizientes, sogenanntes „Metabolit-Channeling“ zwischen den partizipierenden Proteinen des Metabolons. Für glykolytische und andere Zucker-metabolisierende Enzyme aus tierischen Zellen wurde die räumliche Organisation am Cytoskelett bereits gezeigt (Masters, 1996; Knull und Walsh, 1992) und auch aus pflanzlichen Zellen ist der Transfer von Intermediaten innerhalb assemblierter Enzymkomplexe bekannt (zur Übersicht WINKEL, 2004). Obwohl die Saccharose-Synthase als aktinbindendes Protein identifiziert wurde (WINTER et al., 1998) und für Mais-Endosperm in der Cytoskelettfraktion das Vorkommen von Kohlenhydrat-metabolisierenden Enzymen, darunter die Saccharose-Synthase, beschrieben wurde (AZAMA et al., 2003), gibt es bislang noch relativ wenige Befunde für die Assoziation von löslichen Enzymen mit dem pflanzlichen Cytoskelett. Mechanismus, Regulation und Organisation dieser Assoziation sind noch weitgehend ungeklärt.

Hefe-2-Hybrid-Analysen wurden durchgeführt, um interagierende Proteine des anaeroben Gewebes von Maiskeimlingen zu identifizieren. Die Durchmusterung einer cDNA-Bank mit verschiedenen *SUS-Bait*-Konstrukten sollte Isoform-spezifische Bindepartner identifizieren und somit Hinweise auf spezielle Funktionen der Isoformen liefern. Darüber hinaus wurde diese *in vivo*-Methode gewählt, um die bislang nur *in vitro* nachgewiesene direkte *SUS*-Aktin-Bindung zu verifizieren, eine Fokussierung auf die physiologische Rolle der Kompartimentierung von *SUS* vorzubereiten und einen globaleren Einblick in die Identität und Organisation von Aktinbindeproteinen in pflanzlichem Gewebe zu erhalten. Als *Bait*-Konstrukt für die Durchmusterung diente Mais-Aktin, dessen cDNA aus anaerobem Gewebe nach RT-PCR amplifiziert wurde. Insgesamt konnten durch die Hefe-2-Hybrid-Analysen zahlreiche neue mRNA-Sequenzen aus Mais identifiziert werden, von denen 30 als Datenbankeinträge (GenBank) veröffentlicht wurden (vgl. Anhang).

4.7.1 Identifizierung proteinogener Bindepartner der Saccharose-Synthase

Die Analyse der positiven Klone, die mit dem Hefe-2-Hybrid-System als Bindepartner der Isoformen SH1 und SUS1 erhalten wurden, ergab unter anderem die molekulare Identifizierung einer bisher unbekanntem dritten *SUS*-Isoform (SuS3: GenBank: AY124703), die sowohl mit SUS1 als auch mit SH1 interagiert (vgl. 3.5.3). Die Primärsequenz dieser Isoform ist den Saccharose-Synthasen aus Dikotyledonen ähnlicher als ihren Paralogen aus Mais oder anderen Monokotyledonen (vgl. Anhang). Die biochemische Charakterisierung der SuS3-Isoform zeigte *in vitro* katalytische Parameter und mögliche postranslationale Modifikationseigenschaften, die mit der SUS1-Isoform vergleichbar waren (vgl. 4.1 und 4.2). Interessanterweise wurden in den verschiedenen Ansätzen keine Interaktion von SUS1

und SH1 untereinander nachgewiesen. Ebenso wurde in keinem der SUS-Screens eine Homodimerisierung oder Homotetramerisierung des Enzyms festgestellt.

Insgesamt erbrachte der Einsatz des SH1-Baits vergleichsweise wenige positive Interaktionspartner, was vermutlich mit der schwachen Expression des *Bait*-Konstruktes in Hefen im Zusammenhang steht. Im Gegensatz zu Expressionsversuchen in *E. coli* genügte die Ausbeute jedoch für die Durchführung der standardisierten Hefe-2-Hybrid-Methode. Die Primärsequenzanalyse der positiven SH1-Interaktionspartner (Tab. 3.18) führte zu keiner eindeutigen Identifizierung von bekannten Maisproteinen der Datenbank als Bindepartner des Proteins. Auf der Grundlage von Alignments wurden jedoch zum Teil hohe Homologien zu Proteinen anderer Organismen oder zu Maisproteinen festgestellt. Die 63%-ige Identität zu Myosin XI aus Mais auf Proteinebene deutet zum einen auf die subzelluläre Lokalisation von SH1-Protein in unmittelbarer Nähe des pflanzlichen Cytoskeletts hin, zum anderen deutet die lediglich 63%-ige Identität auf die Existenz weiterer, bislang unidentifizierter Myosine hin. MEAGHER und FECHHEIMER (2004) postulieren für *Arabidopsis* eine cytosolische Myosin-Proteinfamilie mit mindestens 20 Mitgliedern.

Für SUS1 wurde ein Klon mit Ähnlichkeit zu α -Tubulin sowie ein Protein mit 61% Homologie zu einem Aktin-Depolymerisierungsfaktor (ZmADF3) als Bindepartner identifiziert. Auch hier deuten die Ergebnisse auf die lückenhafte Kenntnis von Proteinen des pflanzlichen Cytoskeletts hin. Die vollständige Sequenzierung des Maisgenoms wird in kommenden Jahren die molekulare Grundlage für die Identifizierung erleichtern. Eine direkte Interaktion von rekombinantem SUS1-Protein und Tubulin aus Rinderhirn wurde *in vitro* bestätigt (vgl. 4.8.1). Das Protein mit dem Datenbankeintrag DANA (Klon SuSy-95; SuSy-20) hat gewisse Ähnlichkeit zu Extensinen und/oder Arabinogalactan-Proteinen (AGP) anderer Pflanzen. Die genaue Funktion von AGPs ist bislang unklar, jedoch wird den Proteinen eine Beteiligung bei der Zellelongation zugesprochen. PARK et al. (2003) postulierten, dass AGPs das Bindeglied zwischen Mikrotubuli und Cellulosemikrofibrillen darstellen könnten. WASTENEYS (2004) nimmt gleich eine ganz Reihe von Proteinen als Mediatoren für die Interaktion von Mikrotubuli mit Plasmamembran an. Für die SuS3-Isoform wurde ein Klon mit einem hohen Glycinanteil und Ähnlichkeit zu menschlichem Collagen-Protein identifiziert. Mittels *in-silico*-Analyse von unterschiedlich exprimierten Genen mit unbekanntem Funktionen identifizierten MANFIELD et al. (2004) eine putative Glycosyltransferase und ein Kollagen-ähnliches putatives Zellwand-Protein (Collagen-like) aus *Arabidopsis*. Sowohl die SUS1-Isoform als auch die SuS3-Isoform interagierten mit Proteinen, die vermutlich für Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen codieren. Die Identifizierung dieser Bindepartner steht in guter Übereinstimmung mit der bekannten Proteinphosphorylierung von SUS *in vivo* (HUBER et al., 1996). Wider Erwarten wurde keine Sequenz identifiziert, die eindeutig mit der SUS-phosphorylierenden, calciumabhängigen Proteinkinase (CDPK) übereinstimmt. Die Identität zu den CDPKs betrug etwa 35% auf Proteinebene. Gehäuft wurden Sequenzen identifiziert, die für eine putative SnRK1 (SNF1-related Protein Kinase) codieren. Im Falle von SuS3

wurde diese putative Kinasesequenz sogar am häufigsten isoliert (vgl. Tab. 3.20). Diese Befunde untermauern grundsätzlich die Ergebnisse der *in vitro*-Phosphorylierung eines zu SuS3 korrespondierenden Peptids (vgl. 4.1.3) und deuten darauf hin, dass auch SuS3 posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert werden kann. Neben der calcium-abhängigen Phosphorylierung wurde eine vermutlich SnRK-vermittelte Phosphorylierung für SUS-Protein aus Mais nachgewiesen (HARDIN et al., 2003) und auch auf transkriptionaler Kontrolle ist die Beteiligung einer SnRK1 an der Expression von SUS-Proteinen weitgehend akzeptiert.

Weiterhin übereinstimmend wurden für SUS1 und SuS3 eine cytosolische Glutathion-Peroxidase (cGPx), verschiedene Proteine des Ubiquitin/26S-Proteasom-Komplexes und Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus als mögliche Bindepartner gefunden. Die Mehrheit dieser im Hefe-2-Hybrid-System mit SUS interagierenden Proteine war in Mais bislang unbekannt und wurde nach konzeptioneller Translation und Aminosäuresequenzvergleich von hochkonservierten Domänen identifiziert. Die Enzymfunktion der putativen Glutathion-Peroxidase-Sequenz wurde biochemisch nachgewiesen und die mögliche Interaktion mit der Saccharose-Synthase *in vitro* untersucht (vgl. 4.8.3).

Identifizierung von Proteinen des Ubiquitin/26S-Proteasom-Komplexes

Die Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen des Ubiquitin/26S-Proteasom-Komplexes und einem *Bait*-Protein im Hefe-2-Hybrid-System wird im Allgemeinen als falsch positive Interaktion gewertet, da diese aufgrund der Fehlfaltung des *Bait*-Proteins entstanden sein könnte. Im Zusammenhang mit der Verwendung der SUS-*Bait*-Proteine könnte es sich aber um physiologisch relevante Interaktionen handeln (vgl. Einleitung). Proteasomen (20S) und Proteasom-Regulatorkomplexe (26S) aus Prokaryoten- und Eukaryoten-Proteasomen sind hochmolekulare, selbstkompartimentierende Proteasen, die am Ubiquitin-abhängigen Abbau von Proteinen beteiligt sind. Der selektive Abbau von Proteinen (Proteolyse) wird in der Zelle primär benötigt, um fehlerhafte Proteine zu entfernen und um Proteine abzubauen, die nur kurzzeitig wirken sollen. Wichtige Beispiele für solche Proteine sind Zellzyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren und Signalvermittlungsproteine. In eukaryotischen Zellen werden Proteine zunächst durch Verknüpfung mit dem kleinen Protein Ubiquitin markiert und anschließend von einer Protease, dem 26S-Proteasom, abgebaut. Die Anheftung von Ubiquitin an Substratproteine wird von einem komplexen, hierarchisch aufgebauten System verschiedener Enzyme vermittelt. Ein Ubiquitin-Aktivierungsenzym (E1) „aktiviert“ Ubiquitin unter ATP-Verbrauch, Ubiquitin-Konjugationsenzyme (E2) vermitteln den Transfer von Ubiquitin zu den Ubiquitin-Ligasen (E3), die direkt mit den Substraten interagieren. Mit dem Hefe-2-Hybrid-System wurden mehrere Bestandteile dieses komplexen Ubiquitin-/Proteasom-Systems als mögliche Bindepartner der Saccharose-Synthase identifiziert. Die biochemische Verifizierung der Interaktionen von SUS mit Proteinen des 26S-Proteasom-Regulatorkomplexes wurde im

Rahmen dieser Arbeit nicht angestrebt, sondern sind Teil der aktuellen Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe von Steven C. Huber. Die Phosphorylierungsstelle am Serinrest 170 (Ser-170) von SUS aus Mais scheint an der posttranslationalen Regulation der Proteinstabilität von SUS beteiligt zu sein (HARDIN et al., 2003; HARDIN und HUBER, 2004). An der heterotrophen Basis junger Maisblätter hat SUS mit 3-8% einen sehr hohen Anteil am Gesamtproteingehalt (NGUYEN-QUOC et al., 1990). Beim Übergang zum autotrophen Wachstum und beim Ergrünen der Pflanze wird SUS-Protein schnell Proteasom-vermittelt degradiert (HARDIN et al., 2003). Physiologisch ist diese posttranslationale Modifikation mit dem entwicklungsbedingten Wechsel („Sink“- zu „Source“-Gewebe) zwischen der notwendigen Aktivität Saccharose-spaltender (SUS) und Saccharose-synthetisierender Enzyme, wie z.B. der SPS zu erklären. Während die SPS zunehmend akkumuliert wird SUS-Protein proteolytisch abgebaut.

Die Menge Membran-gebundener Saccharose-Synthase in Regionen mit aktiven Zellwand-Ablagerungen könnte ebenso durch Proteolyse reguliert sein, um eine unangemessene Weiterleitung von Kohlenstoffgerüsten in Zellwandmaterial in Perioden von Saccharose-Limitierung zu verhindern (HARDIN und HUBER, 2004). Die Untereinheit der Cellulose-Synthase GhCesA1 aus Baumwollfasern hat eine kurze Lebensdauer *in vivo*. Ein kontrollierter „turnover“ von CesA wird als möglicher Mechanismus zur Regulation der Cellulose-Synthese angenommen (KUREK et al., 2002). Zusätzlich zeigt das GhCesA1 ein RING-Finger-Motiv, welches dem Protein ermöglicht, als eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase zu fungieren (KUREK et al., 2002) und seine eigene Degradation vornehmlich unter Einbeziehung des 26S-Proteasoms zu initiieren. Diese potentielle Proteinaktivität von GhCesA1 wurde bislang nicht gezeigt, aber HARDIN und HUBER (2004) spekulieren, dass eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligaseaktivität von GhCesA1 Membran-gebundenes SUS-Protein in Abhängigkeit von der Phosphorylierung am Serinrest 170 ubiquitinylieren könnte. Durch Proteolyse könnte eine koordinierte Regulation der Aktivitäten beider Enzyme, SUS und CesA, erfolgen und somit effizient das Substrat-„Channeling“ in die Zellwandsynthese steuern (HARDIN und HUBER, 2004). Diese Spekulation basiert allerdings bislang nur auf der Beteiligung beider Proteine an der Cellulose-Synthese und ihrer vermutlich nahen Lokalisierung an der Zellperipherie (HAIGLER et al., 2001; DOBLIN et al., 2002).

In Mais wurden bislang sechs Stärke-Synthasen (SS) auf biochemischer oder molekularer Ebene identifiziert, von denen mindestens fünf im Endosperm exprimiert werden (CAO et al., 2000). Zwei Stärke-Synthasen, SSI und SSII werden als lösliche Enzyme im Plastiden beschrieben. Da die SSII aus Mais neben einer hohen Affinität für ADP-Glucose auch eine geringe Affinität für UDP-Glucose, dem Produkt der SUS-vermittelten Saccharose-Spaltung besitzt, und SUS neben UDP-Glucose auch ADP-Glucose in geringen Mengen synthetisieren kann, wäre grundsätzlich naheliegend, dass die SS mit SUS interagiert. Aufgrund der plastidären Lokalisation der SS und der cytosolischen Lokalisation von SUS ist diese Interaktion jedoch als ein Artefakt des Hefe-2-Hybrid-Systems zu werten. APGase-Aktivität

wurde zwar für Mais im Cytosol nachgewiesen, ein Vorkommen von SS außerhalb der Plastiden hingegen bislang nicht.

UDP-Glc:Protein-Transglucosylasen (UPTG) sind autokatalytische Glycosyl-Transferasen, die zunächst als „Protein-Primer“ für die Stärkebiosynthese in Kartoffelknollen und Mais-Endosperm angesehen wurden (ROTHSCHILD et al., 1996). UPTG kann reversibel durch UDP-Glucose, UDP-Xylose oder UDP-Galalaktose *in vitro* glycosyliert werden. Analysen von Datenbanken zeigten später hohe Identitätsgrade zu pflanzlichen Sequenzen, die für Proteine mit apparenter Lokalisation an der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates und an Plasmodesmata codierten. Die biochemischen Eigenschaften der UPTG und das Fehlen eines Signalpeptids, welches die Kompartimentierung des Proteins im Plastiden ermöglichen würde, sprechen gegen die postulierte Rolle der UPTG bei der Synthese von Stärke. Vielmehr wird auf eine Beteiligung des Proteins bei der Biosynthese von Polysacchariden der Zellwand verwiesen (BOCCA et al., 1999). Die Saccharose-Synthase könnte bei direkter Assoziation effektiv UDP-Glucose als Substrat an die UPTG weiterleiten. Möglich wäre, dass beide Proteine am Golgi-Apparat lokalisiert sind. Im Mais-Endosperm wurde ein UPTG-Inhibitorprotein (IP) identifiziert, welches zum einen nicht die katalytische Aktivität der UPTG inhibiert und gleichzeitig mit SUS-Protein in der Anionenaustauschchromatographie co-eluiert (WALD et al., 1998). Aufgrund von ähnlichen Eigenschaften des Inhibitor-Proteins und der Saccharose-Synthase vermuteten die Autoren, dass IP eine Form der Saccharose-Synthase ist, und postulierten eine neue biologische Aktivität der Saccharose-Synthase, die bislang nicht bestätigt wurde.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde mit dem Hefe-2-Hybrid-System keine Interaktion von SUS-Protein mit Aktin identifiziert. Ebenfalls wurde kein für eine SUS-Isoform codierendes *Prey*-Plasmid beim Durchmustern der cDNA-Bank mit dem Aktin-*Bait* isoliert. Ein Grund für die verfehlte Detektion dieser aus *in vitro*-Versuchen bekannten Wechselwirkung könnte die relative Menge an SUS-codierenden Klonen in der cDNA-Bank im Vergleich zu Aktin-bindenden Proteinen sein. Alternativ ist jedoch auch möglich, dass im Hefe-System während des Versuches nicht die optimalen Bedingungen für die transiente Assoziation der Proteine herrschten. In einem direkten Verpaarungsversuch interagierten SUS-*Prey* und Aktin-*Bait* (vgl.3.5.4). Die vergleichsweise schwache Reporterogenaktivität weist auf eine sensitive Regulation der Assoziation hin, was in guter Übereinstimmung mit *in vitro*-Studien steht, die die reversible Proteinphosphorylierung und/oder ein metabolisches „signaling“ als Teil des Regulationsmechanismus postulierten (WINTER et al., 1998; WINTER und HUBER, 2000).

4.7.2 Identifizierung proteinogener Bindepartner von Mais-Aktin

Die Wechselwirkung zwischen glykolytischen Enzymen sowie deren transiente Assoziation mit subzellulären Strukturen ist in tierischen Systemen, vor allem im Muskelgewebe, seit langem Gegenstand der Forschung. Nachdem zunächst die Interaktion von Aldolase und

Phosphofruktokinase (PFK) (ARNOLD und PETTE, 1968) mit Aktinfilamenten in Muskelzellen beschrieben wurde und die Interaktion der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit dem Cytoskelett in Neuronen nachgewiesen wurde (CLARKE und MORTON, 1982; KNULL, 1980), erfolgte die Entwicklung eines Modells zur räumlichen und zeitlichen Organisation von glykolytischen Enzymen an Aktinfilamenten (MASTERS et al., 1987). Demnach könnte die Kompartimentierung einzelner Enzyme oder ganzer Enzymaggregate an Aktinfilamenten ein effizientes „Metabolit-Channeling“ ermöglichen. In pflanzlichen Zellen wurden bislang vergleichsweise wenige Cytoskelett-assoziierte Proteine identifiziert und charakterisiert, jedoch häufen sich zunehmend Hinweise für die Interaktion von Enzymen der Glykolyse und des Kohlenhydratstoffwechsels mit dem pflanzlichen Cytoskelett. So wurde die Bindung glykolytischer Enzyme in der partikulären Fraktion von Speicherwurzeln in Abhängigkeit vom metabolischen Zellstatus postuliert (MOORHEAD und PLAXTON, 1988) und im Mais-Endosperm das Vorkommen der GAPDH, Aldolase und Saccharose-Synthase in der Cytoskelett-Fraktion dokumentiert (AZAMA et al., 2003). Erst kürzlich publizierten CHUONG et al. (2004) die erste weitreichende Studie zur Identifizierung von Tubulin-bindenden Proteinen in *Arabidopsis*. Entsprechend ihrer vorhergesagten Proteinfunktion wurden die Bindepartner in sechs Kategorien, einschließlich MAPs, metabolische Enzyme, Signal-Proteine, Translationsfaktoren und RNA-bindende Proteine, eingeteilt. Die Identifizierung verschiedener cytosolischer Isoformen der GAPDH sowie der Enolase (ENO1 und ENO2) und der cytosolischen Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase als Aktin-assoziierte Proteine im Hefe-2-Hybrid-System steht somit in guter Übereinstimmung mit Befunden aus anderen Studien. Diese Interaktionen wurden biochemisch verifiziert und ggf. näher charakterisiert. Eine Wechselwirkung von Enolase mit Aktin wurde bislang weder im tierischen (PAGLIARO et al., 1989) noch im pflanzlichen System beschrieben; Enolase ist jedoch als Tubulin-bindendes Enzym in Ratten bekannt (GITLITS et al., 2000) und wurde funktionell als Transkriptionsfaktor in Mais identifiziert (LEE et al., 2002).

Die Analyse der GAPDH-codierenden Klone erbrachte Hinweise auf die Lokalisation der Aktin-bindenden Domäne. Da die codierenden Sequenzen am N-Terminus zum Teil um bis zu 197 Aminosäuren verkürzt waren, konnte angenommen werden, dass die Aktin-Bindedomäne in der C-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert ist. Dies wiederum würde ermöglichen, dass der für menschliche GAPDH als putativer Aktin-bindende Bereich, beginnend mit der Aminosäure an Position 256 (LOWE et al., 2003), auch für die Bindung der GAPDH aus Mais verantwortlich ist. Die Analyse der postulierten Bindedomäne zeigte jedoch keine vollständige Übereinstimmung mit dem für menschliche GAPDH spezifizierten Bindemotiv (DDIKV), aber starke Homologien und hochkonservierte Bereiche in der umgebenden Sequenz.

In Analogie zu gut dokumentierten Enzym-Aktin-Assoziationen in tierischen Systemen wäre die Regulation von Aktivitäten durch Bindung denkbar, oder die Assoziation schafft innerhalb der Zelle ein Gerüst für die koordinierte Anordnung von Enzymen des gleichen

Stoffwechselweges. Aufgrund der bislang unvollständigen Sequenzinformation des Maisgenoms wurden auch durch die Analyse der mit dem Aktin-*Bait* interagierenden Klone unbekannte Sequenzen identifiziert. Ein Teil der Nukleotidsequenzen wies einen hohen Identitätsgrad zu Sequenzen anderer Organismen auf. Nach konzeptioneller Translation wurden vermehrt Aminosäuresequenzen erhalten, die 83-96% Identität zu bekannten Proteinen anderer Organismen, speziell Reis und Weizen, zeigten. Insofern die vollständige codierende Sequenz, oder zumindest der größte Teil, isoliert wurde, wurde die Information in die Datenbank GenBank eingetragen. Identifiziert wurde so zum Beispiel das Bet v I-Allergen, welches Homologien zum G-Aktin-Bindeprotein und Allergen Profilin aufweist. Eine Aktinbindung des Bet v I-Allergens wurde außerhalb des Hefe-2-Hybrid-Systems nicht untersucht, allerdings wird diesen Allergenen eine Beteiligung an der Inhibition der Cytoplasmaströmung in wachsenden Pollenschläuchen der Birke zugeschrieben (GROTE et al., 1993). Die Wechselwirkung des identifizierten Seneszenz-assoziierten-Proteins DH, welches eine Tetraspanin-Domäne enthält (vgl. Anhang), ist ebenfalls aufgrund von Literaturdaten sinnvoll. In T-Lymphocyten wurde Tetraspanin als Cytoskelett-abhängiger Co-Stimulator der Rho-GTPase identifiziert (DELAGUILLAUMIE et al., 2002). Die mehrfach isolierte Immunophilin-Sequenz enthält eine PPIase-Domäne (Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase-Domäne). Da in Fibroblasten eine Co-Präzipitation der PPIase-Domäne mit Tubulin und Dynein gezeigt wurde, ist auch für das putative Immunophilin aus Mais eine Assoziation mit Cytoskelett-Elementen möglich. Die mögliche Assoziation der identifizierten putativen Kinase (MKIN2) und des Transkriptionsfaktors (ERF1) muss in Analogie zu den eben beschriebenen Interaktionspartnern durch weitere Methoden verifiziert oder falsifiziert werden, aber für einige Mitglieder dieser Proteinfamilien wurde ebenfalls bereits eine Wechselwirkung mit Aktin beschrieben oder postuliert (GRABSKI et al., 1998). Phosphorylierung von Aktin aus Kaninchenmuskel mit einer PKC führte *in vitro* zur vermehrten Polymerisierung (REISS et al., 1996b). Für ribosomale Proteine codierende Sequenzen werden im 2-Hybrid-System üblicherweise als „Falsch-Positive“ klassifiziert. Unter Anbetracht der Tatsache, dass Aktin an der Proteinbiosynthese beteiligt ist (DAVIES et al., 1998; DAVIES et al., 2001) und durch Affinitätschromatographie mit Tubulin ebenfalls vermehrt ribosomale Proteine (CHUONG et al., 2004) als proteinogene Bindepartner einer Cytoskelett-Komponente identifiziert wurden, ist eine gewisse Spezifität dieser Wechselwirkungen nicht grundsätzlich auszuschließen. Zahlreiche weitere isolierte Klone zeigten nach Primärsequenzanalyse hohe Identitäten zu bekannten Maissequenzen, aber weniger als 25% Homologie zu allen anderen Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen der Datenbank. Somit wurden hier auch keine konservierten Domänen identifiziert, die Hinweise auf die mögliche Proteinfunktion geben könnten. Interessanterweise wurden beim Durchmustern der cDNA-Bank einige erwartete und bekannte ABPs, wie z.B. die Arp2/3-Proteine, ADFs, Annexine und Filamine, nicht identifiziert. Zum einen könnte hierfür ursächlich sein, dass in Pflanzen vegetative und reproduktive Aktinspezies existieren.

Vermutlich unterliegen die verschiedenen Typen differenten Regulationsmechanismen, was mit einer divergenten Bindekapazität und -aktivität einhergehen könnte. Einschränkungen des Hefe-2-Hybrid-Systems, die sich durch die Expression der Proteine als Fusionsanteile mit einer Domäne des GAL4-Transkriptionsaktivators ergeben, könnten andererseits ursächlich sein. Die Konformation der *Bait*- und *Prey*-Proteine könnte durch die GAL-Domänenfusion verändert werden oder Bindungsdomänen können verdeckt und nicht zugänglich sein. Daher ist mit dem Hefe-2-Hybrid-System nur dann eine Aussage über die Wechselwirkung zweier Proteine möglich, wenn eine Interaktion positiv nachgewiesen werden kann. Der Umkehrschluss, dass keine Interaktion stattfinden kann wenn mit Hilfe des Reportergens keine Interaktion detektiert wurde, ist somit nicht zulässig.

4.7.3 Identifizierung proteinogener Bindepartner der SnRK1

Nachdem neben der dominanten Phosphorylierung von SUS-Protein durch eine CDPK die zusätzliche, vergleichsweise geringere Phosphorylierung des Mais-Enzyms durch eine SNF1-related Proteinkinase (SnRK) bekannt wurde (HARDIN et al., 2003) und die putative SnRK1 als möglicher Bindepartner von SUS1 und SuS3 identifiziert wurde (vgl. 4.7.1), stellte sich die Frage nach der Spezifität und Regulation dieser Interaktion. Die Sequenzen aller drei SUS-Isoformen zeigten mehrere mögliche SnRK1-Kinase-Phosphorylierungsdomänen (vgl. Tab. 3.25). Deutliche Transkriptmengen für die identifizierte SnRK1 konnten in dieser Arbeit durch „Northern-Blot“-Analyse lediglich im Koleoptilen-Gewebe nachgewiesen werden. Versuche zur heterologen Expression des Proteins in *E. coli* blieben aus ungeklärten Gründen erfolglos, mit der Folge, dass biochemische Untersuchungen zur Funktionalität des Proteins sowie zur Assoziation mit SUS nicht möglich waren. Um jedoch die im Hefe-2-Hybrid-System gefundene Wechselwirkung zu bestätigen und um mögliche Regulatorproteine der SnRK1, wie z.B. übergeordnete Kinasen zu identifizieren, wurde eine weitere Durchmusterung der cDNA-Bank mit dem SnRK1-*Bait* durchgeführt.

Erwartungsgemäß wurde SUS als proteinogener Bindepartner isoliert. Darüber hinaus wurden als weitere interessante interagierende Proteine die GAPDH-Isoformen (GapC3 and GapC4), eine bislang molekular in Mais nicht identifizierte Pyruvatkinase (PK) und ein Heat-Shock-Protein (HSP70) identifiziert. Von den 53 sequenzierten *Prey*-Plasmiden codierten 13 für GAPDH-Protein. Sämtliche GAPDH-Klone enthielten im Gegensatz zu den GAPDH-Klonen, die mit dem Aktin-*Bait* gefunden wurden, die vollständige codierende Sequenz.

Die Phosphorylierung der GAPDH ist aus tierischem Gewebe bekannt. Es wurde gezeigt, dass diese posttranslationale Modifikation die Bindung des glykolytischen Enzyms an das Cytoskelett in Tieren begünstigt (TISDALE, 2002). Die Position der Phosphorylierungsstelle(n) im GAPDH-Protein ist unbekannt, jedoch wird die Phosphorylierung an mindestens einem der vier konservierten Serinreste im Kaninchen favorisiert (TISDALE, 2002). Sequenzalignments zeigten die konservierte Position von Serinresten in tierischen und pflanzlichen

GAPDH-Isoformen, wobei in Pflanzen in der N-terminalen Hälfte des Enzyms ein zusätzlicher, fünfter Serinrest mit hoher Phosphorylierungswahrscheinlichkeit konserviert vorliegt (Tab. 3.26). In dieser Arbeit durchgeführte immunologische Nachweise einer Phosphorylierung der pflanzlichen GAPDH sind problematisch. Es konnte mit einem phospho-spezifischen Antikörper ein Signal für nativ gereinigte GAPDH aus Spinat erhalten werden. Allerdings wurde ebenfalls eine Phosphorylierung der cytosolischen GAPDH aus *Arabidopsis*, die rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde, detektiert werden. In Analogie zur GAPDH aus Kaninchenmuskel (KAWAMOTO et al., 1985) könnte dieses Signal durch Autophosphorylierung des Enzyms entstanden sein.

Nachdem die Serin-Phosphorylierung von PK aus Säugetieren (LJUNGSTROM et al., 1976) und Hefen (BRAZILL et al., 1997) längst bekannt ist, wurde dies in Pflanzen (Sojabohne) mittlerweile ebenfalls gezeigt (TANG et al., 2003). Die Autoren postulierten sowohl eine SnRK1-abhängige Phosphorylierung, als auch eine CDPK-abhängige, zweite Phosphorylierung. Die Interaktion der Pyruvatkinase mit der SnRK1 wurde von TANG et al. (2003) nicht näher untersucht. Literaturdaten deuten aber darauf hin, dass die Regulation der pflanzlichen PK signifikante Unterschiede zum tierischen Enzym aufweist. Die Phosphorylierung der PK aus Leber (L-Typ) an der N-terminal lokalisierten LRRAS-Sequenz ist gut dokumentiert (ENGSTROM, 1980; LONE et al., 1986). In pflanzlichen PKs ist dieser Serinrest jedoch nicht konserviert (BLAKELEY et al., 1990). Eine allosterische Regulation der PK ist in Eukaryoten weit verbreitet, aber die Effektoren der PK in Pflanzen scheinen verschieden von denen in Tieren zu sein (PLAXTON, 1996). In der Leber von Säugetieren wird die PK durch FBP, dem Substrat der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase (PFK) aktiviert, während dies für pflanzliche PK nicht zutrifft. Vielmehr inhibiert Phosphoenolpyruvat (PEP), das Substrat der PK die pflanzliche PFK (PLAXTON, 1996).

Die Assoziation der SnRK1 aus Roggen mit einem Heat-Shock-Protein und die *in vitro*-Phosphorylierung dieses Proteins in Abhängigkeit von SnRK1 wurde ebenfalls in neusten Studien beschrieben (SLOCOMBE et al., 2004).

4.8 Biochemischer Nachweis ausgewählter Hefe-2-Hybrid-Interaktionen

4.8.1 Nachweis einer direkten Protein:Protein-Interaktion zwischen SUS und cGPx

Durch Hefe-2-Hybrid-Analysen mit den Saccharose-Synthase-Isoformen SUS1 und SuS3 als *Bait*-Proteinen wurde die Nukleotidsequenz einer putativen cytosolischen Glutathion-Peroxidase (cGPx) aus Mais identifiziert. Die für das Protein codierende Sequenz wurde überexprimiert und ihre GPx-Enzymaktivität bestätigt (vgl. 3.6.2.2). Glutathion-Peroxidase-Aktivitäten in Mais-Rohextrakt wurden von DROTAR et al. (1985) determiniert, wobei sowohl H₂O₂ als auch organische Hydroperoxide als Substrate dienten. In zellfreien Maisextrakten wurden mit dem Substrat H₂O₂ nanomolare GPx-Aktivitäten gemessen, die jedoch nach MULLINEAUX et al. (2000) zu großen Anteilen auf die Aktivität der ebenfalls im Extrakt

vorhandenen Glutathion-S-Transferasen zurückzuführen sind. Eine Glutathion-S-Transferase wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als Interaktionspartner von SUS1 im Hefe-2-Hybrid-System identifiziert. Transkripte der cGPx wurden mittels „Northern-Blot“-Analysen in Wurzel-, Koleoptil-, Blatt- und Kolben-Gewebe von Mais nachgewiesen (vgl. 3.6.2.3).

Die Identifizierung von cGPx in Hefe-2-Hybrid-Analysen legte die Hypothese einer direkten Protein:Protein-Interaktion zwischen den Proteinen SUS1 und cGPx nahe. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden mehrere Varianten einer Affinitätschromatographie an einer *Strep-Tactin*- sowie an einer Nickel-NTA-Matrix durchgeführt (vgl. 3.6.2.4), durch die eine direkte Bindung zwischen den beiden Proteinen bewiesen werden sollte. Die Versuche ergaben deutliche Hinweise auf eine eventuelle Bindung von SUS1 an cGPx, da beide putativen Interaktionspartner gemeinsam eluiert wurden (vgl. Abb. 3.6.9). In den letzten vorhergegangenen Waschfraktionen konnten dagegen keine signifikanten Proteinmengen mehr nachgewiesen werden. Als Kontrollversuche zu den durchgeführten Affinitätschromatographien wurde die Bindung von SUS an die *Strep-Tactin*-Matrix in Abwesenheit von cGPx untersucht; ebenso von cGPx direkt an die Ni-NTA-Matrix. Die Kontrollversuche verliefen positiv; weder immunologisch noch im gefärbten Proteingel wurden in den Elutionsschritten unspezifisch gebundene Proteine nachgewiesen. Eine Chromatographie an einer cGPx-Affinitätsmatrix mit Maisrohextrakt untermauerte die These der Bindung von cGPx und SUS-Protein. Immunologisch konnte native SUS in den Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie mit Mais-Rohextrakt nachgewiesen werden. Obwohl SUS im eingesetzten Mais-Gewebe in deutlichen Mengen vorlag, wurden nur sehr geringe Anteile in Assoziation mit der cGPx-Affinitätsmatrix gefunden, was auf eine sehr schwache Bindung des nativen SUS-Proteins schließen lässt. Eine Bindung von rekombinanter SUS und cGPx konnte auch im ELISA bestätigt werden. Hier zeigte sich deutlich, dass mit einem Verhältnis von weniger als 6 nmol SUS-Protein pro mol cGPx eine sehr schwache Bindung vorliegt. Bindestudien, bei denen versucht wurde die Wechselwirkung von SUS und cGPx mit der Assoziation von SUS und Aktin zu koppeln, verliefen erfolglos. Die cGPx assoziierte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht mit Aktinfilamenten, und auch bei Co-Sedimentierungsversuchen mit SUS, cGPx und Aktin kam es zu keiner Anreicherung der cGPx in der Bindefraktion. Möglich wäre, dass cGPx nur an lösliches SUS-Protein bindet, oder dass die Bindung unter den Pufferbedingungen noch weiter erniedrigt ist und nicht detektiert werden konnte.

Glutathion-Peroxidasen gehören einer großen Klasse von Enzymen an, die *in vivo* vornehmlich der Detoxifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 durch Reduktion dienen. Zusätzlich werden auch andere organische Hydroperoxide sowie Lipidhydroxide umgesetzt und somit unschädlich gemacht (DROTAR et al., 1985; MULLINEAUX et al., 1998). Der Schutz von Pflanzenzellen vor oxidativen Schäden ist eine wichtige Aufgabe der Glutathion-Peroxidasen. Vor allem die biologischen Membranen und Makromoleküle sind anfällig für Oxidation in Folge von Stresssituationen. In Rahmen dieser Arbeit sowie in einer

eingegliederten Bachelorarbeit (Kerstin Schipper) wurde der Einfluss von Oxidation auf die Spaltungsaktivität der rekombinanten Saccharose-Synthase-Isoformen SUS1 und SuS3 untersucht. Eine reversible Inaktivierung der Enzyme durch Oxidation konnte gezeigt werden (vgl. 4.2). Durch die Wechselwirkung mit der cytosolischen Glutathion-Peroxidase könnte das SUS-Enzym vor Oxidation geschützt werden. Die cGPx könnte bei oxidativen Stressbedingungen im Cytosol heterotropher Gewebe durch eine reversible Bindung an SUS1 dessen Oxidation verhindern, indem reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 abgefangen werden. Diese Hypothese wurde auch bereits durch einen Versuch zur Spaltungsaktivität von SUS1 in Anwesenheit von H_2O_2 und rekombinatem cGPx-Protein untersucht. Es haben sich jedoch keine verwertbaren Ergebnisse ergeben, da vermutlich das H_2O_2 den Test verfälscht hatte. Es müsste hier nach besser geeigneten Methoden zur Überprüfung der Hypothese gesucht werden.

Die Bindung der cGPx als Oxidationsschutz von SUS dürfte allerdings die regulatorische Oxidation des Enzyms nicht vollständig verhindern, da sonst eine Anpassung der Spaltungsaktivität an den Saccharose-Pool nicht mehr möglich wäre. Dies ist jedoch durchaus plausibel, da die für die Regulation vorgeschlagenen Oxidationsmittel, Glutathion und Thioredoxin (*h*) keine Substrate der Glutathion-Peroxidasen darstellen. Dagegen spielt der Schutz vor Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 für redoxregulierte Enzyme eine besonders wichtige Rolle, da die Oxidationsvorgänge fein reguliert werden müssen und nicht durch andere Reaktionen beeinflussbar sein dürfen.

4.8.2 Enzyme der pflanzlichen Glykolyse binden direkt an Aktinfilamente *in vitro*

Die Assoziation der Aldolase aus Mais wurde in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie (Universität Osnabrück; Dissertation Anke Scholz) gezeigt und in eigenen Hefe-2-Hybrid-Analysen sowie in Bindestudien bestätigt (vgl. 4.7.2, Abb. 3.6.4). Durch Wettbewerbsversuche mit nativem SUS-Protein aus Mais und Aldolase aus Kaninchen um die Bindung an Aktin, wurde das konkurrierende Verhalten der Enzyme gezeigt (WINTER et al., 1998). Eigene Versuche zeigten, dass auch Mais-Aldolase in Wettbewerbsversuchen einen erheblichen Teil des SUS-Proteins an der Aktin-Assoziation hindert (vgl. Abb. 3.6.4). Die ebenfalls im Hefe-2-Hybrid-System identifizierten Wechselwirkungen von GAPDH und Enolase an Aktin konnten mit Co-Sedimentationsversuchen *in vitro* bestätigt werden. Während das rekombinante GAPDH-Protein (*A. thaliana*) in standardisierten Versuchsansätzen direkt mit Aktinfilamenten interagiert und diese Bindung mit 0,12 mol GAPDH pro Aktin-Monomer zu sättigen war (vgl. 3.6.1.1), wurde die Enolase-Aktin-Interaktion erst durch GTP und $MgCl_2$ in unphysiologischen Konzentrationen induziert (vgl. 3.6.1.3).

GITLITS et al. (2000) konnten die Assoziation von Enolase mit Mikrotubuli nachweisen, stellen allerdings fest, dass die Wechselwirkung spezifisch durch GTP und $MgCl_2$ induzierbar war. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *in vivo* weitere, bislang unbekannt

Parameter für diese Protein-Protein-Interaktion unabdingbar sind. Reversible Proteinphosphorylierung ist als Regulationsmechanismus für katalytische Aktivitäten und Assoziationseigenschaften einiger Aktinbindepoteine sowie für die Dynamik des Cytoskeletts selbst bereits mehrfach beschrieben worden (GRABSKI et al., 1998). Da tierische sowie pflanzliche Enolasen *in vitro* als reversibel phosphorylierte Proteine bekannt sind (MUJER et al., 1995), könnte eine derartige Modifikation die katalytische Aktivität sowie die Cytoskelett-Bindung beeinflussen. Es gibt Hinweise für eine Phosphorylierung der Enolase unter aeroben Bedingungen und eine entsprechende Dephosphorylierung unter anaeroben Bedingungen (LAL et al., 1998). Anaerobe Bedingungen induzieren darüber hinaus die Expression der Enolase in Mais. Physiologisch könnte die transiente Enolase-Aktin-Interaktion an einer subzellulären Kompartimentierung glykolytischer Enzyme in einem Metabolon partizipieren oder als Transkriptionsfaktor (LEE et al., 2002) an der Proteinbiosynthese teilhaben. Für die Formierung von Metabolons unter Beteiligung der Enolase sprechen Ergebnisse von GIEGÉ et al. (2003), die Enolase ebenso wie Hexokinase und Aldolase in gebundener Form an isolierten Mitochondrien gefunden hatten. Während in Wettbewerbsversuchen von Aldolase und SUS um die Bindung an Aktinfilamente eine weitgehende Verdrängung des SUS-Proteins durch Aldolase stattgefunden hatte (Abb. 3.6.4), wurde die Menge an SUS-Protein bei steigender Menge GAPDH vergleichsweise wenig verdrängt und umgekehrt (Abb. 3.6.3). Vermutlich konkurrieren die beiden Enzyme nicht um die gleichen Bindestellen am Aktin. Eine Aggregation von GAPDH und SUS wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen *in vitro* nicht festgestellt.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf unterschiedliche Bindemotive von Aldolase, SUS und GAPDH hin, was wiederum mit Literaturdaten für die tierischen Enzyme der Glykolyse kongruent ist (O'REILLY und CLARKE, 1993; LOWE et al., 2003).

4.8.3 Die Saccharose-Synthase assoziiert mit Mikrotubuli *in vitro*

Die im Hefe-2-Hybrid-System identifizierte Protein-Protein-Interaktion von SUS1 und Tubulin oder Mikrotubuli aus Mais konnte *in vitro* durch Co-Sedimentationsversuche bestätigt werden (vgl. 3.3.2). Die Bindestudien wurden mit rekombinantem SUS-Protein (SuSy-wt) und assemblierten Mikrotubuli (MT) aus Rinderhirn durchgeführt. Erste Versuche ergaben, dass sich diese Wechselwirkung *in vitro* durch eine rasche Assoziation und eine langsame Dissoziation auszeichnet, bei der die katalytische Funktion des SUS-Enzyms während der Versuchsanordnung erhalten bleibt. Die Fähigkeit einiger Enzyme, sowohl mit Aktinfilamenten, als auch mit Mikrotubuli zu interagieren, ist zum Beispiel für die glykolytischen Enzyme Aldolase und GAPDH im tierischen System bekannt. In Analogie zu diesen Befunden ist die Assoziation des Aktin-bindenden Proteins SUS an Mikrotubuli durchaus denkbar. Aufgrund der Aktinassoziation der pflanzlichen Aldolase (vgl. 4.8.2) wurde angenommen, dass die Aldolase aus Mais ebenso wie sein tierisches Paralog an Mikrotubuli bindet. Mittels Co-Sedimentationsversuchen konnte dies bestätigt werden. Des

Weiteren konnte durch Wettbewerbsversuche ein ähnliches konkurrierendes Verhalten von Aldolase und SUS aus Mais um die Bindung an Mikrotubuli gezeigt werden, wie es für die Aktinassoziation zuvor beobachtet wurde. Zwei Schlussfolgerungen können aus diesen Ergebnissen gewonnen werden. Zum einen ist die Bindung von SUS an MT *in vitro* spezifisch, zum anderen sind MT affiner für Aldolase als für SUS.

Für die GAPDH aus Kaninchen, die als erstes glykolytisches Enzym in Assoziation mit MTs gefunden wurde (KUMAGAI und SAKAI, 1983), konnte eine inhibierte Enzymaktivität durch MT-Assoziation gezeigt werden (DURRIEU et al., 1987; SOMERS et al., 1990). Bindestudien in Kopplung mit katalytischen Messungen, bei denen GAPDH aus Kaninchen als Referenzprotein sowie rekombinante GAPDH aus *Arabidopsis* und rekombinante SUS1 parallel eingesetzt wurden, zeigten ein ähnliches assoziatives Verhalten der drei Enzyme. Im Gegensatz dazu wurde ein divergentes katalytisches Verhalten beobachtet. Die Enzymaktivität der pflanzlichen und tierischen GAPDH wurde bei Assoziation mit MT inhibiert (vgl. 3.3.2.4), während SUS-Protein in Gegenwart von MT keine Aktivitätsverluste zeigte. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bereits für Aktin-Assoziation von SUS in dieser Arbeit erhalten (vgl. 3.3.1.4). Verschiedene Autoren diskutieren die physiologische Relevanz von Wechselwirkungen von Enzymen mit Elementen des Cytoskelts vor dem Hintergrund, dass die Kompartimentierung der Enzyme entweder intrazellulär einer lokalen Akkumulation von Energie und Metaboliten zur effizienten Stoffwechselaktivierung dient. Andere wiederum postulieren, dass eine derartige Assoziation der Inaktivierung von Enzymaktivitäten dient und somit kurzfristig Enzyme dem katalytisch aktiven Enzym-Pool entzogen werden können. Den in dieser Arbeit gewonnenen *in-vitro* Ergebnissen zur Folge scheint die Assoziation von SUS mit Cytoskelett-Komponenten eher der Regulation der subzellulären Lokalisation des Enzym und seiner Enzyaktivität zu dienen. In Pflanzenzellen colokalisieren die Mikrotubuli und die Aktinfilamente oft oder sind in unmittelbarer Nähe zueinander angeordnet (RIDGE, 1988; ANDERSLAND et al., 1998). Eine Interaktion dieser beiden Cytoskelett-Komponenten scheint besonders im kortikalen Zellbereich eine physiologische Bedeutung für das Wachstum der Pflanze zu besitzen. Jüngst wurde ein erstes pflanzenspezifisches Kinesin in Baumwollfasern identifiziert und seine zeitgleiche Assoziation mit Aktinfilamenten und MT charakterisiert (PREUSS et al., 2004). Die subzelluläre Lokalisation von SUS-Protein am Zellkortex wurde mehrfach dokumentiert und ist gut verträglich mit der hier gefundenen SUS-MT-Interaktion. Eukaryotische Tubuline als dimere Proteinkomponenten der MT sind hochkonserviert. In höheren Pflanzen wurden bis zu acht Isoformen beschrieben, die sich hauptsächlich am C-Terminus unterscheiden. Diese C-terminale Variabilität könnte mit einer funktionalen Diversität der Isoformen in Zusammenhang stehen (JOST et al., 2004). Aus diesem Grund ist es essentiell, die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse bezüglich ihrer physiologischen Relevanz zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Hinweise zur subzellulären Lokalisation und Regulation könnten in einem komplexen Arbeitsmodell integriert werden (Abb. 4.4).

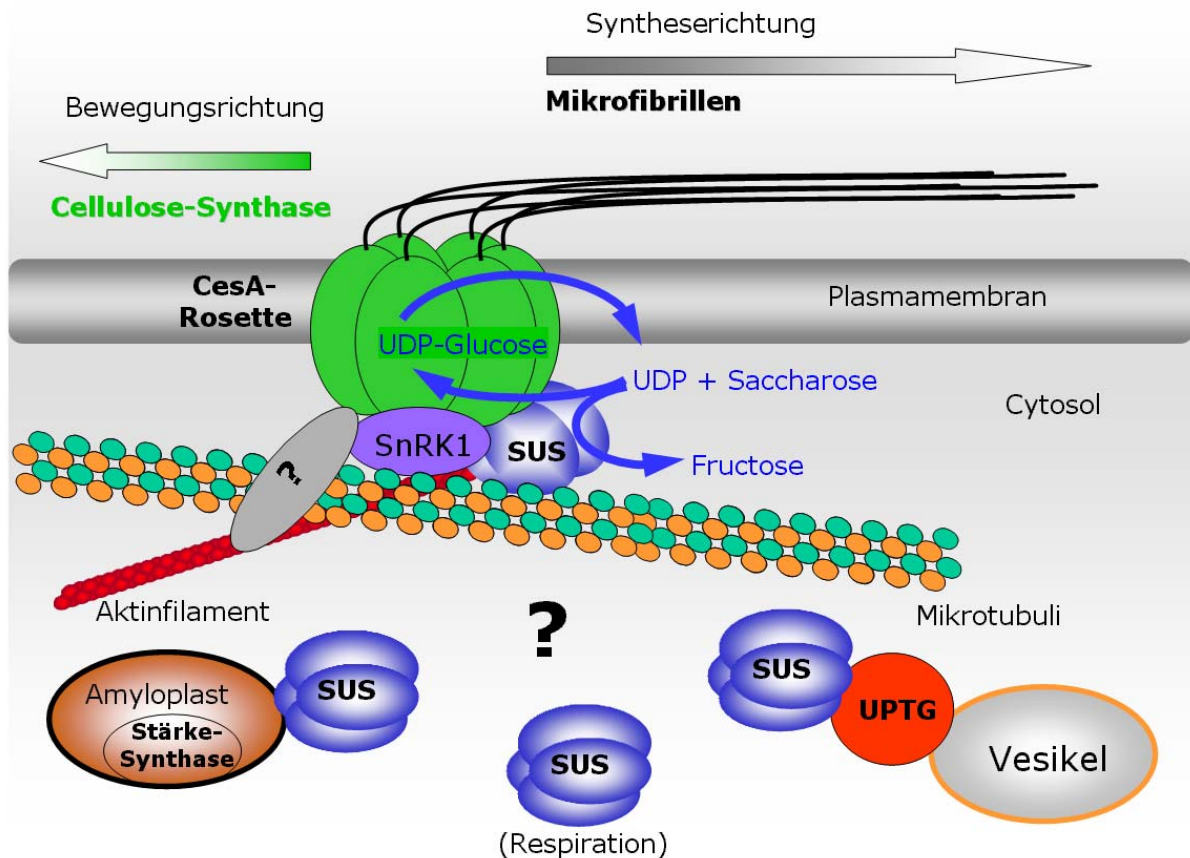


Abb. 4.4: Hypothetisches Modell der Interaktion und Lokalisation von Saccharose-Synthase mit Aktinfilamenten, Mikrotubuli, Cellulose-Synthase und anderen Proteinen.

In diesem erweiterten hypothetischen Modell würde die katalytisch aktive Saccharose-Synthase assoziiert mit dem kortikalen Cytoskelett und/oder der Plasmamembran Substrat für die Cellulose-Synthase bereitstellen. Gleichzeitig könnte die Saccharose-Synthase mit dem Rosettenkomplex der Cellulose-Synthase durch die Cytoskelettstrukturen an der Plasmamembran entsprechend entgegen der Syntheserichtung der Mikrofibrillen bewegt werden. Weiteren regulatorischen Einfluss könnte die SnRK1 haben, indem sie evtl. durch Phosphorylierung die Enzymstabilität im Zusammenhang mit einer Proteasom-abhängigen Degradierung des SUS-Proteins beeinflusst oder als „Zuckersensor“ an der metabolischen Regulation von SUS beteiligt ist. Das frei lösliche Enzym könnte mit der UPTG interagieren oder Substrat für die im Amyloplasten lokalisierte Stärke-Synthase produzieren. Ebenso kann das lösliche SUS-Protein durch einen vergleichsweise geringen Energieaufwand Saccharose mobilisieren und Substrate für die Respiration bereitstellen. An der Kontrolle der subzellulären Lokalisation und/oder Kompartimentierung von SUS scheinen nicht, wie bislang angenommen, nur Aktin als Element des pflanzlichen Cytoskeletts und die reversible Phosphorylierung von SUS beteiligt zu sein. Weitere proteinogene Bindepartner und sowie zusätzliche posttranslationale Modifikationen (Redox-Modulation und proteolytischer Abbau) bieten Kapazitäten für Regulation der Lokalisation, Aktivität und Präsenz des Enzyms in Abhängig von variierenden zellulären Anforderungen.

5. Zusammenfassung

Die Saccharose-Synthase (SUS) als ein zentrales Enzym im pflanzlichen Kohlenhydrat-Stoffwechsel katalysiert die Umwandlung von UDP und Saccharose in UDP-Glucose und Fructose. SUS wird vorrangig im heterotrophen Gewebe von Pflanzen exprimiert und ist an der Verteilung von Saccharose in verschiedene Stoffwechselwege wie z.B. die Stärkesynthese, Glykolyse und Synthese der Strukturglukane beteiligt. SUS kommt als frei lösliches Enzym im Cytosol, assoziiert mit der Plasmamembran und/oder am Aktin-Cytoskelett angelagert vor. Die der Membran- und/oder Cytoskelett-Assoziation zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt, jedoch wird der reversiblen Phosphorylierung der Saccharose-Synthase sowie der metabolischen Regulation durch lösliche Zucker eine bedeutende Rolle zugeordnet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich experimentell mit dem Nachweis regulatorischer, katalytischer und struktureller Aspekte der Assoziation von der Saccharose-Synthase mit subzellulären Strukturen. Im Zuge verschiedener cDNA-Durchmusterungen konnten proteinogene Bindepartner der Saccharose-Synthase sowie der Cytoskelett-Komponente Aktin identifiziert und zum Teil bereits verifiziert werden.

Die dritte Isoform SuS3 der Saccharose-Synthase aus *Z. mays* konnte auf molekularer Ebene identifiziert und gemäß der Klassifizierung von BAUD et al., (2004) als erste monokotyle Isoform in die SUSA-Gruppe eingeordnet werden. Das heterolog exprimierte SuS3-Protein wurde biochemisch im Vergleich zur SUS1-Isoform charakterisiert und zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers durch die Firma Inno-Train verwandt. Obwohl signifikante Sequenzunterschiede zwischen den SUS-Isoformen bestehen, wurden vergleichbare katalytische Eigenschaften und mögliche posttranslationale Modifikationen der Enzyme nachgewiesen.

Anhand der heterolog exprimierten SUS-Isoformen wurde die Redox-Modifikation der Enzymaktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltungsaktivität beider Isoenzyme durch Oxidation inhibiert und durch Reduktion aktiviert wird, während die Syntheseaktivität nahezu unbeeinflusst blieb. Die *in vitro* gezeigte Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Redoxzustand könnte einen weiteren Mechanismus der posttranslationalen Aktivitätsregulation von SUS in der Zelle darstellen.

Die SuS3-Isoform bietet, ebenso wie die bereits gut untersuchten SUS1- und SH1-Isoformen, das Potential einer reversiblen Proteinphosphorylierung zu unterliegen.

Der Einfluss der reversiblen Proteinphosphorylierung von SUS1 auf dessen enzymatische Aktivität und Aktin-Assoziation wurde mit Hilfe von mutagenisiertem Protein untersucht. Die *in vitro*-Experimente zeigten für die rekombinanten Proteine weder ein stark verändertes katalytisches noch ein beeinflusstes assoziatives Verhalten infolge von Substitutionen an der N-terminalen Phosphorylierungsstelle.

Eine metabolische Regulation der SUS-Aktin-Wechselwirkung konnte bestätigt werden. Die Aktinbindung des nativ gereinigten SUS-Proteins lässt sich durch Saccharose sowie durch Di- und Trisaccharide, welche keine Enzym-Substrate darstellen induzieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass die rekombinante und nativ gereinigte Saccharose-Synthase in Gegenwart von Aktinfilamenten katalytisch aktiv ist. Somit bietet die SUS-Aktinbindung das Potential zum effizienten „Metabolit-Channeling“ in definierten subzellulären Regionen.

Assoziationsstudien von Aktin mit synthetischen Peptiden zeigten für einige Sequenzabschnitte der SUS1-Isoform die Fähigkeit Aktin zu bündeln. Insbesondere ein zu SUS1 korrespondierendes Peptid mit signifikanter Homologie zu Aktin und "Aktin-related-protein 2" (Arp2) zeigte hohe Spezifität, kompetitierte jedoch nicht mit SUS selbst um die Aktinbindung. Die Aktinbindedomäne in SUS konnte auf die C-terminale „Proteinhälfte“ eingegrenzt werden, wenngleich ein Bindemotif oder für die Bindung essentielle Aminosäuren nicht identifiziert wurden.

Proteinogene Bindepartner der SUS-Isoformen wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems identifiziert. Neben einigen im Kohlenhydratstoffwechsel involvierten Proteinen wurden verschiedene Proteine des Ubiquitin/26S-Proteasom-Komplexes und eine SnRK1-Kinase als mögliche Interaktionspartner gefunden. Der durch das 26S-Proteasom vermittelte proteolytische Abbau des SUS-Proteins aus Mais sowie die potentielle Phosphorylierung von SUS durch eine SnRK1 wurde inzwischen publiziert (HARDIN et al., 2003). Die erhaltenen cDNA-Sequenzen wurden bei GenBank eingetragen, eine Spezifizierung dieser Interaktionen steht jedoch noch aus. Darüber hinaus wurde mit dem Hefe-2-Hybrid-System eine cytosolische Glutathion-Peroxidase (cGPx) identifiziert, die ubiquitäre Transkriptakkumulation mittels „Northern-Blot“-Analyse dokumentiert und die katalytische Aktivität des heterolog exprimierten Proteins gezeigt.

Die Wechselwirkung von SUS mit Mikrotubuli, die aufgrund der gefundenen Interaktion von SUS1 mit einem Tandemgen für Tubulin untersucht wurde, ist spezifisch. SUS assoziiert *in vitro* mit Mikrotubuli aus Rinderhirn und konkurriert mit Aldolase um die Bindung. Der experimentelle Vergleich mit der Mikrotubuli-bindenden GAPDH zeigte, dass SUS in direkter Assoziation mit den Mikrotubuli katalytisch aktiv ist, während sowohl die Enzymaktivität der pflanzlichen als auch der tierischen GAPDH inhibiert ist. Ebenso wie der Erhalt der katalytischen Aktivität in Gegenwart von Aktin, könnte die Assoziation von aktiver SUS mit Mikrotubuli einem gezieltem Weiterleiten von Substraten an weitere Proteine, speziell der Cellulose- und Callose-Synthase dienen. Obgleich Aktin und Tubulin zu den am höchsten konservierten Proteinen gehören, wären Nachweise der Assoziation und metabolischen Regulation unter Verwendung von pflanzlichem Aktin relevant.

Während in tierischen Zellen für glykolytische und andere Zucker-metabolisierende Enzyme die räumliche und zeitliche Organisation in Metabolons am Cytoskelett schon lange untersucht und charakterisiert wird, gibt es bislang noch relativ wenige Erkenntnisse für die Assoziation von Enzymen mit dem pflanzlichen Cytoskelett. Die Durchmusterung einer

cDNA-Bank führte zur Identifikation verschiedener glykolytischer Enzyme als potentielle Interaktionspartner von Mais-Aktin. Diese Interaktionen konnten *in vitro* verifiziert werden. Ferner wurden weitere Sequenzinformationen erhalten, die nach Analyse der Primärsequenz Domänen mit zum Teil hohen Homologien zu bekannten ABPs aus tierischen Organismen zeigten. Wenngleich die Verifizierung und differenzierte Charakterisierung dieser putativen Interaktionen noch aussteht, bieten die gewonnenen Hinweise eine Grundlage für weitere Analysen der subzellulären Regulation und Organisation von pflanzlichen Proteinen am Cytoskelett.

6 Literaturverzeichnis

- AHO, S., ARFFMAN, A., PUMMI, T. und UITTO, J. (1997)
A novel reporter gene *Me1* for the yeast two-hybrid system.
Anal. Biochem. 253, 370-272.
- AL HABORI, M. (1995)
Microcompartmentation, metabolic channelling and carbohydrate metabolism.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 27, 123-132.
- ALBRECHT, G., KLOTKE, J. und BIEMELT, S. (2000)
The increase in sucrose synthase activity correlates with a higher content of cellulose in wheat roots suffering from oxygen deficiency. In: *Proceedings of Plant Biology. American Society of Plant Physiologists. Rockville, USA*
- ALBRECHT, G. und MUSTROPH, A. (2003)
Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia.
Planta 217, 252-260.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. und LIPMAN, D. J. (1990)
Basic local alignment search tool.
J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. und LIPMAN, D. J. (1997)
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databasesearch programs.
Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- AMBERG, D.C. und BOTSTEIN, D. (1997)
Obtaining structural information about protein complexes with the two-hybrid system.
In: BARTEL, P.L. und FIELDS, S. (Hrsg.) *The Yeast Two-Hybrid System.* Oxford University Press, pp. 99-108.
- AMOR, Y., HAIGLER, C.H., JOHNSON, S., WAINSCOTT, M. und DELMER, D.P. (1995)
A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9353-9357.
- ANDERSLAND, J.M., FISHER, D.D., WYMER, C.L., CYR, R.J. und PARTHASARATHY, M.V. (1994)
Characterization of a monoclonal antibody prepared against plant actin.
Cell Motil. Cytoskeleton 29, 339-344.
- ANGUENOT, R., YELLE, S. und NGUYEN-QUOC, B. (1999)
Purification of tomato sucrose synthase phosphorylated isoforms by Fe(III)-immobilized metal affinity chromatography.
Arch. Biochem. Biophys. 365, 163-169.
- AP REES, T. (1984)
Sucrose metabolism.
In: LEWIS, D.H.: (Hrsg.) *Storage Carbohydrates in Vascular Plants.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 53-73.
- APPELDORN, N.J.G., DE BRUIJN, S.M., KOOT-GRONVELD, E.A.M., VISSER, R.G.F., VREUGDENHIL, D. und VAN DER PLAS, L.H.W. (1997)
Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose phosphate during early tuberisation of potato.
Planta 202, 220-226.
- ARNOLD, H. und PETTE, D. (1968)
Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle.
Eur. J. Biochem. 6, 163-171.

- ASANO, T., KUNIENDA, N., OMURA, Y., IBE, H., KAWASAKI, T., TAKANO, M., SATO, M., FURUHASHI, H. MUJIN, T., TAKAIWA, F. (2002)
Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor.
Plant Cell 14, 619-628.
- ASHWELL, G. (1957)
Colorimetric analysis of sugars.
In: COLOWICK, A. und KAPLAN, B. (Hrsg.) Methods of Enzymology. Academic Press. 3, 85-86.
- AYSCOUGH, K.R. und DRUBIN, D.G. (1996)
Actin: general principles from studies in yeast.
Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 12, 129-160.
- AVIGAD, G. (1982)
Sucrose and other disaccharides.
In: LOEWUS, T.A. und TANNER, W. (Hrsg.) Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Vol. 13A, pp. 217-347. Springer-Verlag, Berlin.
- AZAMA, K., ABE, S., SUGIMOTO, H. und DAVIES, E. (2003)
Lysine-containing proteins in maize endosperm: a major contribution from cytoskeleton-associated carbohydrate-metabolizing enzymes.
Planta 217, 628-638.
- BACHMANN, M., SHIRAIISHI, N., CAMPBELL, W.H., YOO, B.C., HARMON, A.C. und HUBER, S.C. (1996)
Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase.
Plant Cell 8, 505-517.
- BAIROCH, A. (1992)
PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins.
Nucleic Acids Res. 11, 2013-2018.
- BALUŠKA, F. und HASENSTEIN, K.H. (1997)
Root cytoskeleton: its role in perception of and response to gravity.
Planta 203 (Suppl), 69-78.
- BALUŠKA, F., SALAJ, J., MATHUR, J., BRAUN, M., JASPER, F., SAMAJ, J., CHUA, N.-H., BARLOW, P.W. und VOLKMANN, D. (2000)
Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges.
Dev. Biol. 227, 618-632.
- BALUŠKA, F., SAMAJ, J., HLAVACKA, A. KENDRICK-JONES, J. und VOLKMANN, D. (2004)
Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices.
J. Exp. Bot. 55, 463-473.
- BAQUÉ, S., GUINOVART, J.J. und FERRER, J.C. (1997)
Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin.
FEBS Lett. 417, 355-359.
- BAROJA-FERNÁNDEZ, E., MUÑOZ, F.J., SAIKUSA, T., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M., AKAZAWA, T. und POZUETA-ROMERO, J. (2003)
Sucrose synthase catalyses the *de novo* production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants.
Plant Cell Physiol. 44, 500-509.
- BARRATT, D.H.P., BARBER, L., KRUGER, N.J., SMITH, A.M., WANG, T.L. und MARTIN, C. (2001)
Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea.
Plant Physiol. 127, 655-664.
- BASKIN, T.I. (2001)
On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: A review and a model.
Protoplasma 215, 150-171.

- BAUD, S., VAULTIER, M.N. und ROCHAT, C. (2004)
Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*.
J. Exp. Bot. 55, 397-409.
- BERGMEYER, H.U. (1974)
Methods of enzymatic analysis.
Academic Press, New York pp, 1196-1201.
- BLAKELEY, S.D., PLAXTON, W.C. und DENNIS, D.T. (1990)
Cloning and characterization of a cDNA for the cytosolic isoenzyme of plant pyruvate kinase:
the relationship between the plant and non-plant enzyme.
Plant Mol. Biol. 15, 665-669.
- BLOM, N., GAMMELTOFT, S. und BRUNAK, S. (1999)
Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.
J. Mol. Biol. 294, 1351-1362.
- BOCCA, S.N., KISSEN, R., ROJAS-BELTRAN, J.A., NOEL, F., GEBHARDT, C., MORENO, S., DU JARDIN, P., und
TANDECARZ, J.S. (1999)
Molecular cloning and characterization of the enzyme UDP-glucose: protein transglucosylase
from potato.
Plant Physiol. Biochem. 37, 809-819.
- BOLOGA, K.L., FERNIE, A.R., LEISSE, A., LOUREIRO, M.E. und GEIGENBERGER, P. (2003)
A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic
performance in growing potato tubers.
Plant Physiol. 132, 2058-2072.
- BORISJUK, L., WALENTA, S., ROLLETSCHKE, H., MUELLER-KLIESER, W., WOBUS, U. und WEBER, H. (2002)
Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals
specific developmental patterns.
Plant J. 29, 521-530.
- BOWERMAN, B. und SEVERSON, A.F. (1999)
Cell division: Plant-like properties of animal cell cytokinesis.
Current Biology 9, 658-660.
- BRADFORD, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing
the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254.
- BRANGEON, J., NGUYEN-QUOC, B. und LECHARNY, A. (1996)
Ultrastructural detection of sucrose synthase distribution in developing maize leaves.
Protoplasma 192, 150-158.
- BRAZILL, D.T., THORNER, J. und MARIN, G.S. (1997)
Mck1, a member of the glycogen synthase kinase 3 family of protein kinase, is a negative
regulator of pyruvate kinase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol. 17, 4415-4423
- BUCHANAN, B.B. (1980)
Role of light in the regulation of chloroplast enzymes.
Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 341-374.
- BUCKERIDGE, M.S., VERGERA, C.E. und CARPITA, N.C. (1999)
The mechanism of synthesis of a mixed-linkage (1→3), (1→4) β-D-glucan in maize. Evidence
for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex.
Plant Physiol. 120, 1105-1116.
- BUCKERIDGE, M.S., VERGARA, C.E. und CARPITA, N.C. (2001)
Insight into multi-site mechanisms of glycosyl transfer in (1→4) β-D-glycans provided by the
cereal mixed linkage (1→3),(1→4) β-D-glucan synthase.
Phytochem. 57, 1045-1053.
- BUCZYNSKI, S.R., THOM, M., CHOUREY, P. und MARETZKI, A. (1993)

- Tissue distribution and characterization of sucrose synthase isozymes in sugarcane.
J. Plant Physiol. 142, 641-646.
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M. und SHORT, J.M. (1987)
XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection.
Biotechniques 5, 376-378.
- BUTLER, J.H., HU, S., BRADY, S.R., DIXON, M.W. und MUDAY, G.K. (1998)
In vitro and *in vivo* evidence for actin association of the naphtylphthalamic acid-binding protein from zucchini hypocotyls.
Plant J. 13, 291-301.
- CAO, H., JAMES, M.G. und MYERS, A.M. (2000)
Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm.
Arch. Biochem. Biophys. 373, 135-146.
- CARDINI, C.E., LELOIR, L.F. und CHIRIBOGA, J. (1955)
The biosynthesis of sucrose.
J. Biol. Chem. 214, 149-155.
- CARLSON, S.J. und CHOUREY, P.S. (1996)
Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize.
Mol. Gen. Genet. 259, 303-310.
- CARLSON, S.J., CHOUREY, P.S., HELENTJARIS, T. und DATTA, R. (2002)
Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene.
Plant Mol. Biol. 49, 15-29.
- CHIEN, C. T., BARTEL, P. L., STERNGLANZ, R. und FIELDS, S. (1991)
The two- hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582.
- CHIKANO, H., OGAWA, M., IKEDA, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T. und SANO, H. (2001)
Two novel genes encoding SNF-1 related protein kinases from *Arabidopsis thaliana*: differential accumulation of *AtSR1* and *AtSR2* transcripts in response to cytokinins and sugars, and phosphorylation of sucrose synthase.
Mol. Gen. Genet. 264, 674-681.
- CHEN, Y.-C. und CHOUREY, P.S. (1989)
Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: Immunohistological evidence.
Theor. Appl. Genet. 78, 5553-5559.
- CHOUREY, P.S., LATHAM, M.D. und STILL, P.E. (1986)
Expression of two sucrose synthase genes in endosperm and seedling cells of maize: evidence of tissue-specific polymerization of promoters.
Mol. Gen. Genet. 203, 251-255.
- CHOUREY, P.S., TALIERCIO, E.W., CARLSON, S.J. und RUAN, Y.-L. (1998)
Genetic evidence that the two isoenzymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis.
Mol. Gen. Genet. 259, 88-96.
- CHUONG, S.D., GOOD, A.G., TAYLOR, G.J., FREEMAN, M.C., MOORHEAD, G.B. und MUENCH, D.G. (2004)
Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells.
Mol. Cell Proteomics 3, 970-983.
- CHURCH, G.M. und GILBERT, W. (1984)
Genomic sequencing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 7624-7628.

- CLARKE, F.M. und MASTERS, J.C. (1975)
On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle.
Biochim. Biophys. Acta 318, 37-46.
- CLARKE, F.M. und MORTON, D.J. (1982)
Glycolytic enzyme binding in fetal brain-the role of actin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 388-393.
- CLORE, A.L., DANNENHOFFER, J.M. und LARKINS, B.A. (1996)
EF-1 α is associated with a cytoskeletal network surrounding protein bodies in maize endosperm cells.
Plant Cell 8, 2003-2014.
- COOPER, J.A. und SCHAFER, D.A. (2000)
Control of actin assembly and disassembly at filament ends.
Curr. Opin. Cell. Biol. 12, 97-103.
- COTGREAVE, I.A. und GERDES, R.G. (1998)
Recent trends in glutathione biochemistry. Glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?
Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 1-9.
- COX, D.N. und MUDAY, G.K. (1994)
NPA binding activity is peripheral to the plasma membrane and is associated with the cytoskeleton.
Plant Cell 6, 1941-1953.
- CRAIG, J., BARRATT, P., TATGE, H., DÉJARDIN, A., GARDNER, C.D., BARBER, L., WANG, T.L., HEDLEY, C.L., MARTIN, C. und SMITH, A.M. (1999)
Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase.
Plant J. 17, 353-362.
- CURATTI, L., PORCHIA, A.C., HERRERA-ESTRELLA, L. und SALERNO, G.L. (2000)
A prokaryotic sucrose synthase gene (*susA*) isolated from a filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium encodes a protein similar to those of plants.
Planta 211, 729-735.
- DALE, S., ARRÓ, M., BECERRA, B., MORRICE, N.G. BORONAT, A., HARDIE, D.G. und FERRER, A. (1995)
Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (Isoform HMGR1) from *Arabidopsis*, and its inactivation by phosphorylation at serin-577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase kinase.
Eur. J. Biochem. 233, 506-513.
- DAVIES, E., ABE, S., LARKINS, B.A., CLORE, A.M., QUATRANO, R.S. und WEIDNER, S. (1998)
The role of the plant cytoskeleton in plant protein synthesis.
In: BAILEYS-SERRES, J. und GALLIE, D.R. (Hrsg.) A Look Beyond Transcription: Mechanisms Determining mRNA Stability and Translation in Plants. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 115-124.
- DAVIES, E., Stankovic, B., Azama, K., Shibata, K. und Abe, S. (2001)
Novel components of the plant cytoskeleton: a beginning to plant 'cytomics'.
Plant Sci. 160, 185-196.
- DÉJARDIN, A., ROCHAT, C., WUILLÉM, S. und BOUTIN, J.-P. (1997)
Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds.
Plant Cell Environ. 20, 1421-1430.
- DELAGUILLAUMIE, A., LAGAUDRIERE-GESBERT, C., POPOFF, M.R. und CONJEAUD, H. (2002)
Rho GTPase link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes.
J. Cell. Sci. 115, 433-443.

- DELMER, D.P. (1999)
Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 50, 245-276.
- DELMER, D.P. und AMOR, Y. (1995)
Cellulose biosynthesis.
Plant Cell 7, 987-1000.
- DICKINSON, D.A. und FORMAN, H.J. (2002)
Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 973, 488-504.
- DOBLIN, M.S., KUREK, I., JACOB-WILK, D. und DELMER, D.P. (2002)
Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes.
Plant Cell Physiol. 43, 1407-1420.
- DOMINGUEZ, R. (2004)
Actin-binding proteins – a unifying hypothesis.
TIBS 11, 572-578.
- DOUGLAS, P., MORRICE, N. und MACKINTOSH, C. (1995)
Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves.
FEBS Lett. 377, 113-117.
- DROTAR, A., PHELPS, P. und FALL, R. (1985)
Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells.
Plant Science 42, 35-40.
- DURRIEU, C., BERNIER-VALENTIN, F. und ROUSSET, B. (1987)
Microtubules bind glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and modulate its enzyme activity and quaternary structure.
Arch. Biochem. Biophys. 252, 32-40.
- ENGSTROM, L. (1980)
Regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation-dephosphorylation.
In: COHEN, P. (Hrsg.) Molecular Aspects of Cellular Regulation. Recently Discovered Systems of Enzyme Regulation by Reversible Phosphorylation, Vol. 1. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, pp. 11-31.
- ERICKSON, H.P. und STOFFLER, D. (1996)
Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial *FtsZ* to α/β and γ tubulin.
J. Cell Biol. 135, 5-8.
- ESCHERICH, W. und ESCHERICH, B. (1987)
Control of phloem unloading by source activities and light.
Plant Physiol. Biochem. 25, 625-634.
- ETXEBERRIA, E. und GONZALEZ, P. (2003)
Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole.
J. Exp. Bot. 54, 1407-1414.
- FARRE, E.M., TIESSEN, A., ROESSNER, U., GEIGENBERGER, P., TRETHERWEY, R.N. und WILLMITZER, L. (2001)
Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method.
Plant Physiol. 127, 685-700.
- FEINGOLD, D.S. (1982)
Aldo (and keto) hexoses and uronic acids.
In: LOEWUS, F.A. und TANNER, W. (Hrsg.) Encyclopedia of Plant Physiology.
Springer Verlag (Berlin), pp. 3-76.
- FERNIE, A.R., WILLMITZER, L. und TRETHERWEY, R.N. (2002)

- Molecular and biochemical triggers of transition in molecular plant physiology.
Trends Plant Sci. 7, 35-41.
- FIELDS, S. und SONG, O. (1989)
A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature 340, 245-246.
- FIELDS, S. und STERNGLANZ, R. (1994)
The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions.
Trends Genet. 10, 286-292.
- FLORENCIO, F.J., YEE, B.C., JOHNSON, T.C. und BUCHANAN, B.B. (1988)
An NADP thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin *h* from spinach.
Arch. Biochem. Biophys. 266, 496-507.
- FOISSNER, I., LICHTSCHEIDL, I.K. und WASTENEYS, G.O. (1996)
Actin based vesicle dynamics and exocytosis during wound wall formation in *Characean* internodal cells.
Cell. Motil. Cytoskeleton 35, 35-48.
- FORSTHOEFEL, N.R., CUSHMAN, M.A.F. und CUSHMAN, J.C. (1995)
Posttranscriptional and postranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.
Plant Physiol. 108, 1185-1195.
- FRATELLI, M., DEMOL, H., PUYPE, M., CASAGRANDE, S., EBERINI, I., SALMONA, M., BONETTO, V., MENGOZZI, M., DUFFIEUX, F., MICLET, E., BACHI, A., VANDEKERCKHOVE, J., GIANAZZA, E. und GHEZZI, P. (2002)
Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 3505-3510.
- FU, H. und PARK, W.D. (1995)
Sink and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato.
Plant Cell 7, 1369-1385.
- GALIGNIANA, M.D., MORISHIMA, Y., GALLAY, P.A. und PRATT, W.B. (2004)
Cyclophilin-A is bound through its peptidylprolyl isomerase domain to the cytoplasmic dynein motor protein complex.
J. Biol. Chem. 31, 55754-55759.
- GEIGENBERGER, P. und STITT, M. (1991)
A „futile“ cycle of sucrose synthesis and degradation is involved in regulation partitioning between sucrose, starch and respiration in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings when phloem transport is inhibited.
Planta 185, 81-90.
- GEIGENBERGER, P. und STITT, M. (1993)
Sucrose synthase catalyzes a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues.
Planta 189, 329-339.
- GEIGENBERGER, P., FERNIE, A.R., GIBON, Y., CHRIST, M. und STITT, M. (2000)
Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers.
Biol. Chem. 381, 723-740.
- GEIGENBERGER, P. (2003)
Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers.
J. Exp. Bot. 54, 457-465.

- GEOURJON, C. und DELEAGE, G. (1995)
SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments.
Comput. Appl. Biosci. 11, 681-684.
- GERHARDT, R., STITT, M. und HELDT, H.W. (1987)
Subcellular metabolite levels in spinach leaves.
Plant Physiol. 83, 399-407.
- GIBON, Y., VIGEOLAS, H., TIESSEN, A., GEIGENBERGER, P. und STITT, M. (2002)
Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system.
Plant J. 30, 221-235
- GIEGÉ, P., HEAZLEWOOD, J.L., ROESSNER-TUNALI, U., MILLAR, A.H., FERNIE, A.R., LEAVER, C.J. und SWEETLOVE, L.J. (2003)
Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells.
Plant Cell 15, 2140-2151.
- GIETZ, R.D., ST. JEAN, A. und WOODS, R.A. (1992)
Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.
Nucleic Acid Res. 20, 1425.
- GILBERT, H.F. (1984)
Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange.
Meth. Enzymol. 107, 330-351.
- GILL S.C. und VON HIPPEL P.H. (1989)
Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.
Anal. Biochem. 182, 319-326.
- GITLITS, V.M., TOH, B.H., LOVELAND, K.L. und SENTRY, J.W. (2000)
The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules.
Eur. J. Cell Biol. 79, 104-111.
- GLEASON, F. K., und HOLMGREN, A. (1981)
Isolation and characterization of thioredoxin from the cyanobacterium, *Anabaena* sp.
J. Biol. Chem. 256, 8306- 8309
- GOUT, E., BOISSON, A.-M., AUBERT, S., DOUCE, R. und BIGNY, R. (2001)
Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies.
Plant Physiol. 125, 912-925.
- GRABSKI, S., ARNOYS, E., BUSCH, B. und SCHINDLER, M. (1998)
Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphates.
Plant Physiol. 116, 279-290.
- GROTE, M., VRTALA, S. und VALENTA, R. (1993)
Monitoring of two allergens, Bet vI and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting.
J. Histochem. Cytochem. 41, 745-750.
- GUARANTE, L. (1993)
Strategies for the identification of interacting proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1639-1641.
- GUGLIELMINETTI, L., ALPI, A. und PERATA, P. (1996)
Shrunken-1-encoded sucrose synthase is not required for the sucrose-ethanol transition in maize under anaerobic conditions.
Plant Physiol. 108, 735-741.

- GUTHRIE, C. und FINK, G.R. (1991)
Guide to yeast genetics and molecular biology. In: Methods in Enzymology. 194, 1-932.
Academic Press, san Diego.
- GUTIÉRREZ-ALCALÁ, G., GOTOR, C., MEYER, A.J., FRICKER, M., VEGA, J.M. und ROMERO, L.C. (2000)
Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11108-11113.
- HAIGLER, C.H. und BLANTON, R.L. (1996)
New hope for old dreams: Evidence that plant cellulose synthase genes have finally been identified.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12082-12085.
- HAIGLER, C.H., IVANOVA-DATCHEVA, M., GOGAN, P.S., SALNIKOV, V.V., HWANG, S., MARTIN, K. und DELMER, D.P. (2001)
Carbon partitioning to cellulose synthesis.
Plant Mol. Biol. 47, 29-51.
- HALFORD, N.G. und DICKINSON, J.R. (2001)
Sugar sensing and cell cycle control: evidence of cross-talk between two ancient signalling pathways. In: FRANCIS, D. (Hrsg.). The Plant Cell Cycle and its Interface. Sheffield: Sheffield Academic Press, pp. 87-107.
- HALFORD, N.G., HEY, S., JHURREEA, D., LAURIE, S., MC-KIBBIN, R.S., PAUL, M. und ZHANG, Y. (2003)
Metabolic signalling in carbon partitioning : role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase.
J. Exp. Bot. 54, 467-475.
- HANAHAH, D. (1983).
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- HANKS, S.K. und HUNTER, T. (1995)
Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.
FASEB J. 9, 576-96.
- HARDIE, D.G. (2000)
Plant protein serine/threonine protein kinases: classification into sub-families and overview of function.
Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology 32, 1-44.
- HARDIN, S.C., TANG, G.-Q., SCHOLZ, A., HOLTGRAEWE, D., WINTER, H. und HUBER, S.C. (2003)
Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis.
Plant J. 35, 588-603.
- HARDIN, S.C. und HUBER, S.C. (2004)
Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves.
Plant Physiol. Biochem. 42, 197-208.
- HARDIN, S.C., WINTER, H. und HUBER, S.C. (2004)
Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity.
Plant Physiol. 134, 1427-1438.
- HARPER, J.W., ADAMI, G.R., WEI, N., KEYOMARSI, K und ELLEDGE, S.J. (1993)
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.
Cell 75, 805-816.
- HARTMANN, T.N., FRICKER, M.D., RENNENBERG, H. und MEYER, A.J. (2003)
Cell-specific measurement of cytosolic glutathione in poplar leaves.
Plant Cell Environ. 26, 965-975.

- HATANO, S. (1994)
Actin-binding proteins in cell motility.
Int. Rev. Cytol. 165, 199-273.
- HÄNGGI, E. und FLEMING, A.J. (2001)
Sucrose synthase expression pattern in young maize leaves: implications for phloem transport.
Planta 214, 326-329.
- HESLOT, H. und GAILLARDIN, C. (Hrsg.) (1992)
Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeast.
CRC Press, Inc.
- HESSE, H. und WILLMITZER, L. (1996)
Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.)
Plant Mol. Biol. 30, 863-872.
- HIRAI, N., SONOBE, S. und HAYASHI, T. (1998)
In situ synthesis of β -glucan microfibrils on tobacco plasma membrane sheets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15102-15106.
- HOFFMANN, C.S. und WINSTON, F. (1987)
A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*.
Gene 57, 267-272.
- HOHNJEC, N., BECKER, J.D., PÜHLER, A., PERLICK, A.M. und KÜSTER, H. (1999)
Genomic organization and expression properties of the *MtSucS1* gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*.
Mol. Gen. Genet. 261, 514-522.
- HOLE, D.J., COBB, B.G., HOLE, P.S. und DREW, M.C. (1992)
Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea mays* following low-oxygen (hypoxic) acclimation.
Plant Physiol. 98, 1105-1114.
- HOLLAND, N., HOLLAND, D., HELENTJARIS, T., DHUGGA, K.S., XOCONOSTLE-CAZARES, B. und DELMER, D.P. (2000)
A comparative analysis of the plant cellulose synthase (*CesA*) gene family.
Plant Physiol. 123, 1313-1323.
- HOLMGREN, A. (1972)
Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin.
J. Biol. Chem. 247, 1992-1998.
- HONG, Z., ZHANG, Z., OLSEN, J.M. und VERMA, D.P.S. (2001)
A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate.
Plant Cell 13, 769-779.
- HUANG, J.-Z. und HUBER, S.C. (2001)
Phosphorylation of synthetic peptides by a CDPK and plant SNF1-related protein kinase. Influence of proline and basic amino acid residues at selected positions.
Plant Cell Physiol. 42, 1079-1087.
- HUBER, S.C. und AKAZAWA, T. (1986)
A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells.
Plant Physiol. 81, 1008-1013.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L., LIAO, P.-C., GAGE, D.A., MCMICHAEL, R.W., CHOUREY, P.S., HANNAH, L.C. und KOCH, K. (1996)
Phosphorylation of Ser-15 of maize leaf sucrose synthase: Occurrence *in vivo* and possible regulatory significance.
Plant Physiol. 112, 793-802.

- INGVARDSEN, C., UND VEIERSKOV, B. (2001)
Ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis in plants.
Plant Physiol. 112, 451-459.
- ITO, H., IWABUCHI, M. und OGAWA, K. (2003)
The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione.
Plant Cell Physiol. 44, 655-660.
- JAARMA, M. und RYDSTRÖM, J. (1969)
Studies on UDPglucose-fructose glucosyltransferase in potato tubers *in vitro* and *in vivo*.
Acta Chem. Scan. 23, 3443-3450.
- JAMES, P., HALLADAY, J. und CRAIG, E.A. (1996)
Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast.
Genetics 144, 1425-1436.
- JOST, W., BAUR, A., NICK, P., RESKI, R. und GORR, G. (2004)
A large plant β -tubulin family with minimal C-terminal variation but differences in expression.
Gene 340, 151-60.
- KADOTA, A., und WADA, M. (1992)
Photoorientation of chloroplasts in protonemal cells of the fern *Adiantum* as analyzed by use of a video-tracking system.
Bot. Mag. Tokyo 105, 265-279.
- KANDASAMY, M.K. und MEAGHER, R.B. (1999)
Actin-organelle interaction: Association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells.
Cell Motil. Cytoskeleton 44, 110-118.
- KANDASAMY, M.K., MCKINNEY, E.C. und MEAGHER, R.B. (1999)
The late pollen-specific actins in angiosperms.
Plant J. 18, 681-691.
- KAWAGOE, Y. UND DELMER, D.P. (1997)
Pathways and genes involved in cellulose biosynthesis.
Genet. Eng. 19, 63-87.
- KAWAMOTO, R.M. und CASWELL, A.H. (1985)
Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes.
Biochemistry 25, 656-661.
- KE, D., YAHIA, E., HESS, B., ZHOU, L., KADER, A.A. (1995)
Regulation of fermentative metabolism in avocado fruit under oxygen and carbon dioxide stresses.
J. Am. Soc. Hortic. Sci. 120, 481-49.
- KEEGAN, L., GILL, G. und PTASHNE, M. (1986)
Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein.
Science 231, 699-704.
- KEMP, B.E., PARKER, M.W., HU, S., TIGANIS, T. und HOUSE, C. (1994)
Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity.
Trends Biochem. Sci. 19, 440-444.
- KENNELLY, P.J. und KREBS, E.G. (1991)
Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases.
J. Biol. Chem. 266, 15555-15558.
- KIM, M., HEPLER, P.K., EUN, S.O., HA, K.S. und LEE, Y. (1995)
Actin Filaments in Mature Guard Cells Are Radially Distributed and Involved in Stomatal Movement.
Plant Physiol. 109, 1077-1084.

- KNULL, H.R. (1980)
Compartmentation of glycolytic enzymes in nerve endings as determined by glutaraldehyde fixation.
J. Biol. Chem. 255, 6439-6444.
- KNULL, H.R. UND WALSH, J.L. (1992)
Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton.
Current Topics in Cellular Regulation 33, 15-30.
- KOCH, K.E. (1996)
Carbohydrate-modulated gene expression in plants.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 509-540.
- KOCH, K. (2004)
Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development.
Curr. Opin. Plant Biol. 4, 387-391.
- KOCSY, G., BRUNNER, M., RÜEGSEGGER, A., STAMP, P. und BRUNOLD, C. (2001)
Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling.
Planta 198, 365-370.
- KÖNIG, J., BAIER, M., HORLING, F., KAHMANN, U., HARRIS, G., SCHÜRMMANN, P. und DIETZ, K.-J. (2002)
The plant-specific function of 2-cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 5738-5743.
- KOMATSU, A., MORIGUCHI, T., KOYAMA, K., OMURA, M. und AKIHAMA, T. (2002)
Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships.
J. Exp. Bot. 53, 61-71.
- KOMINA, O., ZHOU Y., SARATH, G. CHOLLET, R. (2002)
In vivo and *in vitro* phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase.
Plant Physiol. 129, 1664-1673.
- KRANNER, I. und GRILL, D. (1995)
Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development.
Bot. Acta 109, 8-14.
- KUMAGAI, H. UND SAKAI, H. (1983)
A porcine brain protein (35 K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
J. Biochem. 93, 1259-1269.
- KUREK, I., KAWAGOE, Y., JACOB-WILK, D., DOBLIN, D. und DELMER, D. (2002)
Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11109-11114.
- LAL, S.K., LEE, C. und SACHS, M.M. (1998)
Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize.
Plant Physiol. 118, 1285-1293.
- LALOI, C., RAYAPURAM, N., CHARTIER, Y., GRIENENBERGER, J.M., BONNARD, G. und MEYER, Y. (2001)
Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98, 14144-14149.
- LAEMMLI, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

- LEE, H., GUO, Y., OHTA, M., XIONG, L., STEVENSON, B. und ZHU, J.-K. (2002)
LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription, encodes a bi-functional enolase.
EMBO J. 21, 2692-2702.
- LESAGE, P., YANG, X. und CARLSON, M. (1996)
Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response.
Mol. Cell. Biol. 16, 1921-1928.
- LI, C.R., ZHANG, X.B. und HEW, C.S. (2003)
Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*.
Physiol. Plant. 118, 352-360.
- LI, X.-Q. und ZHANG, D. (2003)
Gene expression activity and pathway selection for sucrose metabolism in developing storage root of sweet potato.
Plant Cell Physiol. 44, 630-636.
- LICHTSCHEIDL, I.K. und URL, W.G. (1990)
Organization and dynamics of cortical endoplasmic reticulum in inner epidermal cells of onion bulb scales.
Protoplasma 157, 203-215.
- LINDBLOM, S., EK, P., MUSZYNSKA, G., EK, B., SZCZEGIELNIAK, J. und ENGSTROM, L. (1997)
Phosphorylation of sucrose synthase from maize seedlings.
Acta Biochim Pol. 44, 809-817.
- LIU, X. und YEN, L. (1992)
Purification and characterization of actin from maize pollen.
Plant Physiol. 99, 1151-1155.
- LJUNGSTROM, O., BERGLUND, L. und ENGSTROM, L. (1976)
Studies on the kinetic effects of adenosine-3':5'-monophosphate dependent phosphorylation of purified pig liver pyruvate kinase type L.
Eur. J. Biochem. 68, 497-506.
- LOEF, I., STITT, M und GEIGENBERGER, P. (1999)
Feeding orotate leads to a specific increase in uridine nucleotide levels, resulting in a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis in discs of growing potato tubers.
Planta 209, 314-323.
- LONE, Y.-C., SIMON, M.-P., KAHN, A. und MARIE, J. (1986)
Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of rat L-type pyruvate kinase.
FEBS Lett. 195, 97-100.
- LOOG, M., URI, A., JARV, J. und EK, P. (2000)
Bi-substrate analogue ligands for affinity chromatography of protein kinases.
FEBS Lett. 480, 244-248.
- LORENZ, M., POPP, D. und HOLMES, K.C. (1993)
Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm.
J. Mol. Biol. 234, 826-836.
- LOURET, O.F., DOIGNON, F. und CROUZET, M. (1997)
Stable DNA binding yeast vector allowing high bait expression for use in the two-hybrid system.
Biotechniques 23, 816-819.
- LOWE, S.L., ADRIAN, C., OUPOROVA, I.V., WAINGEH, V.F. und THOMASSON, K.A. (2003)
Brownian dynamics simulations of glycolytic enzymes subsets with F-actin.
Biopolymers 70, 456-470.

- LUNN, J.E. (2002)
Evolution of sucrose synthesis.
Plant Physiol. 128, 1490-1500.
- LUPAS, A., VAN DYKE, M. und STOCK, J. (1991)
Predicting coiled coils from protein sequences.
Sciences 252, 1162-1164.
- LUSHUK, J.A. und SALVEIT, M.E. (1991)
Effects of rapid changes in oxygen concentration on respiration in carrot roots. Physiol. Plant. 82, 559-568.
- MA, Y.Z und YEN, L.F. (1989)
Comparative studies of corn pollen actin and rabbit skeletal muscle actin.
Chinese Biochem. J. 5, 320.
- MACHESKY, L.M. und GOULD, K.L. (1999)
The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer.
Curr. Opin. Cell Biol. 11, 117-121.
- MANDELKOW, E.-M., HERRMANN, M. und RUHL, U. (1985).
Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies.
J. Mol. Biol. 185, 311-327.
- MANFIELD, I.W., ORFILA, C., MCCARTNEY, L., HARHOLT, J., BERNAL, A.J., SCHELLER, H.V., GILMARTIN, P.M., MIKKELSEN, J.D., PAUL KNOX, J. und WILLATS, W.G. (2004)
Novel cell wall architecture of isoxaben-habituated *Arabidopsis* suspension-cultured cells: global transcript profiling and cellular analysis.
Plant J. 40, 260-275.
- MARAÑA, C., GARCÍA-OLMEDO, F. und CARBONERO, P. (1990)
Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light.
Gene 88, 167-172.
- MARX, C., WONG, J.H. und BUCHANAN, B.B. (2003)
Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes.
Planta 216, 454-460.
- MASTERS, C.J., REID, S. und DON, M. (1987)
Glycolysis - new concepts in an old pathway.
Mol. Cell. Biochem. 76, 3-14.
- MASTERS, C. (1996)
On the role of cytoskeleton in metabolic compartmentation.
In: HESKETH, J.E. und PRYME, I.M. (Hrsg.) The Cytoskeleton: Role in Cell Physiology, Vol. 2, JAI Press, Greenwich, Conn., USA, pp. 1-30.
- MATIC, S., AKERLUND, H.E., EVERITT, E. und WIDELL, S. (2004)
Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells.
Plant Physiol. Biochem. 42, 299-306.
- MCDOWELL, J.M., HUANG, S., MCKINNEY, E.C., AN, Y.-Q. und MEAGHER, R.B. (1996a)
Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*.
Genetics 142, 587-602.
- MCDOWELL, J.M., AN, Y.Q., HUANG, S., MCKINNEY, E.C. und MEAGHER, R.B. (1996b)
The *Arabidopsis* ACT7 actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli.
Plant Physiol. 111, 699-711.
- MCMICHAEL, R.W. JR., BACHMANN, M. und HUBER, S.C. (1995a)
Spinach leaf sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinases *in vitro*.
Plant Physiol. 108, 1077-1082.

- McMICHAEL, R.W. JR., KOCHANSKY, J. KLEIN, R.R. und HUBER, S.C. (1995b)
Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase.
Arch. Biochem. Biophys. 321, 71-75.
- McNULTY, A.K. und SAUNDERS, M.J. (1992)
Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for
plant nuclear lamins.
J. Cell Sci. 103, 407-414.
- MEAGHER, R.B. und WILLIAMSON, R.E. (1994)
The plant cytoskeleton.
In: MEYEROWITZ, E.M. und SOMMERVILLE, C.R. (Hrsg.) *Arabidopsis*.
Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1049-1084.
- MEAGHER, R.B. und FECHHEIMER, M. (2003)
The Arabidopsis Cytoskeletal Genome.
In: SOMMERVILLE, C.R. und MEYEROWITZ, E.M. (Hrsg.) *The Arabidopsis Book*.
American Society of Plant Biologists, Rockville, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- MEISTER, A. (1995)
Glutathion metabolism.
Methods Enzymol. 251, 3-7.
- MITCHISON, T. und KIRSCHNER, M. (1984)
Dynamic instability of microtubule growth.
Nature 312, 237-242.
- MIZUNO, K. (1996)
Tubulin-containing granules in the plasma membranes of Azuki bean epicotyls and their
relationship to the synthesis of β -glucan.
Plant Cell Physiol. 37, (Suppl.) S20.
- MONTOLIU, L. RIGAU, J. und PUIGDOMENECH, P. (1989)
A tandem of α -tubulin genes preferentially expressed in radicular tissues of *Zea mays*.
Plant Mol. Biol. 14, 1-15.
- MOORHEAD, G.B.G. und PLAXTON, W.C. (1988)
Binding of glycolytic enzymes to a particulate fraction in carrot and sugar beet storage roots.
Plant Physiol. 68, 348-351.
- MORELL, M. und COPELAND, L. (1985)
Sucrose synthase of soybean nodules.
Plant Physiol. 78, 149-154.
- MUJER, C.V., FOX, T.C., WILLIAMS, A.S., ANDREWS, D.L. und KENNEDY, R.A. (1995)
Purification, properties and phosphorylation of anaerobically induced enolase in *Echinochloa*
phyllopogon and *E. crus-pavonis*.
Plant Cell Physiol. 36, 1459-1470.
- MULLINEAUX, P.M., KARPINSKI, S., JIMÉREZ, A., CLEARY, S.P., ROBINSON, C. und CREISSEN, G.P. (1998)
Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase.
Plant J. 13, 375-379.
- MULLINEAUX, P., BALL, L., ESCOBAR, C., KARPINSKA, B., CREISSEN, G. und KARPINSKI, S. (2000)
Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence
gene expression in response to excess excitation energy?
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 355, 1531-1540.
- NAKAI, T., KONISHI, T., ZHANG, X.Q., CHOLLET, R., TONOUCHE, N., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F., MORI, H., SAKAI,
F. und HAYASHI, T. (1998)
An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by *in*
vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser(11).
Plant Cell Physiol. 39, 1337-1341.

- NAKAI, T., TONOUCHE, N., KONISHI, T., TSUCHIDA, T., YOSHINAGA, F., SAKAI, F. und HAYASHI, T. (1999)
Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14-18.
- NGUYEN-QUOC, B., KRIVITZKY, M., HUBER, S. und LECHARNY, A. (1990)
Sucrose synthase in developing maize leaves: regulation of activity by protein level during the import to export transition.
Plant Physiol. 94, 516-523.
- OCHERETINA, O. und SCHEIBE, R. (1994)
Cysteins of chloroplast NADP-malate dehydrogenase form mixed disulfides.
FEBS Lett. 355, 254-258.
- O'REILLY, G. und CLARKE, F. (1993)
Identification of an actin binding region in aldolase.
FEBS Lett. 321, 69-72.
- PAGLIARO, L., KERR, K. und TAYLOR, D.L. (1989)
Enolase exists in the fluid phase of cytoplasm in 3T3 cells.
J. Cell Sci. 94, 333-342.
- PARK, M.H., SUZUKI, Y., CHONO, M., KNOX, J.P. und YAMAGUCHI, I. (2003)
CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation.
Plant Physiol. 131, 1450-1459.
- PEAR, J.R., KAWAGOE, Y., SCHRECHENGOST, W.E., DELMER, D.P. und STALKER, D.M. (1996)
Higher plants contain homologs of the bacterial *CeIA* genes encoding the catalytic subunits of cellulose synthase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12637-12642.
- PIEN, S., WYRZYKOWSKA, J. und FLEMING, A.J. (2001)
Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem.
Plant J. 25, 663-674.
- PIERSON, E.S. und CRESTI, M. (1992)
Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes.
Int. Rev. Cytol. 140, 73-125.
- PLAXTON, W.C. (1996)
The organization and regulation of plant glycolysis.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 185-214.
- POLLARD, T.D., ALMO, S., QUIRK, S., VINSON, V. und LATTMAN, E.E. (1994)
Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution.
Annu. Rev. Cell Biol. 10, 207-249.
- PONTIS, H.G., BABIO, J.R. und SALERNO, G. (1981)
Reversible unidirectional inhibition of sucrose synthase activity by disulfides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6667-6669.
- PORCHIA, A.C., CURATTI, L. und SALERNO, G.L. (1999)
Sucrose metabolism in cyanobacteria: sucrose synthase from *Anabaena* sp. strain PCC 7119 is remarkably different from the plant enzymes with respect to substrate affinity and amino-terminal sequence.
Planta 210, 34-40.
- PORTERFIELD, D.M., KUANG, A., SMITH, P.J.S., CRISPI, M.L. und MUSGRAVE, M.E. (1999)
Oxygen-depleted zones inside reproductive structures of *Brassicaceae*: implications for oxygen control of seed development.
Can. J. Bot. 77, 1439-1446.

- PREUSS, M.L., KOVAR, D.R., LEE, Y.-R.J., STAIGER, C.J., DELMER, D.P. und LIU, B. (2004)
A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers.
Plant Physiol. 136, 3945-3955.
- PURCELL, P.C., SMITH, A.M. und HALFORD, N.G. (1998)
Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-incucibility of sucrose synthase transcripts in leaves.
Plant J. 14, 195-202.
- QUEBEDEAUX, B. und HARDY, R.W.F. (1976)
Oxygen concentration: regulation of crop growth and productivity.
In: BURRIS, R.H. und BLACK, C.C. (Hrsg.) CO₂ Metabolism and Plant Productivity. University Park Press, Baltimore, pp. 185-204.
- REISS, N., HERMON, J., OPLATKA, A. und NAOR, Z. (1996a)
Interaction of purified protein kinase C with key proteins of energy metabolism and cellular motility.
Biochem. Mol. Biol. Int. 40, 1191-1200.
- REISS, N., OPLATKA, A., HERMON, J. und NAOR, Z. (1996b)
Phosphatidylserine directs differential phosphorylation of actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein kinase C: Possible implications for regulation of actin polymerization.
Biochem. Mol. Biol. Int. 38, 711-719.
- REITER, W.-D. (2002)
Biosynthesis and properties of the plant cell wall.
Curr. Opin. Plant Biol. 5, 536-542.
- REN, H., GIBBON, B.C., ASHWORTH, S.L., SHERMAN, D.M., YUAN, M. und STAIGER, C.J. (1997)
Actin purified from maize pollen functions in living plant cells.
Plant Cell 9, 1445-1457.
- RENNENBERGER, H. (1982)
Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants.
Phytochem. 21, 2771-2781.
- RICARD, B., VAN, T., CHOUREY, P. und SAGLIO, P. (1998)
Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant.
Plant Physiol. 116, 1323-1331.
- RIDGE, R.W. (1988)
Freeze-substitution improves the ultrastructural preservation of legume root hairs.
Bot. Mag. Tokyo. 101, 427-441.
- RIDLEY, B.L., O'NEILL, M.A. und MOHNEN, D. (2001)
Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling.
Phytochem. 57, 929-967.
- ROBINSON, D.G. (1996)
SuSy ergo GluSy: New developments in the field of cellulose biosynthesis.
Bot. Acta 109, 261-263.
- RÖHRIG, H., JOHN, M. und SCHMIDT, J. (2004)
Modification of soybean sucrose synthase by S-thiolation with ENOD40 peptide A.
Bioch. Biophys. Res. Commun. 325, 864-870.
- ROLLETSCHECK, H., BORISJUK, L., KOSCHORRECK, M., WOBUS, U. und WEBER, H. (2002)
Legume embryos develop in a hypoxic environment.
J. Exp. Bot. 53, 1-9.

- ROTHSCHILD, A., WALD, F.A., BOCCA, S.N. und TANDECARZ, J.S. (1996)
Inhibition of UDP-glucose: protein transglucosylase by a maize endosperm protein factor.
Cell Mol. Biol. 42, 645-651.
- ROUHIER, N., GELHAYE, E. und JACQUOT, J.-P. (2002)
Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants: II. The cytosolic and mitochondrial systems.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 973, 520-528.
- ROUHIER, N. und JACQUOT, J.-P. (2002)
Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes.
Photosyn. Res. 74, 259-268.
- RUAN, Y.L., CHOUREY, P.S., DELMER D.P. und PEREZ-GRAU, L. (1997)
The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed.
Plant Physiol. 115, 375-385.
- RUAN, Y.-L., LLEWELLYN, D.J. und FURBANK, R.T. (2003)
Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development.
Plant Cell 15, 952-964.
- RUDEN, D.M. (1992)
Activating regions of yeast transcription factors must have both acidic and hydrophobic amino acids.
Chromosoma 101, 342-348.
- RUDEN, D.M., MA, J., LI, Y., WOOD, K. und PTASHNE, M. (1991)
Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences.
Nature 350, 250-251.
- SALANOUBAT, M., und BELLIARD, G. (1989)
The steady state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis, and sucrose concentration.
Gene 84, 181-184.
- SALNIKOV, V.V., GRIMSON, M.J., DELMER, D.P. und HAIGLER, C.H. (2001)
Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements.
Phytochem. 57, 823-833.
- SALNIKOV, V.V., GRIMSON, M.J., SEAGULL, R.W. und HAIGLER, C.H. (2003)
Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibres.
Protoplasma 221, 175-184.
- SALVUCCI, M.E., VAN DE LOO, F.J. und KLEIN, R.R. (1995)
The structure of sucrose-phosphate synthase.
In: PONTIS, H.G., SALERNO, G.L. und ECHEVERRIA, E.J. (Hrsg.) *Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*. Vol. 14 (Current Topics in Plant Physiology: An American Society of Plant Physiologists Series), pp. 25-33.
- SAMAJ, J., BALUSKA, F., VOIGT, B., SCHLICHT, M., VOLKMANN, D. und MENZEL, D. (2004)
Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling.
Plant Physiol. 135, 1150-1161.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- SANGER, F., FRITSCH, E.F. und COULSON, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

- SCHÜRSMANN, P. und JACQUOT, J.-P. (2000)
Plant thioredoxin systems revisited.
Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 51, 371-400.
- SEAGULL, R.W. (1990)
The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers.
Protoplasma 159, 44-59.
- SEDBROOK, J.C., CHEN, R. und MASSON, P.H. (1999)
ARG1 (altered response to gravity) encodes a DnaJ-like protein that potentially interacts with the cytoskeleton.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1140-1145.
- SHANNON, J.C., PIEN, F.M. CAO, H. und LIU, K.C. (1998)
Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplasmidial synthesized ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperms.
Plant Physiol. 117, 1235-1252.
- SHAW, J.R., FERL, R.J., BAIER, J., ST. CLAIR, D., CARSON, C., MCCARTY, D.R. und HANNAH, L.C. (1994)
Structural features of the maize *sus1* gene and protein.
Plant Physiol. 106, 1659-1665.
- SHEEN, J. (1991)
Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes.
Plant Cell 3, 225-245.
- SLABNIK, E., FRYDMAN, R.B. und CARDINI, C.E. (1968)
Some properties of potato tuber UDPG:D-fructose-2-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.14) and UDPG: D-fructose-6-phosphate-2-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.13).
Plant Physiol. 43, 1063-1068.
- SLOCOMBE, S.P., BEAUDOIN, F., DONAGHY, P.G., HARDIE, D.G., DICKINSON, J.R. und HALFORD, N.G. (2004)
SNF1-related protein kinase (SnRK1) phosphorylates class I heat shock protein.
Plant Physiol. Biochem. 42, 111-116.
- SOMERS, M., ENGELBORGH, Y. und BAERT, J. (1990)
Analysis of the binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to microtubules, the mechanism of bundle formation and the linkage effect.
Eur. J. Biochem. 193, 437-444.
- STAIGER, C.J., GIBBON, B.C., KOVAR, D.R. und ZONIA, L.E. (1997)
Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants.
Trends Plant Sci. 2, 275-281.
- STAIGER, C.J. (2000)
Signaling to the actin cytoskeleton in plants.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 257-288.
- STEIN, A., KULA, M.R. und ELLING, L. (1998)
Combined preparative enzymatic synthesis of dTDP-6-deoxy-4-keto-D-glucose from dTDP and sucrose.
Glycoconjugate J. 15, 139-145.
- STITT, M. (1998)
Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP.
Bot. Acta 111, 167-2213.
- STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J. und DUBENDORFF, J.W. (1990)
The use of T7 polymerase to direct expression of cloned gene.
Methods Enzymol. 185, 60-89.

- SULLIVAN, D.M., WEHR, N.B., FERGUSON, M.M., LEVINE, R.L. und FINKEL, T. (2000)
Identification of oxidant-sensitive proteins: TNF-induced protein glutathiolation.
Biochemistry 39, 11121-11128.
- STURM, A. und TANG, G.-Q. (1999)
The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning.
Trends in Plant Sci. 4, 401-407.
- SU, J.-C. und PREISS, J. (1978)
Purification and properties of sucrose synthase from maize kernels.
Plant Physiol. 61, 389-393.
- SUBBIAH, C.C. und SACHS, M.M. (2001)
Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings.
Plant Physiol. 125, 585-594.
- SUGDEN, C., CRAWFORD, R.M., HALFORD, N.G. und HARDIE, D.G. (1999)
Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'AMP.
Plant J. 19, 433-439.
- SUN, J., LOBODA, T., SUNG, S.-J. und BLACK, C.C.J. (1992)
Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength.
Plant Physiol. 98, 1163-1169.
- SUNG, H.-Y. und SU, J.-C. (1977)
Sucrose synthase isoenzymes of pea seedlings - Purification and general properties.
Journal of Chinese Biochemical Society 6, 22-37.
- TAKAFUTA, T., WU, G., MURPHY, G. F und SHAPIRO, S. S. (1998)
Human b-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba.
J. Biol. Chem. 273, 17531-17538.
- TAN, Z. und BOSS, W.F. (1992)
Association of phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol monophosphate kinase, and diacylglycerol kinase with the cytoskeleton and F-actin fractions of carrot (*Daucus carota* L.) cells grown in suspension culture.
Plant Physiol. 100, 2116-2120.
- TANASE, K. und YAMAKI, S. (2000)
Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit.
Plant Cell Physiol. 41, 408-414.
- TANG, G.-Q., HARDIN, S.C., DEWEY R. und HUBER, S.C. (2003)
A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds.
Plant J. 34, 77-93.
- TELLAM, R.L., MORTON, D.J. und CLARKE, F.M. (1989)
A common theme in the amino-acid sequences of actin and many many actin-binding proteins?
Trends Biochem. Sci. 14, 130-133.
- TIESSEN, A., HENDRIKS, J.H.M., STITT, M., BRANSCHIED, A., GIBON, Y., FARRÉ, E.M. und GEIGENBERGER, P. (2002)
Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply.
Plant Cell 14, 2191-2213.
- TISDALE, E.J. (2002)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase C ι/λ and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway.
J. Biol. Chem. 277, 3334-3341.

- THOMSON, C.J. und GREENWAY, H. (1991)
Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations.
Plant Physiol. 96, 1294-1301.
- TSAI, C.Y., SALAMINI, F. und NELSON, O.E. (1970)
Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize.
Plant Physiol. 46, 299-306.
- VAN DEN ENT, F., AMOS, L.A. und LOWE, J. (2001)
Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton.
Nature 413, 39-44.
- VAN DONGEN, J.T., SCHURR, U., PFISTER, M. und GEIGENBERGER, P. (2003)
Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen.
Plant Physiol. 131, 1529-1543.
- VOLKER, K.W. und KNULL, H.R. (1997)
A Glycolytic enzyme binding domain on tubulin.
Arch Biochem. Biophys. 338, 237-243.
- VOLKMANN, D. und BALUŠKA, F. (1999)
Actin cytoskeleton in plants: From transport networks to signaling networks.
Microsc. Res. Tech. 47, 135-154.
- WALD, F.A., ROTHSCHILD, A., MORENO, S. und TANDECARZ, J.S. (1998)
Identification of a UPTG inhibitor protein from maize endosperm: high homology with sucrose synthase protein.
Cell Mol. Biol. 44, 397-406.
- WANG, J., BOJA, E.S., TAN, W., TEKLE, E., FALES, H.M., ENGLISH, S., MIEYAL, J.J. und CHOCK, P.B. (2001)
Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells.
J. Biol. Chem. 276, 47763-47766.
- WANG, W., VIGNANI, R., SCALI, M., SENSI, E. und CRESTI, M. (2004)
Post-translational modifications of α -tubulin in *Zea mays* L. are highly tissue specific.
Planta 218, 460-465.
- WASTENEYS, G.O. (2004)
Progress in understanding the role of microtubules in plant cells.
Curr. Opin. Plant Biol. 7, 651-660.
- WEINER, H. (1990)
Untersuchungen zur C4-Photosynthese: Permeabilität von Bündelscheidenzellen und Kompartimentierung von Metaboliten in Maisblättern.
Dissertation. Göttingen.
- WESCHKE, W., PANITZ, R., GUBATZ, S., WANG, Q., RADCHUK, R., WEBER, H. und WOBUS, U. (2003)
The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development.
Plant J. 33, 395-411.
- WHITE, R.G., BADEL, K., OVERALL, R.L. und VESK, M. (1994)
Actin associated with plasmodesmata.
Protoplasma 180, 169-184.
- WHITTAKER, M.M. und GLEASON, F.K. (1984)
Isolation and characterization of thioredoxin *f* from the filamentous cyanobacterium, *Anabaena* sp. 7119
J. Biol. Chem. 259, 14088-14093.
- WINKEL, B.S.L. (2004)
Metabolic channeling in plants.
Annu. Rev. Plant Biol. 55, 85-107.

- WINTER, H., HUBER, J.L. und HUBER, S.C. (1997)
Membrane association of sucrose synthase: Changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation.
FEBS Lett. 420, 151-155.
- WINTER, H., HUBER, J.L. und HUBER, S.C. (1998)
Identification of sucrose synthase as an actin binding protein.
FEBS Lett. 430, 205-208.
- WINTER, H. und HUBER, S.C. (2000)
Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes.
Crit. Rev. Plant. Sci. 19, 31-67.
- WOLOSIUK, R.W. und PONTIS, H.G. (1971)
Evidence of the existence of two forms of sucrose synthetase.
FEBS Lett. 16, 237-240.
- WOLOSIUK, R.A. und PONTIS, H.G. (1974a)
The role of sucrose and sucrose synthase in carbohydrate plant metabolism.
Mol. Cell. Biochem. 4, 115-123.
- WOLOSIUK, R.A. und PONTIS, H.G. (1974b)
Studies on sucrose synthetase – kinetic mechanism.
Arch. Biochem. Biophys. 165, 140-145.
- WU, Y., MUENCH, D.G., KIM, Y.-T., HWANG, Y.-S. und OKITA, T.W. (1998)
Identification of polypeptides associated with an enriched cytoskeleton-protein body fraction from developing rice endosperm.
Plant Cell Physiol. 39 1251-1257.
- YAFFE, M.B., RITTINGER, K., VOLINIA, S., CARON, P.R., AITKEN, A., LEFFERS, H., GAMBLIN, S.J., SMERDON, S.J. und CANTLEY, L.C. (1997)
The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity.
Cell 91, 961-971.
- YOYOTA, E., TAKAHARA, K. und SHIMMEN, T. (1998)
Actin-bundling protein isolated from pollen tubes of lily. Biochemical and immunocytochemical characterization.
Plant Physiol. 116, 1421-1429.
- ZENG, Y., WU, Y., AVIGNE, W.T. und KOCH, K.E. (1998)
Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses.
Plant Physiol. 116, 1573-1583.
- ZHANG, X.Q. und CHOLLET, R. (1997)
Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a Ca²⁺-dependent protein kinase.
FEBS Lett. 410, 126-130.
- ZHANG, X.Q., LUND, A.A., SARATH, G., CERNY, R.L., ROBERTS, D.M. und CHOLLET, R. (1999)
Soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100): further analysis of its phosphorylation using recombinant and authentic root-nodule enzymes.
Arch. Biochem. Biophys. 371, 70-82.
- ZHONG, R., MORRISON III, H., FRESHOUR, G.D., HAHN, M.G. und YE, Z.-H. (2003)
Expression of a mutant from cellulose synthase *AtCesA7* causes dominant effect on cellulose biosynthesis.
Plant Physiol. 132, 786-795.
- ZRENNER, R., SALANOUBAT, M., WILLMITZER, L. und SONNEWALD, U. (1995)
Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.).
Plant J. 7, 97-107.

Anhang

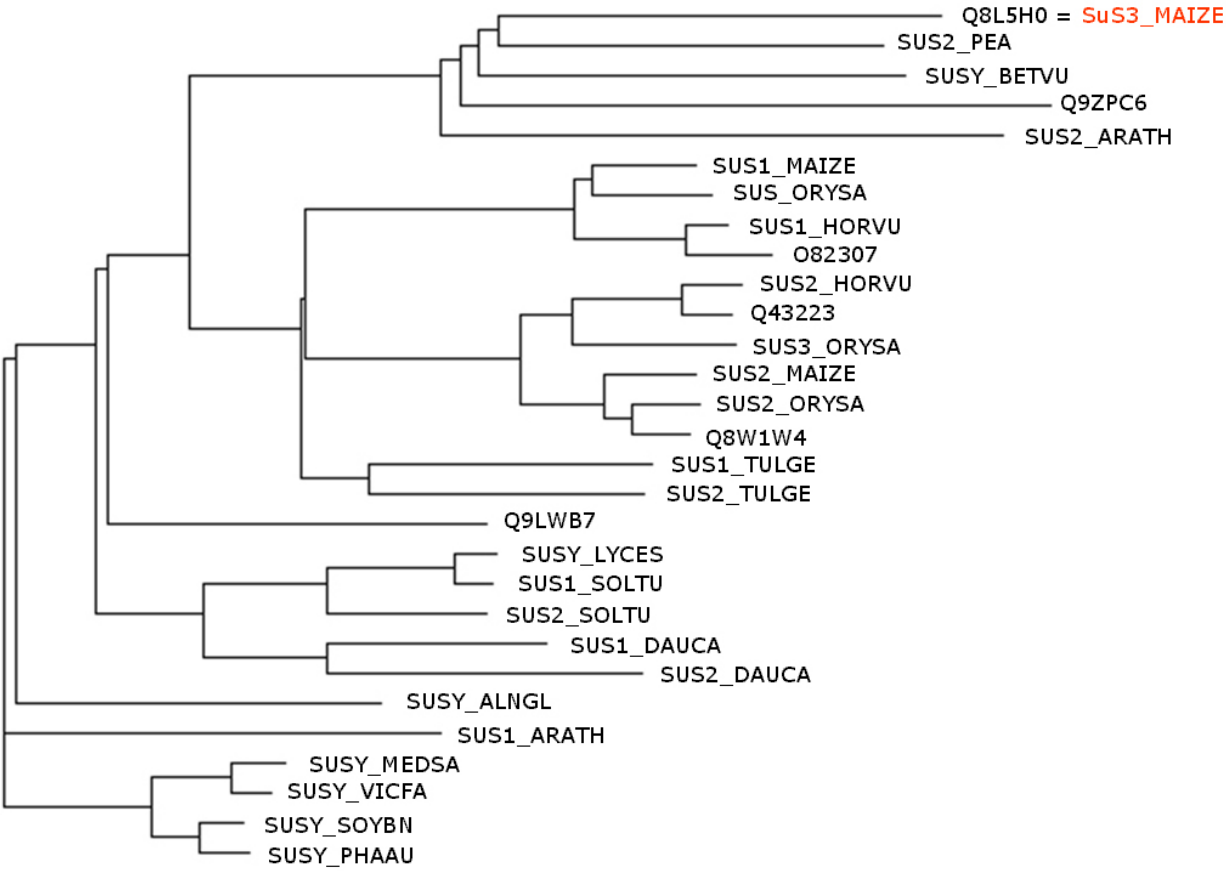
Abkürzungsverzeichnis

AC	Accession-Nummer
AD	Aktivierungs-Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors
ADPG	Adenosin-5'-diphosphat-Glucose
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BD	DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
cDNA	komplementäre DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
cfu	engl.: colony forming unit
cGPx	cytosolische Glutathionperoxidase
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
cpm	counts per minute
Ci	Curie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DO	Dropout
d.S.	der Sättigung
DTT	Dithiothreitol
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)- N,N,N',N'- tetraacetat
EK	Enterokinase
ε	molarer Extinktionskoeffizient
FW	Frischgewicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung; Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDPG	Guanosin-5'-diphosphat-Glucose
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GI	Genbank-Identifizierungsnummer
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino-1-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IAA	Jodessigsäure
IAM	Jodacetamid
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilo-Base
(k)Da	(Kilo-)Dalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria/Bertani-Medium
λ	Wellenlänge
mA	Milliampere

MCS	multiple cloning site, Polylinker
MES	2-(N-Morpholino)-ethan-sulfonat
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propan-sulfonat
MS	Murashige und Skoog Medium
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
N	beliebiges Nukleotid
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (-Phosphat), oxidierte Form
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (-Phosphat),, reduzierte Form
NDP	Nucleotid-5'-diphosphat
NDPG	Nucleotid-5'-diphosphat-Glucose
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Nuclear localisation sequence
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
Ω	Ohm
³² P	Phosphorisotop mit der rel. Masse 32
PAD	Polyclonal Antibody Designation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat- gepufferte Natriumchloridlösung
PEG	Polyethylenglycol
PI	Polymerisationsinduzierer
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur (25°C), Reverse Transkription
SD	Synthetic Dropout
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SSC	standard saline citrate buffer
ssDNA	Einzelstrang-DNA
UTR	untranslated region
SUS	Saccharose-Synthase
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TED	Tris-carboxymethylethylen-diamin (Metallchelator)
Tetr	Tetracyclin-Resistenz
T _m	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N',N', -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
U	Unit (= μmol Substratumsatz pro Minute)
UAS	engl. upstream activating sequence
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPG	Uridin-5'-diphosphat-Glucose
UDPG-DH	Uridin-5'-diphosphat-Glucose-Dehydrogenase
Upm	Umdrehungen pro Minute
V _{max}	Maximalaktivität, maximale Reaktionsgeschwindigkeit
var.	Varietät
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
μF	Mikrofarad
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-galaktopyranosid
X-α-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl α-D-galaktopyranosid

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten wurden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

Phylogramm verschiedener Saccharose-Synthasen



GenBank-Einträge; Sämtliche Einträge in die Datenbank beziehen sich auf Mais (*Z. mays*)

Accession-Nr. Protein	Nukleotid	Proteinprodukt	Name	EC-Nummer oder Domäne
AAM89473	AY124703	Sucrose synthase 3	SuS3	EC 2.4.1.13 Sucrose-UDP glucosyltransferase
AAM88847	AF520911	Glutathione peroxidase	GP	EC 1.11.1.9 GSHPx
AAT41588	AY623894	Putative pyruvate kinase	PK	EC 2.7.1.40
AAS21758	AY530961	dTDP-glucose 4,6-dehydratase		EC 4.2.1.46
AAT00629	AY588275	putative inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase		IU_nuc_hydro ; Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase. EC 3.2.2.1
AAS59399	AY486124	SNF1-related protein kinase (fragment)	SnrK1	KA1 ; Kinase associated domain 1.
AAS59400	AY486125	SNF1-related protein kinase	SnrK1	S_TKc ; Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain KA1 ; Kinase associated domain 1.
AAT90347	AY675583	Putative serine/threonine-specific protein kinase (fragment)	MKIN2	KA1 ; Kinase associated domain 1.
AAT01621	AY591340	putative ubiquitin-activating enzyme		APPBP1_RUB ; Ubiquitin activating enzyme (E1) subunit APPBP1 ThiF_MoeB_HesA ; Family of E1-like enzymes involved in molybdopterin and thiamine biosynthesis family.
AAT01622	AY591341	Putative RUB1 conjugating enzyme		UBCc ; Ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic (UBCc) domain.
AAU93515	AY746978	Putative beta 4 proteasome subunit		Proteasome ; Proteasome A-type and B-type
AAS21759	AY530962	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT3		AAA ; AAA-superfamily of ATPases; ATP binding site TIP49 ; DNA helicase TIP49, TBP-interacting protein [Transcription]
AAV65291	AY817492	Ubiquitin-conjugating enzyme E2		UBCc ; Ubiquitin-conjugating enzyme E2, catalytic (UBCc) domain.
AAU93690	AY744160	Putative 14-3-3 protein		14_3_3 ; 14-3-3 homologues mediates signal transduction by binding to phosphoserine-containing proteins.

Accession-Nr. Protein	Accession-Nr. Nukleotid	Proteinprodukt	Name	EC-Nummer oder Domäne
AAT75013	AY672654	Ethylene-responsive factor-like protein 1	ERF1	AP2 ; DNA-binding domain found in transcription regulators in plants such as APETALA2 and EREBP (ethylene responsive element binding protein).
AAT90346	AY675582	RuBisCo subunit binding-protein β -subunit	chaperonin β -subunit	Cpn60_TCP1 ; TCP-1/cpn60 chaperonin family. This family includes members from the HSP60 chaperone family and the TCP-1 (T-complex protein) family.
AAV31120	AY758355	Senescence-associated protein DH		Tetraspannin ; Tetraspanin family.
AAU86895	AY738148	Isopentenyl-diphosphate δ isomerase 2	IDI2	IF-2B ; Initiation factor 2 subunit family.
AAV28625	AY754697	Immunophilin		FKBP_C ; FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.
AAV28626	AY754698	Bet v I allergen		Bet_v_I ; Pathogenesis-related protein Bet v I family.
AAS77873	AY572955	Putative peptide N-glycanase (Fragment)	PNGase	
AAV28624	AY754696	Brain protein 44-like		UPF0041 ; Uncharacterised protein family.
AAV28627	AY754699	Putative 60S ribosomal protein L31		Ribosomal_L31e ; Ribosomal protein L31e.
AAV31119	AY758353	Ribosomal protein S10p/S20e		Ribosomal_S10 ; Ribosomal protein S10p/S20e. This family includes small ribosomal subunit S10 from prokaryotes and S20 from eukaryotes.
AAU89121	AY740527	Expressed protein DH12		ähnlich Transcription factor or Zinc finger protein
AAV31468	AY763108	DANA		
AAV32499	AY758354	Hypothetical protein		
AAT01623	AY591342	Collagen alpha1-like protein		
AAW34261	AY821915	DANA2		

Lokalisation synthetischer Peptide innerhalb der Proteinsequenz der Saccharose-Synthase aus *Z. mays*

SUS1 Aminossäuresequenz (AC: P49036). Die zu den synthetischen Peptiden korrespondierenden Aminosäuren sind rot dargestellt und unterstrichen. Die Peptidbezeichnungen sind in Blau dargestellt. Fett gedruckt sind die Phosphorylierungsstellen Ser-15 und Ser-170).

M G E G A G D R V L S R L H S V R E R I G D S L S A H P N E L V A V F T R L K N L G K G M
SS19
L Q P H Q I I A E Y N N A I P E A E R E K L K D G A F E D V L R A A Q E A I V I P P W V A
SS22
L A I R P R P G V W E Y V R V N V S E L A V E E L R V P E Y L Q F K E Q L V E E G P N N N
F V L E L D F E P F N A S F P R P S L S K S I G N G V Q F L N R H L S S K L F H D K E S M
NR28
Y P L L N F L R A H N Y K G M T M M L N D R I R S L S A L Q G A L R K A E E H L S T L Q A
SS23 **SS26**
D T P Y S E F H H R F Q E L G L E K G W G D C A K R A Q E T I H L L L D L L E A P D P S T
SS9
L E K F L G T I P M V F N V V I L S P H G Y F A Q A N V L G Y P D T G G Q V V Y I L D Q V
R A M E N E M L L R I K Q C G L D I T P K I L I V T R L L P D A T G T T C G Q R L E K V L
SuSpH
G T E H C H I L R V P F R T E N G I V R K W I S R F E V W P Y L E T Y T D D V A H E I A G
SS12 **SS10 (SS18)**
E L Q A N P D L I I G N Y S D G N L V A C L L A H K M G V T H C T I A H A L E K T K Y P N
S D L Y W K K F E D H Y H F S C Q F T T D L I A M N H A D F I I T S T F Q E I A G N K D T
V G Q Y E S H M A F T M P G L Y R V V H G I D V F D P K F N I V S P G A D L S I Y F P Y T
E S H K R L T S L H P E I E E L L Y S Q T E N T E H K F V L N D R N K P I I F S M A R L D
R V K N L T G L V E L Y G R N K R L Q E L V N L V V V C G D H G N P S K D K E E Q A E F K
SS21
K M F D L I E Q Y N L N G H I R W I S A Q M N R V R N G E L Y R Y I C D T K G A F V Q P A
F Y E A F G L T V V E A M T C G L P T F A T A Y G G P A E I I V H G V S G Y H I D P Y Q G
D K A S A L L V D F F D K C Q A E P S H W S K I S Q G G L Q R I E E K Y T W K L Y S E R L
M T L T G V Y G F W K Y V S N L E R R E T R R Y L E M L Y A L K Y R T M A S T V P L A V E
SuSCT
G E P S S K

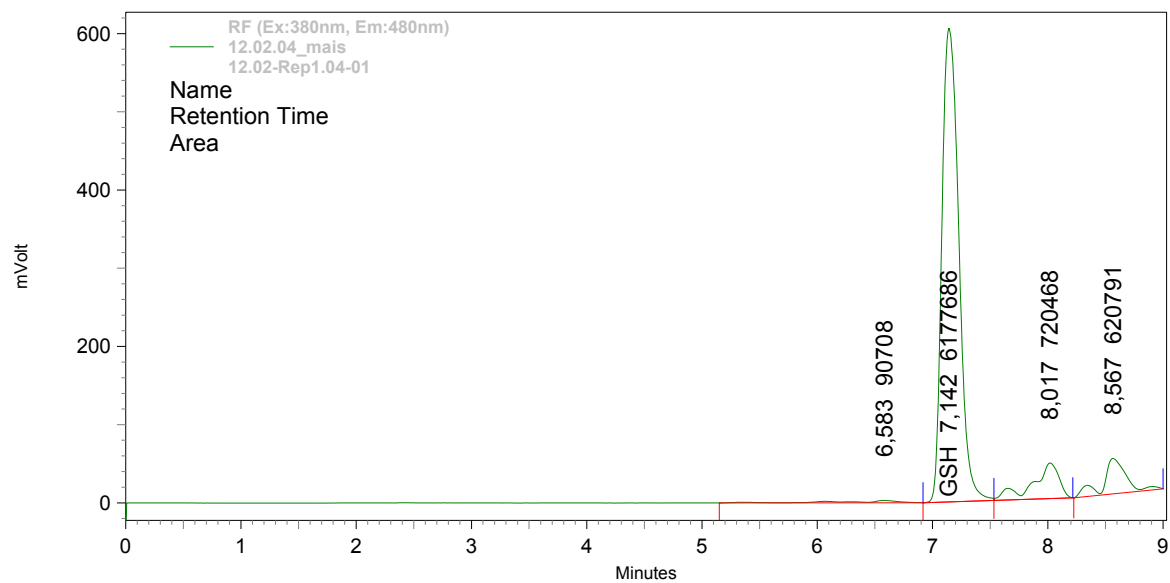
Aminosäurecode

Ein-Buchstabencode	Drei-Buchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Try	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

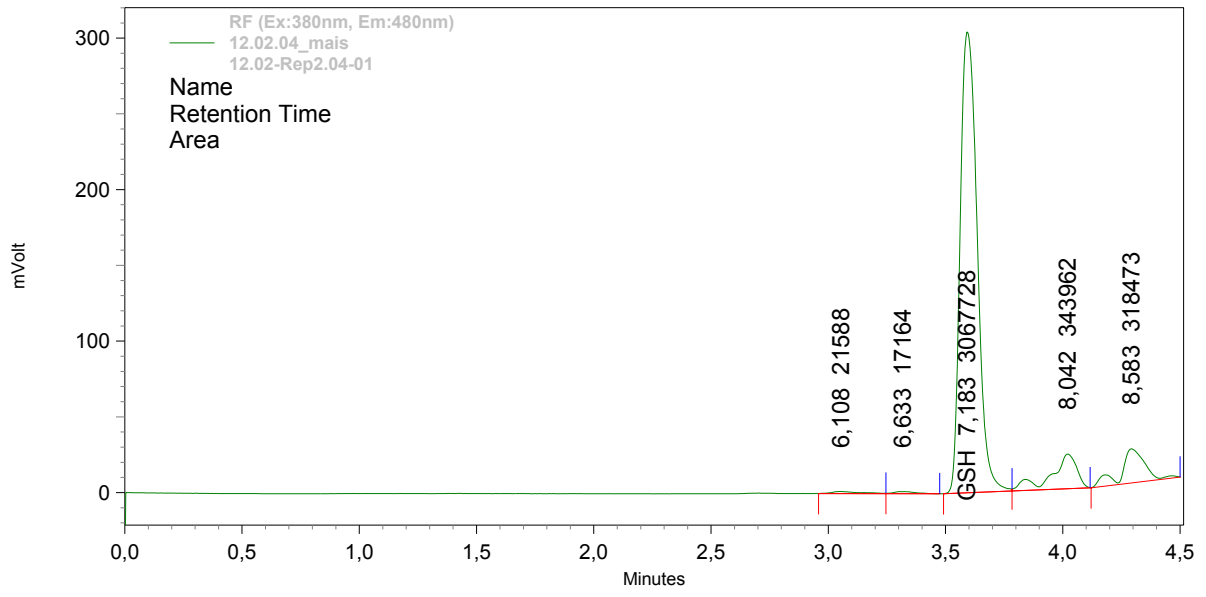
Chromatogramme zur Standardisierung der HPCL mit GSH und GSSG

Dargestellt sind Retentionszeiten von reduziertem Glutathion (GSH). Mit freundlicher Genehmigung von Sabrina Jung (Universität Osnabrück)

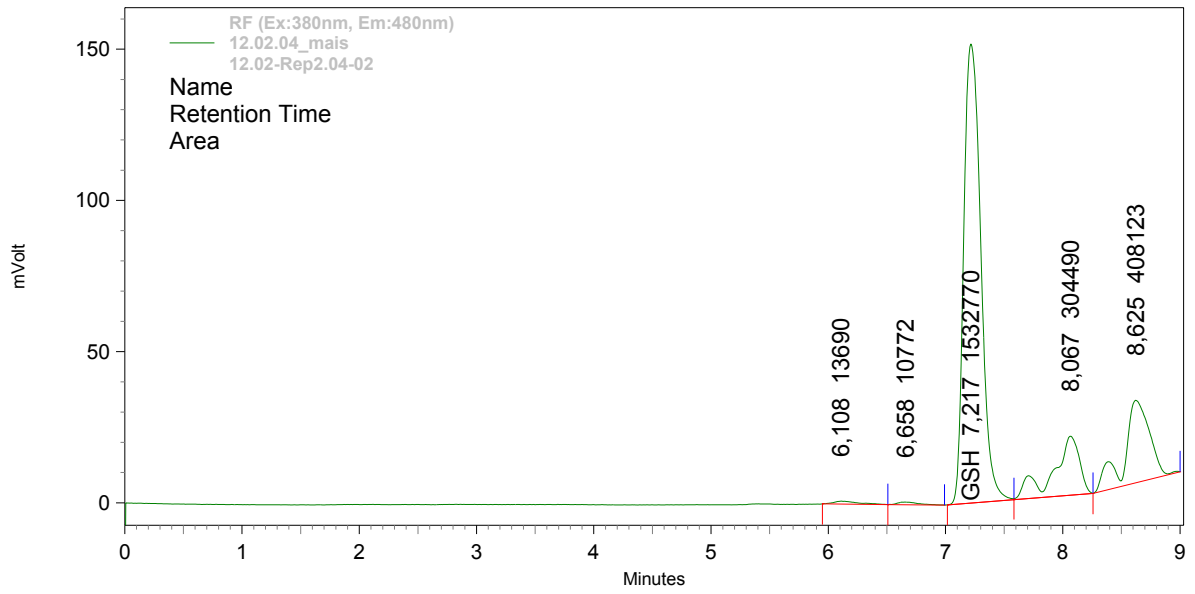
Glutathion red. Externer Standard 0,333 nMol

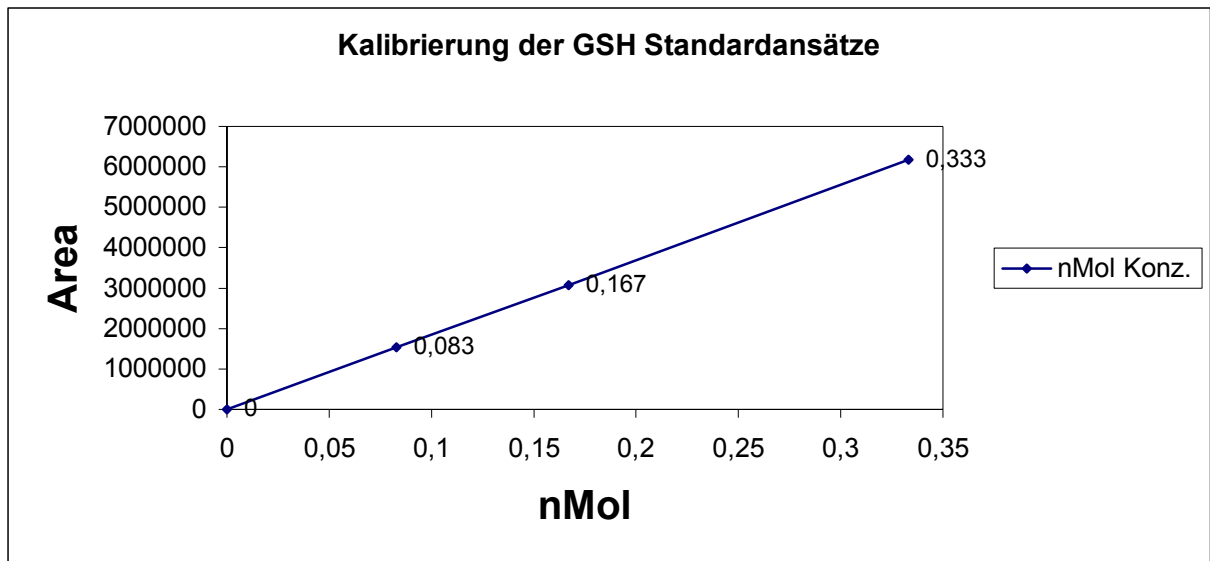
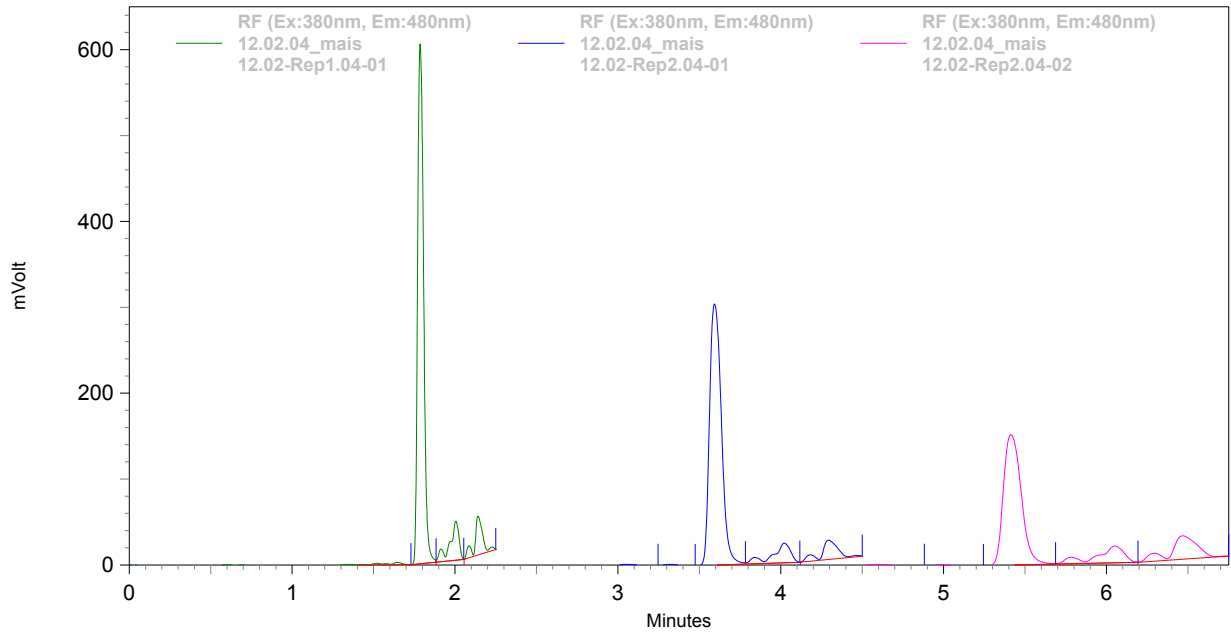


Glutathion red. Externer Standard 0,133 nMol



Glutathion red. Externer Standard 0,083 nMol





Accession-Nummern von SUS-Proteinen

Protein	Accession-Nr.	Spezies
SUS2_MAIZE	P49036	<i>Zea mays</i>
SUS2_ORYSA	P31924	<i>Oryza sativa</i>
Q8W1W4	Q8W1W4	<i>Bambusa oldhamii</i>
Q43223	Q43223	<i>Tricium aestivum</i>
SUS2_HORVU	P31923	<i>Hordeum vulgare</i>
SUS3_ORYSA	Q43009	<i>Oryza sativa</i>
SUS2_TULGE	Q41607	<i>Tulipa gesneriana</i>
SUS1_TULGE	Q41608	<i>Tulipa gesneriana</i>
SUS1_MAIZE	P04712	<i>Zea mays</i>
SUS1_ORYSA	P30298	<i>Oryza sativa</i>
SUS1_HORVU	P31922	<i>Hordeum vulgare</i>
O82073	O82073	<i>Tricium aestivum</i>
SUSY_SOYBN	P13708	<i>Glycine max</i>
SUSY_PHA AU	Q01390	<i>Phaseolus aureus</i>
Q9LWB7	Q9LWB7	<i>Chenopodium rubrum</i>
SUSY_MEDUSA	O65026	<i>Medicago sativa</i>
SUSY_VICFA	P31926	<i>Vicia faba</i>
SUS1_SOLTU	P10691	<i>Solanum tuberosum</i>
SUSY_LYC ES	P49037	<i>Lycopersicon esculentum</i>
SUS2_SOLTU	P49039	<i>Solanum tuberosum</i>
SUSY_ALNGL	P49034	<i>Alnus glutinosa</i>
SUS1_DAUCA	P49035	<i>Daucus carota</i>
SUS1_ARATH	P49040	<i>Arabidopsis thaliana</i>
SUS2_PEA	O24301	<i>Pisum sativum</i>
SUS2_DAUCA	O49845	<i>Daucus carota</i>
SUSY_BETUV	Q42652	<i>Beta vulgaris</i>
SUS3_MAIZE	Q8L5H0	<i>Zea mays</i>
SUS2_ARATH	Q00917	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Q9ZPC6	Q9ZPC6	<i>Craterostigma plantagineum</i>

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ferner versichere ich, die vorliegende Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form anderen Prüfungsbehörden vorgelegt zu haben.

Osnabrück, Februar 2005

.....
Daniela Holtgräwe

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Holtgräwe
Vorname: Daniela Luise
Geburtsdatum: 19.03.1975
Geburtsort: Ibbenbüren
Konfession: evangelisch
Anschrift: Ernst-Sievers-Straße 28, 49078 Osnabrück

Schulischer Werdegang:

08.1981 - 07.1985 Gemeinschafts Grundschule Westerkappeln Stadt
08.1985 - 05.1994 Kardinal-von-Galen-Schule, staatlich genehmigtes
privates Gymnasium, Mettingen; Abitur

Beruflicher Werdegang:

01.10.1994 Immatrikulation an der Universität Osnabrück
Studiengang: LA an Gymnasien,
Fachrichtung: Biologie/Mathematik

SS 96 Wechsel der Fachrichtung: Biologie/Geographie
28.10.1996 Zwischenprüfung im Fach Biologie
30.04.1998 Zwischenprüfung im Fach Geographie

01.12.2000 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien
im Lande Niedersachsen in den Prüfungsfächern:
Pädagogik einschl. Schulpädagogik, Pädagogische
Psychologie, Biologie, Erdkunde.
Thema der Arbeit: „Charakterisierung der Assoziation
der Saccharose-Synthase mit Aktinfilamenten“
Gutachter: Prof. Dr. R. Scheibe, Prof. Dr. H. Hurka

01.01.2001 bis 31.12.2004 Wissenschaftliche Angestellte der Universität
Osnabrück im Fachbereich Biologie/Chemie Abteilung
Pflanzenphysiologie.
Promotionsstudiengang mit dem Dissertationsthema:
„Mechanismus und Regulation der subzellulären
Lokalisation von Saccharose-Synthase“ Projektträger:
DFG-Geschäftszeichen: WI 187671-1 und SFB 431.

Seit 01.01.2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Lehrstuhls für
Genomforschung; Universität Bielefeld,
Prof. Dr. B. Weißhaar.