

Regulation, Struktur und zelluläre Lokalisation von
Proteinen der Fettsäureelongation in *Zea mays* L.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften am
Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Marco Littek
aus Hamburg

Hamburg
November 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. U. WIENAND
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. LÖRZ

Tag der Disputation: 17. Dezember 2004

Hamburg, den 03. Dezember 2004



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arno Frühwald'.

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| I. | Inhaltsverzeichnis..... | I |
| II. | Abkürzungsverzeichnis..... | IV |
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Die Bedeutung der sehr langkettigen Fettsäuren für die Pflanze..... | 1 |
| 1.2 | Die Biosynthese von sehr langkettigen Fettsäuren in Pflanzen | 2 |
| 1.2.1 | Der Fettsäuresynthesekomplex (FAS) | 3 |
| 1.2.2 | Der Fettsäureelongationskomplex (FAE)..... | 5 |
| 1.2.2.1 | Regulation der FAE-Komplexenzyme..... | 9 |
| 1.2.2.2 | Lokalisation der FAE-Komplexenzyme | 10 |
| 1.2.2.3 | Struktur des FAE-Komplexes..... | 12 |
| 1.2.3 | Die "glossy"-Mutationen von <i>Zea mays</i> | 14 |
| 1.3 | Strategien zur Untersuchung von Genen und Proteinen | 16 |
| 1.3.1 | Das Twohybrid-System | 17 |
| 1.3.1.1 | <i>Gal4</i> -Hefe-Twohybrid-System..... | 17 |
| 1.3.1.2 | Membranbasiertes Twohybrid-System | 19 |
| 1.3.2 | Biolistische Transformation, "green fluorescent protein" (<i>GFP</i>) und Proteinsortierung | 21 |
| 1.3.2.1 | Biolistische Transformation und "green fluorescent protein" (<i>GFP</i>)..... | 21 |
| 1.3.2.2 | Proteinsortierung in der Zelle..... | 22 |
| 1.4 | Ziele der Arbeit | 23 |
| 2. | Material und Methoden | 25 |
| 2.1 | Material..... | 25 |
| 2.1.1 | Chemikalien..... | 25 |
| 2.1.2 | Molekularbiologische Kits..... | 25 |
| 2.1.3 | Vektoren | 26 |
| 2.1.4 | Bakterien- und Hefestämme..... | 26 |
| 2.1.5 | Maislinie | 27 |
| 2.2 | Methoden..... | 27 |
| 2.2.1 | Bakterien | 27 |
| 2.2.1.1 | Anzucht von Bakterienkulturen und Aufbewahrung | 27 |

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.1.2 | Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen..... | 28 |
| 2.2.1.3 | Transformation chemokompetenter Bakterienzellen..... | 28 |
| 2.2.2 | DNA..... | 28 |
| 2.2.2.1 | Plasmid-DNA Mini Präparation (TENS)..... | 28 |
| 2.2.2.2 | Plasmid-DNA Midi Präparation..... | 29 |
| 2.2.2.3 | Restriktion von DNA..... | 30 |
| 2.2.2.4 | Präparation von genomischer DNA aus Pflanzen..... | 30 |
| 2.2.2.5 | Auftrennung von DNA im elektrischen Feld..... | 30 |
| 2.2.2.6 | Elution von DNA aus Agarosegelen..... | 30 |
| 2.2.2.7 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 31 |
| 2.2.2.8 | Southernblot..... | 31 |
| 2.2.2.9 | Radioaktive Sondenmarkierung und DNA-Hybridisierung..... | 31 |
| 2.2.2.10 | DNA-Amplifikation durch PCR..... | 32 |
| 2.2.2.11 | Sequenzierung von DNA..... | 32 |
| 2.2.2.12 | Transformation, Expression und Visualisierung von <i>GFP</i> -Konstrukten in Pflanzen..... | 33 |
| 2.2.3 | RNA..... | 35 |
| 2.2.3.1 | Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe..... | 35 |
| 2.2.3.2 | Auftrennung von RNA im elektrischen Feld..... | 35 |
| 2.2.3.3 | Northernblot..... | 36 |
| 2.2.3.4 | Radioaktive Sondenmarkierung und RNA-Hybridisierung..... | 36 |
| 2.2.4 | Hefen..... | 36 |
| 2.2.4.1 | Anzucht der Hefe <i>S. cerevisiae</i> und Lagerung..... | 36 |
| 2.2.4.2 | Co-Transformation von zwei Vektoren in Hefe..... | 36 |
| 2.2.4.3 | Sequentielle Transformation von zwei Vektoren in Hefe (library screening)..... | 37 |
| 2.2.4.4 | Colorimetrischer <i>lacZ</i> -Assay nach der "filter lift"- Methode..... | 38 |
| 2.2.4.5 | Colorimetrischer <i>lacZ</i> -Assay nach der Dot Blot Methode..... | 39 |
| 2.2.4.6 | Photometrischer <i>lacZ</i> -Assay..... | 40 |
| 2.2.4.7 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe (yeast boiling mini prep)..... | 40 |
| 2.2.4.8 | Transformation von Plasmid-DNA aus Hefe in <i>E.coli</i> | 41 |
| 3. | Ergebnisse..... | 42 |
| 3.1 | Untersuchungen zur Regulation der Fettsäureelongation in <i>Zea mays</i> L. ... | 43 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.1.1 | Expressionsanalyse von <i>ZmKCS-1</i> | 44 |
| 3.1.2 | Experimente zur Interaktion von <i>ZmKCS-1</i> mit anderen Proteinen ... | 45 |
| 3.1.2.1 | Twohybrid Versuche zur Isolierung von Interaktionspartnern für <i>ZmKCS-1</i> | 46 |
| 3.1.2.2 | Quantitative Enzym-Assays zur Bestimmung von Interaktionsstärken von <i>ZmKCS-1</i> und anderen Proteinen.... | 53 |
| 3.1.3 | Daten und Versuche zum putativen <i>ZmKCS-1</i> Interaktionspartner <i>PRP23</i> (Klon 23) | 61 |
| 3.2 | Untersuchungen zur Lokalisation von <i>ZmKCS-1</i> und <i>PRP23</i> in der Zelle .. | 65 |
| 3.2.1 | Herstellung der <i>GFP</i> -Konstrukte | 65 |
| 3.2.2 | Nachweis der <i>GFP</i> -Fusionsproteine in transient transformierten Geweben | 66 |
| 3.3 | Expressionsanalysen von FAE-Komplex Komponenten in verschiedenen "glossy"-Mutanten | 69 |
| 4. | Diskussion | 73 |
| 4.1 | Interaktionsexperimente von FAE-Komplexenzymen in verschiedenen Twohybrid-Systemen | 74 |
| 4.1.1 | Vorteile und Limitierungen des Hefe-Twohybrid-Systems | 74 |
| 4.1.2 | Mögliche Interaktionspartner von <i>ZmKCS-1</i> | 78 |
| 4.1.2.1 | <i>PRP23</i> : Ein kleines prolinreiches Protein ist als putativer Bindungspartner von <i>ZmKCS-1</i> möglicherweise am FAE-Komplex beteiligt | 78 |
| 4.1.2.2 | <i>ZmKCS-1</i> : Die β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 aus Mais scheint eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen zu besitzen und bildet möglicherweise Homodimere..... | 90 |
| 4.1.2.3 | <i>Glossy8</i> : Das Produkt des <i>glossy8</i> -Gens, eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, scheint nicht mit <i>ZmKCS-1</i> zu interagieren | 93 |
| 4.2 | Der FAE-Komplex ist möglicherweise ER-assoziiert | 95 |
| 4.3 | Expressionsstudien von <i>ZmKCS-1</i> und <i>PRP23</i> in "glossy"-Mutanten von <i>Zea mays</i> L. | 96 |
| 4.4 | Ausblick | 98 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 104 |
| 6. | Literatur | 107 |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| ACBP | Acyl-CoA-bindendes Protein |
| ACP | Acyl-Carrier-Protein |
| AD | Aktivierungsdomäne |
| ade-2 | Gen der Adenin-Biosynthese |
| Amp | Ampicillin |
| Amp ^R | Ampicillin Resistenz |
| AS | Aminosäure |
| 3-AT | 3-Amino-(1,2,4)-Triazol |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BD | Bindedomäne |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| Cam | Chloramphenicol |
| Cam ^R | Chloramphenicol Resistenz |
| cDNA | (engl.) komplementäre DNA |
| CoA | Coenzym A |
| C-terminal | carboxyterminal |
| Cub | C-terminale UE Ubiquitin |
| Cut | Cuticula |
| dest. | destilliert |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | (engl.) Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| <i>Ds</i> | <i>Duniella salina</i> |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| ec W | epicuticuläre Wachsschicht |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | (engl.) Ethylendiamintetraessigsäure |
| EL | ER-Lumen |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| <i>et al.</i> | (lat.) und Mitarbeiter |
| FAE | (engl.) Fettsäureelongation |
| FAS | (engl.) Fettsäuresynthese |
| FS | Fettsäure |
| G | Guanin |
| <i>GFP</i> | (engl.) green fluorescent protein |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| Go | Golgi |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| His | Histidin |
| <i>HIS3</i> | Gen der Histidin-Biosynthese |
| Kan ^R | Kanamycin Resistenz |
| KAS | β-Ketoacyl-ACP-Synthase |
| kb | Kilobasenpaare |
| KCS | β-Ketoacyl-CoA-Synthase |
| kDa | kilo Dalton |
| <i>lacZ</i> | β-Galaktosidase-Gen |
| LC | Lamin C |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| <i>LexA</i> | Transkriptionsaktivator |
| Leu | Leucin |
| <i>LEU2</i> | Gen der Leucin-Biosynthese |
| LiAc | Lithiumacetat |
| LTP | (engl.) Lipid Transfer Protein |
| MCS | (engl.) multiple Klonierungsstelle |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |
| min | (engl.) Minuten |
| MOPS | 4-Morpholinopropansulfonsäure |
| mRNA | (engl.) Boten-RNA |
| N | Nukleus |
| N-terminal | aminoterminal |
| Nub | N-terminale UE Ubiquitin |
| NubG | mutierte N-terminale UE Ubiquitin |
| OD | optische Dichte |
| oNPG | ortho-Nitrophenyl-β-D-pyrogalaktosid |
| ORF | (engl.) offener Leserahmen |
| PAM | (engl.) plasmamembrane-associated membranes |
| PCR | (engl.) Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| pfu | (engl.) Plaque-bildende Einheit |
| pH | Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PL | Plasmalemma |
| PM | Plasmamembran |
| PRP | Prolinreiches Protein |
| PS | Plasmastränge |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--|
| RNA | (engl.) Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | (engl.) Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SA | Signal-Anker |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| sec | (engl.) Sekunden |
| SD | (engl.) Synthetic Drop-Out |
| SDS | (engl.) Natriumdodecylsulfat |
| SP | Signal-Peptid |
| SRP | (engl.) signal recognition particle |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Trp | Tryptophan |
| <i>TRP1</i> | Gen der Tryptophan-Biosynthese |
| UAS | upstream activating sequence |
| UE | Untereinheit |
| UTR | (engl.) untranslatierter Bereich |
| UV | ultraviolett |
| VLCFA | (engl.) sehr langkettige Fettsäure |
| WT | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl -Galaktopyranosid |
| Zm | <i>Zea mays</i> |
| ZW | Zellwand |

1. Einleitung

Die vegetative pflanzliche Zelle enthält ~5-10% Lipide gemessen am Trockengewicht. Der überwiegende Teil hiervon findet sich in den Membranen. Neben den Membran- und extrazellulären Lipiden werden auch Hormone (Jasmonate) und Speicherlipide gebildet. In den Samen vieler Pflanzen bilden sie die wichtigste Kohlenstoffquelle und können einen Anteil von ~60% am Trockengewicht einnehmen. Die Fettsäuren dienen in Pflanzen als Rohstoff für die Synthese dieser Lipide. Als Fettsäuren werden im Allgemeinen lange aliphatische Kohlenwasserstoffe mit einer Säuregruppe bezeichnet. Fettsäuren können häufig durch Doppelbindungen, Hydroxylierungen oder weitere Modifikationen verändert werden. Mittellange Fettsäuren mit einer Länge von 16 bis 18 Kohlenstoffatomen bilden u.a. den Grundstoff für die Synthese von Membranlipiden und sind als Triaglycerole (Glycerol ist dreifach mit einer Fettsäure verestert) in Samen und Ölkörpern eingelagert. Sehr langkettige Fettsäuren ($> C_{20}$) und ihre Derivate bilden die Grundbausteine für die Lipide in der Cuticula oder der der Cuticula aufgelagerten Wachsschicht (Ohlrogge und Browse, 1995; von Wettstein-Knowles, 1993). Sie werden auch als very long chain fatty acids (VLCFA) bezeichnet.

1.1 Die Bedeutung der sehr langkettigen Fettsäuren für die Pflanze

Als Bestandteile der Lipide in der Cuticula sowie der epicuticulären Wachsschicht nehmen die VLCFAs eine wichtige Rolle im Schutzsystem der Pflanzen ein. Durch die aufgelagerte Wachsschicht wird ein Schutz vor übermäßiger Transpiration erreicht. Einerseits kann durch die molekularen Eigenschaften der Wachsschicht wenig eigenes Wasser verloren gehen, andererseits wird durch ihre helle Färbung eine Reflexion des Lichts und damit ein Schutz vor Überhitzung erreicht. Neben einem gewissen Maß an Schutz vor UV-Strahlung spielt die Wachsschicht auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften auch eine Rolle bei der Pathogenabwehr. Insekten werden in ihrer Möglichkeit, an der Blattoberfläche anzuhafte bzw. diese zu durchdringen, durch die Wachsschicht behindert (Post-Beittenmiller, 1996).

Langkettige Lipide spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Signalerkennung. So konnte eine Beteiligung der langkettigen Lipide an der Pollen-Stigma Interaktion

beobachtet werden (Preuss *et al.*, 1993). Die äußere Pollenwand (Exine) besteht u.a. aus Sporopollenin, einem Polymer aus langkettigen Fettsäuren und Phenylpropanoiden. Die jeweilige Zusammensetzung des Sporopollenins ist charakteristisch für jede Pflanzenart. Die Wachse dienen hier offenbar als Signalmoleküle, welche die Hydratation der Pollenkörner und so die Pollenkeimung herbeiführen (Guilford, 1988).

1.2 Die Biosynthese von sehr langkettigen Fettsäuren in Pflanzen

Die Produktion von Fettsäuren in Pflanzen beginnt mit der *de novo* Fettsäuresynthese im Stroma der Chloroplasten. Hier werden Fettsäuren bis zu einer Länge von C₁₆ bis C₁₈ langen Kohlenstoffketten in Fettsäuresynthese-Komplexen (fatty acid synthase [FAS]) synthetisiert. Nach der Ausschleusung der C₁₆/C₁₈-Fettsäuren aus den Plastiden (deren Mechanismus noch unbekannt ist, siehe Kpt. 1.2.1), findet die Elongation bis zu C₃₄-Fettsäuren in Fettsäureelongations-Komplexen (fatty acid elongation [FAE]) statt. Diese langkettigen Fettsäuren werden auch als very long chain fatty acids (VLCFAs) bezeichnet (Agrawal *et al.*, 1984; Agrawal und Stumpf, 1985; Lessire *et al.*, 1985a, 1985b, 1985c, 1989; Ohlrogge und Browse, 1995). Die FAE-Komplexe könnten hierbei in Kernnähe oder an sogenannten Plasmamembran-assoziierten Membranen (engl.: plasmamembrane-associated membranes = PAMs) sitzen, wo die ER-Membran und die Plasmamembran in Kontakt stehen (siehe hierzu auch Kpt. 1.2.2.2).

In der Membran des endoplasmatischen Retikulums erfolgt eine Modifikation der Fettsäuren zu verschiedenen Produkten. Unter anderem sind dies Wachsmomere, Ester aus langkettigen Fettsäuren und primären Alkoholen. Nach dem Transport dieser Lipide durch einen noch unbekanntem Transportmechanismus zur Plasmamembran erfolgt die Translokation durch die Zellwand bis zur Cuticula bzw. epicuticulären Wachsschicht. Hier erfolgt der Einbau (Abb. 1).

1. Einleitung

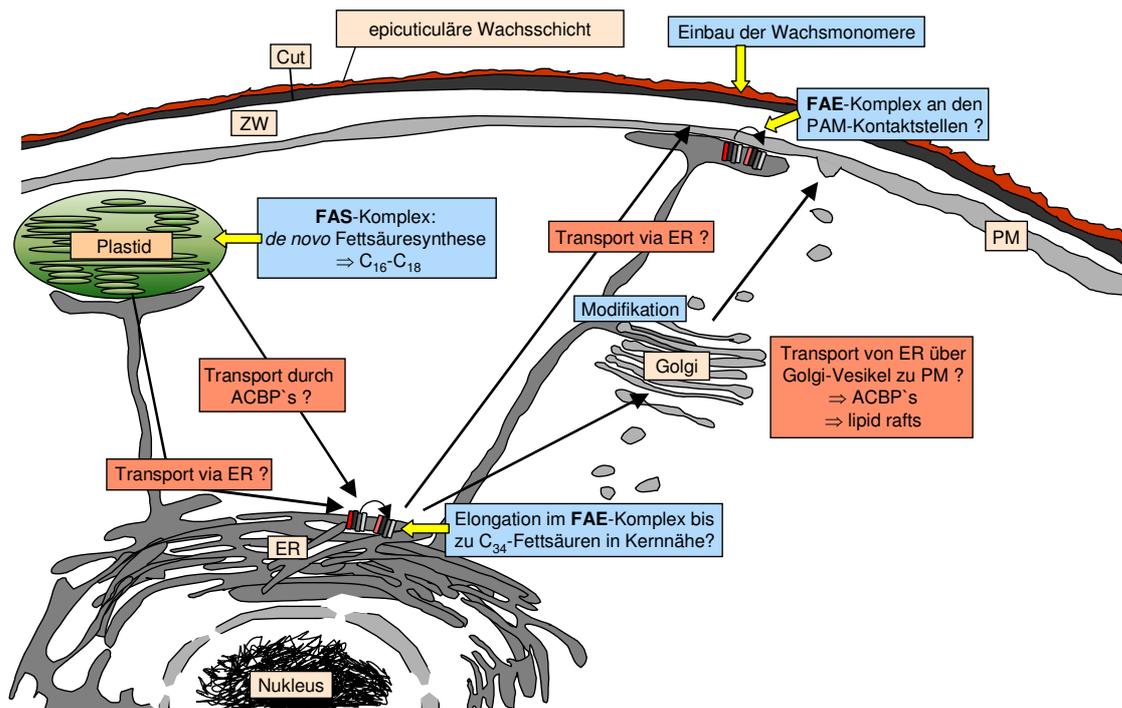


Abb. 1: Schemazeichnung der Lokalisation der Fettsäurebiosynthese in der Zelle

Die Fettsäurebiosynthese beginnt mit der *de novo* Fettsäuresynthese im **FAS-Komplex** in den Plastiden. Hier werden Fettsäuren bis zu einer Länge von C₁₈-Körpern hergestellt. Nach Ausschluss aus den Plastiden werden die Fettsäuren vermutlich zum ER transportiert. Dieser Transport geschieht möglicherweise direkt über das ER oder mit Hilfe von Acyl-CoA bindenden Proteinen (ACBP). Im ER findet die Elongation bis zu 34 Kohlenstoffeinheiten langen Ketten durch den **FAE-Komplex** statt. Anschließend erfolgt der Transport zur Plasmamembran. Dieser könnte direkt über das ER oder durch den Transport in einem Golgi-Vesikel geschehen. Hierbei könnten ACBPs oder "lipid rafts" eine Rolle spielen. Alternativ könnte der FAE-Komplex auch an sogenannten Plasmamembran-assoziierten Membranen (PAM) sitzen. An diesen Stellen hat das ER Kontakt zur Plasmamembran. Im ER bzw. Golgi-Apparat erfolgt auch die Modifikation z.B. zu Aldehyden oder primären Alkoholen. Die Alkohole können mit langkettigen Fettsäuren durch Wachssynthesen verestert werden. Nach dem Transport zur Plasmamembran und Zellwand können diese Wachsmomere in die intra- bzw. epicuticuläre Wachsschicht eingebaut werden (ACBP = Acyl-CoA-bindendes Protein; Cut = Cuticula; ER = Endoplasmatisches Retikulum; PAM = Plasmamembran-assoziierte Membranen; PM = Plasmamembran; ZW = Zellwand).

1.2.1 Der Fettsäuresynthesekomplex (FAS)

Die Fettsäuresynthese-Komplexe (fatty acid synthase = FAS) umfassen alle Enzymaktivitäten der Fettsäurebiosynthese außer der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase). Sie synthetisieren Fettsäuren bis zu einer Länge von C₁₈ im Stroma der Plastiden. Grundsätzlich werden zwei verschiedene FAS-Systeme in der Natur unterschieden. Tiere und Hefen besitzen den FAS Typ I, ein aus großen Untereinheiten zusammengesetzter einzelner multifunktionaler Enzymkomplex. Jede Untereinheit katalysiert mehrere unterschiedliche Reaktionen. Pflanzen und die meisten Bakterien hingegen besitzen den FAS Typ II (Caughey und Kekwick, 1982).

Jede Enzymaktivität wird hier von einem separaten löslichen Protein übernommen. Viele Enzyme des pflanzlichen und bakteriellen FAS II Typs bilden Homodimere. Dieses konnte in *Brassica napus* und *Mycobacterium tuberculosis* für eine β -Ketoacyl-ACP-Reduktase (Sheldon *et al.*, 1992; Cohen-Gonsaud *et al.*, 2002) und in *Escherichia coli* für eine β -Ketoacyl-ACP-Synthase (Huang *et al.*, 1998) gezeigt werden.

Die Fettsäuresynthese startet mit der ATP-abhängigen Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase). Anschließend wird Malonyl-CoA mit einem Acyl-Carrier Protein (ACP) verknüpft und so Malonyl-ACP gebildet. Die folgenden Reaktionen des Verlängerungszyklusses werden durch die Enzyme der FAS-Komplexe katalysiert: Bei der ersten Kondensation durch die β -Ketoacyl-ACP-Synthase III (KASIII) reagieren Malonyl-ACP und Acetyl-CoA zu β -Ketoacyl-ACP. Diese Kondensationsreaktion unterscheidet sich von allen folgenden dadurch, dass Acetyl-CoA als Kohlenstoffquelle dient. Damit die Fettsäure einen vollständigen Verlängerungszyklus durchlaufen kann, muss auf die Kondensation eine Reduktion, Dehydratation und erneute Reduktion erfolgen. Diese Reaktionen werden nacheinander von der β -Ketoacyl-ACP-Reduktase, der β -Ketoacyl-ACP-Dehydratase und der Enoyl-ACP-Reduktase durchgeführt. Anschließend erfolgt ein erneuter Verlängerungszyklus, bei welchem die Kondensation jedoch nicht von KASIII katalysiert wird, sondern von einer weiteren β -Ketoacyl-ACP-Synthase. Jede KAS hat also ihre eigene Substratspezifität. Nach der initialen Kondensation durch KASIII wird die Kette durch die Isoformen KASI bis C₁₂ bzw. C₁₆ und abschließend durch KASII bis C₁₈ verlängert. Die drei folgenden Enzyme innerhalb eines jeden Verlängerungszyklus sind immer gleich. Es variiert also immer nur die β -Ketoacyl-ACP Synthase (siehe Tab. 1).

| FAS-Komplexenzym | Katalysierte Reaktion | Reaktionsprodukt |
|---|-----------------------|---|
| β -Ketoacyl-ACP Synthase (KAS I, II, III) | Kondensation | ACP-S-CO-CH ₂ -CO-CH ₂ -R |
| β -Ketoacyl-ACP-Reduktase | Reduktion | ACP-S-CO-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -R |
| β -Ketoacyl-ACP-Dehydratase | Dehydratation | ACP-S-CO-CH=CH-CH ₂ -R |
| Enoyl-ACP-Reduktase | Reduktion | ACP-S-CO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -R |

Tab. 1: Enzyme des Fettsäuresynthase-Komplexes (FAS) und die katalysierte Reaktion

Jeder Zyklus der Fettsäuresynthese addiert zwei Kohlenstoffeinheiten und endet meistens bei 16:0 oder 18:0 durch verschiedene Prozesse. Durch die Abspaltung und Übertragung des Acylrestes von ACP auf ein Glycerin durch die Acyltransferase verbleibt die Fettsäure im Plastid. Durch eine lösliche Stearoyl-ACP-Desaturase können Doppelbindungen eingefügt werden. Außerdem kann der Acylrest von ACP durch eine Thioesterase abgespalten werden. Diese Fettsäuren werden durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus aus dem Stroma der Plastiden geschleust. Neben einer einfachen Diffusion können hier auch Kanal-bildende Proteine eine Rolle spielen (Koo *et al.*, 2003). Nach der Abspaltung von ACP wird der Acylrest durch die Acyl-CoA-Synthetase in Fettsäure-Acyl-CoA umgewandelt. Diese Moleküle werden durch einen noch nicht identifizierten Transportmechanismus zum Endoplasmatischen Retikulum befördert. In der Literatur werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert: Zum einen könnte ein direkter Kontakt bzw. ein Anlagern des Endoplasmatischen Retikulums an die Plastidenmembran für einen leichten Übergang der Fettsäurevorläufer sorgen. Diese ER-Plastid-Kontaktstellen konnten durch Elektronenmikroskopie schon mehrfach beobachtet werden (Samuels und Staehelin, nicht publiziert, aus Kunst und Samuels, 2003). Nach dieser Hypothese könnten die Acyl-CoA Ester in die ER-Membran einfach "eintauchen". Zum anderen könnten Acyl-CoA-bindende Proteine (ACBP) eine Rolle bei der Translokation der Fettsäuren spielen. Einen Hinweis auf diese Transportmöglichkeit erhielten Gaig *et al.* (2001) durch Versuche in *Saccharomyces cerevisiae*, bei denen ein mutiertes ACBP die Akkumulation von C₁₈-Fettsäuren bewirkte. Fettsäuren bis zu einer Länge von 26 Kohlenstoffatomen konnten dagegen kaum mehr festgestellt werden. Vermutlich durch einen dieser Wege werden die Acyl-CoAs zum FAE-Komplex transportiert, wo die Elongation stattfindet.

1.2.2 Der Fettsäureelongationskomplex (FAE)

Im Cytosol erfolgt die Elongation der Fettsäuren zu Ketten bis zu 34 Kohlenstoffatomen in den Fettsäureelongationskomplexen (FAE für "fatty acid elongation"). Die Lokalisation dieser Komplexe innerhalb der Zelle ist bisher noch nicht aufgeklärt, jedoch konnten einige Enzyme der Fettsäureelongation aus der mikrosomalen Fraktion isoliert werden (Post-Beittenmiller, 1996, Xu *et al.*, 1997 und 2002) und scheinen membranständig zu sein. Die mikrosomale Fraktion kann durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert werden und umfasst alle Membranvesikel,

hauptsächlich des rauhen und des glatten ER's. Häufig sind jedoch auch Komponenten des Golgi-Apparates und vesikulierte Zellmembran-Fragmente enthalten (Plattner und Hentschel, Taschenlehrbuch Zellbiologie, 1997).

Ob die Komplexe ER-membranständig oder im Plasmalemma lokalisiert sind, ist bisher noch nicht bekannt (siehe Kpt. 1.2.2.2).

Im Unterschied zu den FAS-Komplexen dient in den FAE-Komplexen Fettsäure-CoA als Substrat. Chemisch gesehen verläuft die Fettsäureelongation jedoch entsprechend der Fettsäuresynthese ab. Auch hier dient Malonyl-CoA als C₂-Quelle, welches in einer Kondensationsreaktion mit Acyl-CoA (die zu verlängernde Fettsäure) verbunden wird. Dieser Schritt wird von der β -Ketoacyl-CoA-Synthase katalysiert. Anschließend erfolgt die Reduktion der β -Ketogruppe an der Acyl-CoA-Kette durch die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, wobei NADPH + H⁺ als Protonendonator fungiert. Im dritten Schritt wird die β -Hydroxy-Gruppe durch eine Dehydratisierung entfernt, wodurch eine Doppelbindung zwischen dem β - und γ -C-Atom gebildet wird. Diese Reaktion wird von der β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase katalysiert. Durch das vierte Enzym des Komplexes, eine β -Enoyl-CoA-Reduktase, wird die entstandene Doppelbindung zu einer Einfachbindung reduziert und es entsteht Acyl-CoA.

Die verlängerte Fettsäure geht erneut in den Syntheszyklus ein. Durch diesen Elongationsprozess können very long chain fatty acids (VLCFAs) bis zu einer Länge von 34 Kohlenstoffatomen entstehen (Tab. 2 und Abb. 2).

| FAE-Komplexenzym | Katalysierte Reaktion | Reaktionsprodukt |
|----------------------------------|-----------------------|---|
| β -Ketoacyl-CoA-Synthase | Kondensation | CoA-S-CO-CH ₂ -CO-CH ₂ -R |
| β -Ketoacyl-CoA- Reduktase | Reduktion | CoA-S-CO-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -R |
| Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase | Dehydratation | CoA-S-CO-CH=CH-CH ₂ -R |
| Enoyl-CoA-Reduktase | Reduktion | CoA-S-CO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -R |

Tab. 2: Enzyme des Fettsäureelongations-Komplexes (FAE) und die katalysierte Reaktion

1. Einleitung

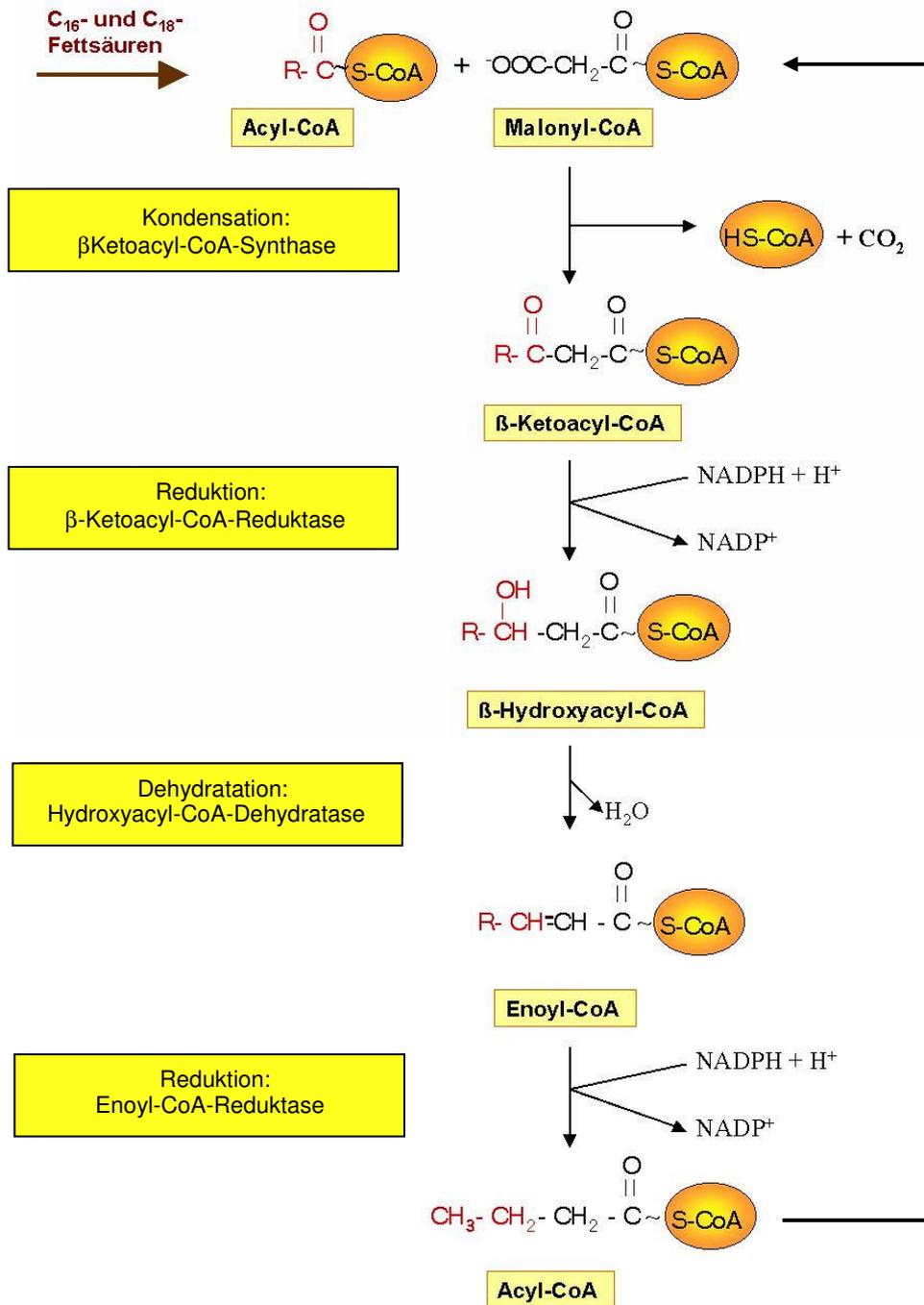


Abb. 2: Darstellung der Fettsäureelongation in Pflanzen (Quelle: Pohl, 2003)

Nach der Synthese der VLCFAs können diese Fettsäuren im ER oder Golgi-Apparat modifiziert werden. Es erfolgt der Transport zur Plasmamembran (siehe Kpt. 1.2.2.2) und die Translokation durch die Zellwand bis zur Cuticula und epicuticulären Wachsschicht, wo der Einbau der Wachsbestandteile erfolgt. Auch der Transport durch die Zellwand ist noch nicht geklärt. Nach bisherigen Erkenntnissen haben hier jedoch "Lipid Transfer Proteins" (LTPs) einen maßgeblichen Einfluss. Man unterscheidet specific LTPs, welche nur ein Substrat binden können, und nonspecific LTPs (nsLTPs), welche verschiedene Substrate binden können und hauptsächlich in Pflanzen vorkommen. Sie wurden beispielsweise schon aus Karotte (Sterk *et al.*, 1991), Spinat (Bernhard *et al.*, 1991), Reis (Vignols *et al.*, 1994), Mais (Castro *et al.*, 2003) und vielen weiteren Pflanzen isoliert und machen in Broccoli-Blättern bis zu 90% der wachsassoziierten Proteine aus (Pyee *et al.*, 1994). Es sind kleine (~9kD), basische Proteine mit 4 alpha-Helices, acht konservierten Cysteinen und einer langen C-terminalen Domäne. Sie formen einen langen hydrophoben Tunnel, über den auch die Substratbindung erfolgt (Shin *et al.*, 1995). Pyee *et al.* konnten *in vitro* einen Lipidtransport durch die LTPs auf dem sekretorischen Weg nachweisen. Durch die extrazelluläre Lokalisation dieses Proteins in Zellwand und Cuticula wird *in vivo* jedoch eher eine Aufgabe im Lipidtransfer von Wachsmonomeren durch die Zellwand angenommen. Neben einer reinen Lipid-Transportfunktion für LTPs wird auch eine Rolle in der Pathogenabwehr und Signaltransduktion diskutiert (Molina *et al.*, 1993; Maldonado *et al.*, 2002).

Eine weitere Transportmöglichkeit von Lipiden durch die Zellwand könnten auch Zellwandbestandteile wie Proteine und Polysaccharide bieten, die durch hydrophobe Subdomänen eine Passage der Lipide ermöglichen könnten. Ein Beispiel hierfür sind Glycin-reiche Proteine (GRP), welche z.B. in der Zellwand epidermaler Zellen in Embryos und jungen Blättern von Mais vorkommen (Gómez *et al.*, 1988). Durch die Ausbildung mehrerer Lagen von β -Faltblättern wird eine hydrophobe Domäne gebildet, durch die ein Lipid passieren könnte (Condit und Meager, 1986). Auch hier gibt es also noch genügend interessante Ansatzpunkte für die Aufklärung des Lipidtransports in der Zelle.

Insgesamt gesehen ist über die Regulation (Kpt. 1.2.2.1), Lokalisation (Kpt. 1.2.2.2) und Struktur (Kpt. 1.2.2.3) des FAE-Komplexes nur wenig bekannt. Dennoch gibt es einige teilweise schon als gesichert geltende Daten:

1.2.2.1 Regulation der FAE-Komplexenzyme

Ein bis heute gültiges Modell schlägt vor, dass die beiden Reduktasen und die Dehydratase des Komplexes ubiquitär in der Pflanze exprimiert werden und in allen Komplexen identisch sind. Das kondensierende Enzym jedoch, die β -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS), wird nach diesem Modell gewebe- bzw. samenspezifisch exprimiert. Die Unterteilung in gewebe- und samenspezifische Expression folgte auf die Entdeckung, dass die in sich entwickelnden Samen exprimierten KCS-Gene zur Elongation von mittellangkettigen Fettsäuren bis zu einer Länge von 24 Kohlenstoffatomen führen. Die entwicklungspezifisch exprimierten KCS-Gene werden hingegen häufig in der Epidermis von sich entwickelnden Organen exprimiert. Sie elongieren Fettsäuren bis zu C_{34} (Rossak *et al.*, 2001). Die β -Ketoacyl-CoA-Synthase soll das Hauptenzym des FAE-Komplexes sein und ist für dessen Umsatzrate verantwortlich. Jede KCS katalysiert nur bestimmte Verlängerungsschritte der Acyl-CoAs, zeigt also eine Substratspezifität (James *et al.*, 1995; Millar und Kunst, 1997).

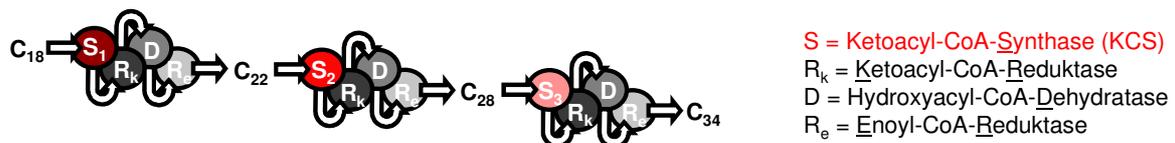


Abb. 3: Schematische Darstellung der FAE-Komplexe

Aus diesem Grund sind die KCS-Gene und ihre Produkte für die Forschung sehr interessant. Im Verlauf der letzten Jahre konnten viele KCS-Gene isoliert werden, wie z.B. die seit längerem bekannten Gene *CUT1* (Millar *et al.*, 1999), *KCS1* (Todd *et al.*, 1999) und *FDH* (Yephremov *et al.*, 1999) aus *Arabidopsis thaliana* und *FAE1* aus *Brassica napus* (James *et al.*, 1995). Viele dieser Gene sind an der Synthese von VLCFAs beteiligt.

James *et al.* konnten eine *Arabidopsis*-Mutante herstellen, bei der das putative β -Ketoacyl-CoA-Synthase Gen betroffen war. Die *fae1*-Mutante enthielt weniger C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren als Wildtyppflanzen. Weiterhin führte die Überexpression des Gens in VLCFA-freien Samen von Tabak und *Arabidopsis* zu signifikanten Steigerungen des VLCFA-Gehalts.

Neben der Synthese von VLCFAs können KCS-Gene jedoch auch an der Produktion von mittellangkettigen Fettsäuren beteiligt sein. Dieses konnten Azachi *et al.* (2002) für das KCS-Gen *DsKCS* der salztoleranten Alge *Dunaliella salina* belegen. Dieses

Gen produziert, ausgelöst durch einen erhöhten Salzstress in der Umgebung, vermehrt ungesättigte C₁₈-Fettsäuren im Verbund mit einer Desaturase. In salzarmer Umgebung werden eher gesättigte C₁₆-Fettsäuren gebildet. Der Gehalt an gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren kann jedoch die Membraneigenschaften der Alge verändern, so dass die Pflanze auf eine Änderung der Umwelteinflüsse reagieren kann. Neben *DsKCS* aus *Dunaliella salina* können auch die kürzlich aus *Marchantia polymorpha* isolierten KCS-Gene *MpFAE2* und *MpFAE3* die Produktion von mittellangkettigen Fettsäuren katalysieren. Diese Gene produzieren Fettsäuren mit einer Länge von C₁₈ bis C₂₂ (Kajikawa *et al.*, 2003).

Auch die den in ihrer Funktion den Ketoacyl-CoA-Synthasen ähnlichen Elongasen *ELOI*, *ELOII* und *ELOIII* aus *Saccharomyces cerevisiae* zeichnen sich durch ihre Substratspezifität aus. Während *ELOI* Fettsäuren von C₁₂/C₁₆ bis C₁₆/C₁₈ verlängert, bevorzugen *ELOII* und *ELOIII* längerkettige Acyl-CoAs als Substrat (*ELOII* von C₁₆/C₁₈ bis C₂₂, *ELOIII* von C₂₀-C₂₆) (Rössler *et al.*, 2003).

Bisher konnte in *Zea mays* die genaue Anzahl der an der Elongation von C₁₈- bis C₃₄-Fettsäuren beteiligten KCS-Gene noch nicht identifiziert werden. Die zuvor genannten Experimente zeigen jedoch, dass die unterschiedlichen KCS-Gene ihre eigene Substratspezifität besitzen und oft mehrere Elongationsschritte katalysieren. Das bisher diskutierte Modell einer sequentiellen Elongation der Fettsäuren in Mais (von C₁₈-C₂₂/C₂₄, C₂₄-C₂₈, C₂₈-C₃₄) ist noch nicht endgültig bestätigt worden. Da die Wachsbiosynthese in vielen unterschiedlichen pflanzlichen Geweben in verschiedenen Entwicklungsstadien stattfindet, muss eine detaillierte Analyse der Substratspezifität sowie des Expressionsmusters für jedes kondensierende Enzym stattfinden (Kunst und Samuels, 2003).

1.2.2.2 Lokalisation der FAE-Komplexenzyme

Auch die Lokalisation des FAE-Komplexes ist bisher unbekannt. Als wahrscheinlich gilt jedoch, dass die Enzyme dieses Komplexes mit der ER-Membran assoziiert sind. Daneben ist auch eine Lokalisation im Plasmalemma nicht ausgeschlossen. Der Komplex könnte jedoch auch in unmittelbarer Nachbarschaft zur Plasmamembran an den sogenannten Plasmamembran-assoziierten Membranen (PAM) sitzen, an welchen das Endoplasmatische Retikulum Kontakt zur Plasmamembran hat (Pichler *et al.*, 2001; Samuels und Staehelin, nicht publiziert, aus Kunst und Samuels, 2003).

Pichler *et al.* konnten eine Subfraktion aus Hefe isolieren, die eine solche PAM aufweist. Interessant ist dabei die Entdeckung, dass hier viele Phospholipide und Sterole synthetisiert werden. Eine Lokalisation des FAE-Komplexes in diesen PAM wäre demnach denkbar, da die VLCFAs in unmittelbarer Nähe zum Ort ihrer Verwendung (in Form eines Wachsesters als Vorläufer für den Aufbau der Cuticula) synthetisiert würden. Sie könnten so "direkt in die Plasmamembran synthetisiert werden". Unklar ist jedoch, ob in den PAM ein direkter Kontakt oder nur eine Annäherung zwischen ER- und Plasmamembran stattfindet. Pichler *et al.* (2001) konnten Hinweise auf einen Kontakt dieser Membranen in Hefezellen in manchen Bereichen der PAM finden. Auch Samuels und Staehelin konnten diese Kontaktstellen in Tabakzellen entdecken. Eine Fusion dieser Membranen fand jedoch nicht statt.

Falls dieser Komplex eher in Kernnähe lokalisiert wäre, ist ein Transport der VLCFAs via Vesikel vom ER zum Golgi-Apparat bis zum Plasmalemma denkbar. Dieser Mechanismus wird durch die Beobachtung gestützt, dass es bei dem Einsatz von Monensin (bekannt für seine blockierende Wirkung auf den intrazellulären Proteintransport auf dem Level des Golgi-Apparates) in Lauch-Sämlingen zur Akkumulation von VLCFAs im Golgi-Apparat kommt. Gleichzeitig kommt es zu einem Abfall des Transports dieser Fettsäuren zur Plasmamembran (Bertho *et al.*, 1991). Den sogenannten "lipid rafts" könnten bei dem vesikulären Transport eine unterstützende Rolle zukommen. "Lipid rafts" sind eisbergartige Mikrodomänen aus Sphingolipiden und Sterolen, die häufig in der Plasmamembran beobachtet werden konnten (Brown und London, 1998). In *Saccharomyces cerevisiae* und Mammalia vermehren sich die Hinweise, dass diese Flöße am vesikulären Transport von Lipiden und Proteinen via Golgi-Apparat vom ER bis zur Plasmamembran beteiligt sind (Bagnat und Simons, 2002, Pohl *et al.*, 2004).

Eine Membranständigkeit der FAE-Komplex Proteine konnte durch viele Versuche in mehreren Organismen wie Raps (*Brassica napus*), Lauch (*Allium porrum*) und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) belegt werden (Cassagne und Lessire, 1978; Agrawal *et al.*, 1984; Post-Beittenmiller, 1996; Harwood, 1988; Kohlwein *et al.*; 2001, Han *et al.*, 2002). Das *glossy8*-Gen aus *Zea mays*, welches für die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase und damit das zweite Enzym des FAE-Komplexes zu codieren scheint, konnte durch subzelluläre Fraktionierung in der Mikrosomenfraktion nachgewiesen werden. Dieses

Ergebnis deckt sich mit der Vorhersage von Transmembrandomänen für dieses Protein (Xu *et al.*, 1997 und 2002).

Auch für einige der bisher bekannten β -Ketoacyl-CoA-Synthasen werden Transmembrandomänen vorhergesagt (Blacklock und Jaworski, 2002).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass im Bereich der Erforschung zur Lokalisation des FAE-Komplexes weitere Untersuchungen erforderlich sind.

1.2.2.3 Struktur des FAE-Komplexes

Bei der strukturellen Organisation des FAE-Komplexes sind verschiedene Optionen denkbar (Abb. 4). Wie im Abschnitt Lokalisation bereits erwähnt, gibt es Hinweise darauf, dass sich der FAE-Komplex im Bereich der PAM-Stellen befinden könnte. So würden die VLCFAs in der Nähe der Cuticula und epicuticulären Wachsschicht, wo sie als Wachsmomere ihre Verwendung finden, synthetisiert werden. Denkbar wäre, dass die einzelnen Enzyme des Komplexes auf der cytosolischen Seite der ER-Membran zusammensitzen und die Fettsäuren an ein Carrier-Protein abgeben. Dieses Protein könnte die VLCFAs durch die Plasmamembran und Zellwand bis zur Cuticula transportieren. Eine solche Aufgabe könnten Lipid Transfer Proteine (LTP), homologe Proteine oder auch hydrophobe Zellwandbestandteile übernehmen (s. S. 8).

Möglicherweise müssen die FAE-Komplexenzyme erst zum Ort ihrer endültigen Lokalisation an den PAM-Stellen gebracht werden. Hierbei könnte ein "Shuttle"-Protein die Enzyme an der ER-Membran bis zum Zielort transportieren. Die unter Umständen in Kernnähe synthetisierten Proteine könnten so effizient und schnell z.B. zu den PAM-Stellen transportiert werden, wo der Aufbau der Komplexstruktur erfolgt. Eine weitere Option für die Gestaltung des FAE-Komplexes ist die Zusammenlagerung der Komplexenzyme durch ein verbindendes "Brückenprotein". Dieses Protein könnte alle vier Enzyme oder auch nur bestimmte Proteine des Komplexes zusammenhalten.

Daneben könnte der Komplex auch zusammenlagern, ohne dass ein "Brückenprotein" nötig wäre.

Als weitere Variante könnten die Proteine der Fettsäureelongation getrennt in der ER-Membran vorliegen. Um hier energetisch sinnvoll arbeiten zu können, kann eine einfache Diffusion des zu verlängernden Acyl-CoA's wohl ausgeschlossen werden. Vielmehr könnte ein Acyl-CoA-bindendes Protein (ACBP) hier die Acyl-CoAs von einem zum anderen Komplexpartner transportieren (siehe auch Kpt. 1.2.1, S. 5).

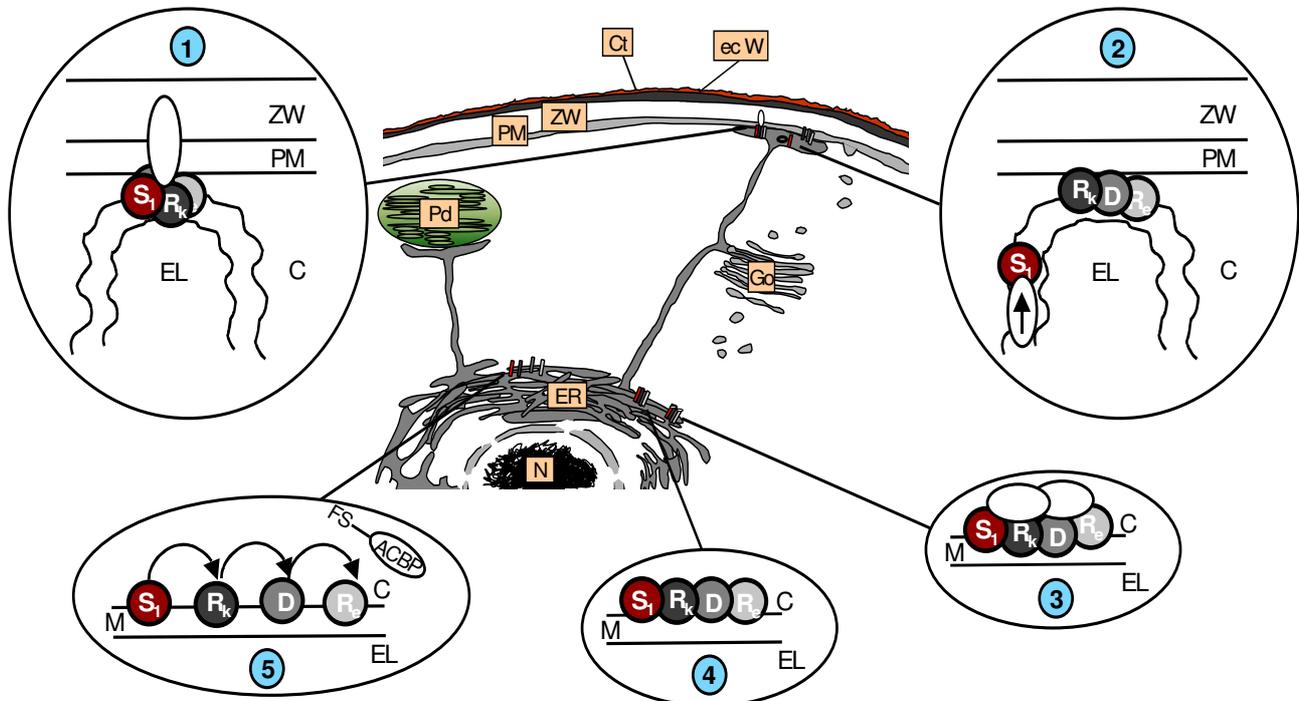


Abb. 4: Schemazeichnung der möglichen FAE-Komplex Modelle und Lokalisationen

- 1) FAE-Komplex mit Lipidcarrier-Protein (z.B. LTP)
- 2) "Shuttle"-Protein transportiert FAE-Komplexenzyme zum Zielort
- 3) "Brückenprotein" ist am strukturellen Aufbau des Komplexes beteiligt
- 4) FAE-Enzyme bilden Komplex ohne weitere Proteine
- 5) FAE-Enzyme separiert, ACBP transportiert FS von einem zum anderen Protein (ACBP = Acyl-CoA-bindendes Protein; C = Cytosol; Ct = Cuticula; D = Hydroxyacyl-CoA Dehydratase; ec W = epicuticuläre Wachsschicht; EL = ER-Lumen; ER = Endoplasmatisches Retikulum; FS = Fettsäure; Go = Golgi-Apparat; N = Nucleus; Pd = Plastid; PM = Plasmamembran; R_e = Enoyl-CoA-Reduktase; R_k = β-Ketoacyl-CoA-Reduktase; S₁ = β-Ketoacyl-CoA-Synthase; ZW = Zellwand)

Um die oben erwähnten möglichen Strukturen des FAE-Komplexes nachzuweisen, könnte man ein Hefe-Twohybrid-System verwenden. Hiermit könnten *in vivo* Interaktionen zwischen den einzelnen Komplexpartnern und weiteren noch nicht bekannten putativen Bindungspartnern festgestellt werden. Außerdem wäre es möglich, über eine Durchmusterung von cDNA-Banken die bisher vermuteten vier Enzyme bzw. neue noch unbekannte Partner dieses Komplexes zu isolieren (siehe Kpt. 1.3.1, S. 17).

Für eine Bestimmung zur Lokalisation der einzelnen Komplexenzyme in der Zelle bieten sich Untersuchungen mit dem grün fluoreszierenden Protein (*GFP*) an (siehe Kpt. 1.3.2, S. 21).

1.2.3 Die "glossy"-Mutationen von *Zea mays*

Wie unter Kpt. 1.1 und 1.2 beschrieben, sind in cuticulären Wachsen von Mais-Keimlingen viele so genannte very long chain fatty acids (VLCFAs) enthalten. Die Synthese dieser VLCFAs wird vermutlich von den zwei hintereinandergeschalteten Systemen der Fettsäuresynthese (FAS) und der Fettsäureelongation (FAE) übernommen.

Ein Ausfall einiger Gene der Fettsäureelongation, welche neben dem Aufbau der Wachsschicht auch an der Epidermisentwicklung beteiligt sein können, kann für die Pflanze eine stark veränderte Morphologie oder sogar Letalität bedeuten. Dieses ergaben Versuche verschiedener *Arabidopsis*- [*KCS1* (Todd *et al.*, 1999), *Fiddlehead* (Yephremov *et al.*, 1999)] und Mais-Mutanten. Maispflanzen, bei denen die Entwicklung der Wachsschicht betroffen ist, werden als "glossy"-Mutanten bezeichnet. Bisher sind etwa 20 Chromosomen-loci ("glossy"-loci) identifiziert worden, welche die Menge und/oder die Zusammensetzung der cuticulären Wachse auf der Oberfläche von Keimlingsblättern beeinflussen (Schnable *et al.*, 1994). Durch die Veränderung der Wachszusammensetzung kann Wasser auf der Oberfläche der Keimlinge anhaften, wodurch der "glossy"-Effekt erzielt wird. Die beobachtete veränderte Wachszusammensetzung und das Fehlen von sehr langkettigen Fettsäuren in vielen Wachsmutanten führt zu der Vermutung, dass in den "glossy"-Mutanten die Fettsäureelongation auf der Ebene der Transkription und/oder Substrate beeinflusst ist. Die einzelnen "glossy"-Mutationen zeigen zwar den gleichen Phänotyp, sind molekularbiologisch jedoch auf unterschiedliche Genmutationen zurückzuführen.

Das *glossy1*-Gen scheint für ein regulatives Gen im Wachsstoffwechsel zu kodieren, obwohl es Sequenzhomologien zur Decarboxylase *CER1* aufweist. In seiner Sekundärstruktur zeigt das Protein Ähnlichkeiten zu Transmembran-Rezeptorproteinen wie *Fusin* (Hansen *et al.*, 1997).

Glossy2 codiert für ein bislang unbekanntes Protein, welches jedoch bei einer Mutation zu einer Anreicherung von kürzerkettigen Fettsäurederivaten führt und

damit eine veränderte Wachsschicht in jungen Maisblättern verursacht (Tacke *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 2002).

Durch Sequenzanalyse und Immunoinhibierung von *glossy8* konnte gezeigt werden, dass es sich um die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase aus dem FAE-Komplex von *Zea mays* handeln muss (Xu *et al.*, 1997 und 2002). Als möglicher Komplexpartner von *ZmKCS-1* bildet dieses Protein einen Ansatzpunkt für interessante Untersuchungen, z.B. für den Nachweis einer möglichen Interaktion durch Twohybrid-Experimente.

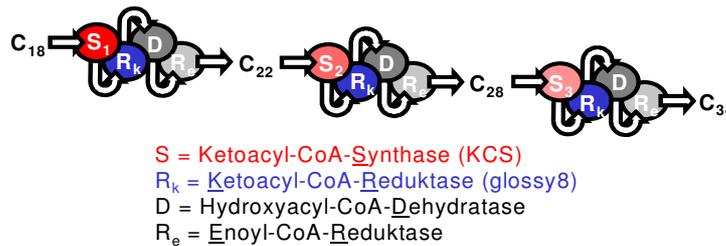


Abb. 5: Schemazeichnung der FAE-Komplexe
 (Ketoacyl-CoA-Reduktase (*glossy8*) blau; Ketoacyl-CoA-Synthase rot)

Die *glossy15*-Mutanten zeichnen sich phänotypisch durch eine veränderte Blattmorphologie der jungen Blätter aus. Neben der Form ähneln auch die Ausbildung von Makrohaaren auf der Blattoberfläche als auch eine veränderte bzw. fehlende epicuticuläre Wachsschicht der Ausprägung adulter Blattmerkmale. *Glossy15* scheint daher in der frühen Epidermisentwicklung und Blattentwicklung eine wichtige Rolle zu übernehmen, ist also nicht primär an der Wachssynthese beteiligt. Hierdurch werden Wachsester produziert, welche charakteristische Wachsprofile für adulte Blätter zeigen (Bianchi *et al.*, 1979; Evans *et al.*, 1994; Moose und Sisco, 1994).

Den übrigen "glossy"-Genen konnten bisher noch keine eindeutigen Funktionen in der Pflanze zugeordnet werden, es existieren jedoch einige erste Hinweise (Post-Beitenmiller, 1996).

Zusammenfassend ist die Untersuchung dieser "glossy"-Mutationen in Mais sehr interessant, da hier verschiedene Gene der Fettsäurebiosynthese betroffen sind. Daher sollten in dieser Arbeit Expressionsanalysen in mehreren "glossy"-Mutanten durchgeführt und eine Beeinflussung der Expression von *ZmKCS-1* und möglichen Komplexpartnern durch die "glossy"-Mutationen untersucht werden.

1.3 Strategien zur Untersuchung von Genen und Proteinen

Um eine vollständige Untersuchung eines neu isolierten Gens zu erreichen, müssen verschiedene molekularbiologische Experimente durchgeführt werden.

Man beginnt mit einer Sequenzanalyse, um eventuell Homologien zu anderen Genen und Proteinen aufdecken zu können. Ebenso kann diese Analyse als Basis für erste Vorhersagen über einen Strukturaufbau des Gens sowie des Proteins dienen. Hat man diesen Bereich abgeschlossen, kann mit Hilfe einer Southernanalyse getestet werden, ob von dem untersuchten Gen mehrere Kopien im Genom vorliegen. An diese Untersuchung kann sich eine Northernanalyse anschließen, um Expressionsmuster des Gens in verschiedenen Geweben zu erkennen. Hierdurch lassen sich Aussagen darüber machen, ob es sich um ein Haushaltsgen oder ein reguliertes Gen handelt. Nach transgener Expression des Gens z.B. im Ursprungsorganismus könnte man durch gezieltes Abschalten der Genfunktion oder durch Überexpression des Gens einen Hinweis auf die Protein-Funktion erhalten. Diesen erhält man durch Auswertung einer möglicherweise auftretenden und phänotypisch sichtbaren Mutation. Auf der Proteinebene ließen sich auch über Twohybrid-Verfahren mögliche Interaktionspartner des zu untersuchenden Proteins isolieren. Möchte man die Lokalisation des Proteins in der Zelle und/oder Gewebe bestimmen, kann man sich neben anderen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie bedienen. Als Marker für die Visualisierung der Lokalisation kann das "green fluorescent protein" (*GFP*) aus der Qualle *Aequorea victoria* eingesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Gene des Fettsäurestoffwechsels aus *Zea mays* im Mittelpunkt der Forschung stehen, insbesondere *ZmKCS-1* (siehe Kpt. 1.2.2), *glossy8* (Kpt. 1.2.3) und weitere Komplexpartner (Kpt. 1.3.1). Sie sind Bestandteile des Fettsäureelongations-Komplexes (FAE-Komplex), der in Mais für die Elongation der Acyl-CoAs zu sehr langkettigen Fettsäuren zuständig ist.

Die cDNAs der Gene *ZmKCS-1* und des homologen Gens *ZmKCS-2* konnten aus cDNA-Banken keimender Körner und Sämlingen isoliert werden. Sequenz- und Northernanalysen konnten belegen, dass es sich bei diesen beiden Genen um β -Ketoacyl-CoA-Synthasen handelt, welche entwicklungspezifisch exprimiert werden (Frenzel, 2000).

Sowohl die Organisation als auch die Lokalisation des FAE-Komplexes in der Zelle sind bisher noch unbekannt (siehe auch Kpt. 1.2.2.1-1.2.2.3). Eine Aufklärung dieses Forschungsgebietes wäre jedoch für das Verständnis der Lipidsynthese von großer Bedeutung. Aus den oben genannten Gründen wurden in dieser Arbeit verschiedene Twohybrid-Analysen mit *ZmKCS-1* und weiteren möglichen FAE-Komplexpартnern durchgeführt. Hiermit sollten Interaktionspartner von *ZmKCS-1* identifiziert und somit die Organisation des FAE-Komplexes weiter charakterisiert werden. Um die Lokalisation des FAE-Komplexes in der Zelle näher zu bestimmen, wurden Untersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und *GFP* als Marker an transient transformierten Zellen durchgeführt.

In den folgenden Kapiteln soll nun näher auf die in dieser Arbeit angewendeten Twohybrid-Assays eingegangen. Anschließend wird eine Übersicht zur biolistischen Transformation und der Fluoreszenzmikroskopie gegeben. Es folgt eine Beschreibung der "glossy"-Mutationen in *Zea mays*. Mit Hilfe von RNA-Präparationen aus diesen Pflanzen wurden Expressionsanalysen von *ZmKCS-1* und anderen Genen des Fettsäurestoffwechsels durchgeführt. Abschließend werden die Ziele dieser Arbeit erläutert.

1.3.1 Das Twohybrid-System

Die heute genutzten Twohybrid-Systeme basieren auf den Untersuchungen von Fields und Song (1989), welche die Rekonstitution des geteilten Transkriptionsfaktors *Gal4* aus *Saccharomyces cerevisiae* durch Expression eines Reportergens in der Hefe nachweisen konnten. Dieses ist möglich, da *Gal4* in eine N-terminale DNA-bindende Domäne und in eine C-terminale Aktivierungs-Domäne gespalten werden kann. Diese Erkenntnis macht man sich in der Erforschung von Protein-Protein Interaktionen durch das Twohybrid-System zunutze.

In dieser Arbeit fanden ein *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System und ein membranbasiertes Twohybrid-System seine Anwendung:

1.3.1.1 *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System

Im *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System arbeitet man mit zwei verschiedenen Expressionsvektoren, dem sogenannten bait- und dem prey-Vektor. Der bait-Vektor (Köder-Vektor) enthält als Hefeselektionsmarker das *Trp1*-Gen zur Eigensynthese von Tryptophan und die DNA-Bindungsdomäne von *Gal4*. In diesen Vektor wird das

1. Einleitung

Protein kloniert, für welches man neue Interaktionspartner isolieren bzw. potentielle Interaktionspartner testen möchte. Der prey-Vektor enthält den Hefeselektionsmarker *Leu2* und die Aktivierungsdomäne von *Gal4*. Dieser Vektor wird für die Klonierung einer cDNA-Bank bzw. für die Klonierung möglicher Bindungspartner zum Testen von Interaktion mit dem Köderprotein genutzt.

Nach der Transformation der beiden Vektoren in Hefe wird das Köderprotein als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne von *Gal4* exprimiert, während das Protein im prey-Vektor als Fusionsprotein mit der *Gal4*-Aktivierungsdomäne exprimiert wird. Der für das *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System verwendete Hefestamm besitzt auf seinem Genom die Reportergene *His3* und *lacZ*, deren Expression über die "upstream activating sequences" Gal1 bzw. Gal4 (UAS_{Gal1} , UAS_{Gal4}) reguliert werden. Interagieren die beiden Fusionsproteine miteinander, wird der *Gal4*-Transkriptionsfaktor rekonstituiert und die Reportergene exprimiert. Das chromosomale Gen des *Gal4*-Transkriptionsfaktors wurde im benutzten Hefestamm YRG-2 mutiert. Die Expression des *His3*-Reportergens erlaubt den Hefen ein Wachstum auf Medien ohne Histidin, während die Expression von *lacZ* durch einen Enzymassay nachgewiesen werden kann (Abb. 6).

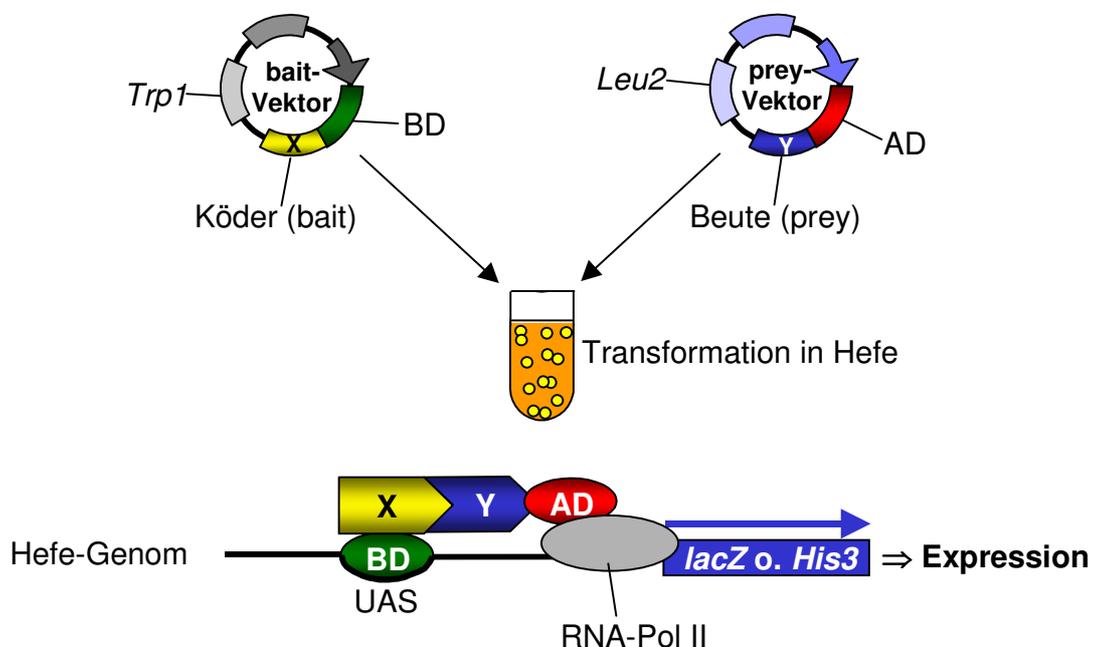


Abb. 6: Das *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System

(AD = *Gal4* Aktivierungsdomäne; BD = *Gal4* Bindungsdomäne; *lacZ* und *His3* = Reportergene; *Trp1* und *Leu2* = Hefeselektionsmarker; UAS = "upstream activating sequences"; X,Y = untersuchte Gene/Proteine)

1.3.1.2 Membranbasiertes Twohybrid-System

Gegenüber dem *Gal4*-Twohybrid-System bietet das membranbasierte Twohybrid-System die Möglichkeit, eine Interaktion zwischen zwei membranständigen Proteinen oder zwischen einem membranständigen und einem cytosolischen Protein zu testen. Dieses System basiert auf den Untersuchungen von Johnsson und Varshavsky (1994), welche Ubiquitin als Sensor für *in vivo* Interaktionen zwischen zwei Proteinen beschrieben haben. Diese Methode wurde von ihnen "ubiquitin-based split protein sensor" (USPS) genannt. Ubiquitin, welches nur 76 AS groß ist, markiert in der eukaryotischen Zelle zum Abbau bestimmte Proteine (Jentsch, 1992; Hershko und Ciechanover, 1992). Die so markierten Proteine werden von "Ubiquitin-specific Proteases" (UBP's) erkannt, von Ubiquitin getrennt und degradiert. Natives Ubiquitin kann in eine N-terminale (Nub) und eine C-terminale (Cub) Domäne unterteilt werden. Beide Hälften haben eine hohe Affinität zueinander und können sich spontan zum sogenannten "Split Ubiquitin" zusammenlagern, welches von den UBP's erkannt wird.

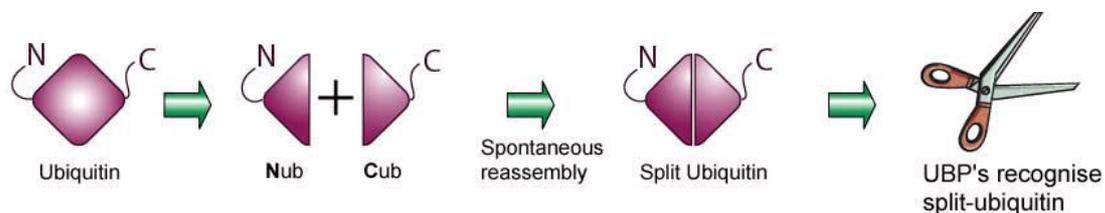


Abb. 7a: Split Ubiquitin
(Quelle: Dualsystems Biotech AG)

Durch eine Punktmutation in der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin, bei der das Isoleucin 13 durch ein Glycin ersetzt wird, wird diese natürliche Reassemblierung verhindert.

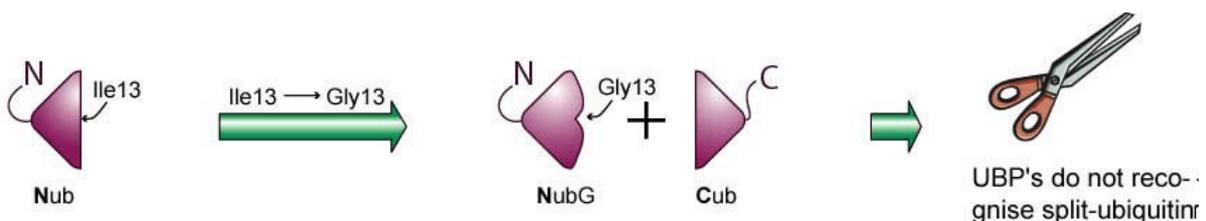


Abb. 7b: Mutiertes Split Ubiquitin
(Quelle: Dualsystems Biotech AG)

1. Einleitung

Werden die beiden Ubiquitin-Untereinheiten Cub und NubG mit interagierenden Proteinen fusioniert, kann "Split Ubiquitin" rekonstituiert werden und so von UBP's erkannt und geschnitten werden. Dieser Mechanismus kann durch einen Transkriptionsaktivator wie *LexA*, welcher am C-Terminus von Cub angehängt wurde, sichtbar gemacht werden. Die UBP's spaltet *LexA* ab, welches in den Kern wandert und dort die Expression eines Reportergens wie *His3* oder *lacZ* einleitet.

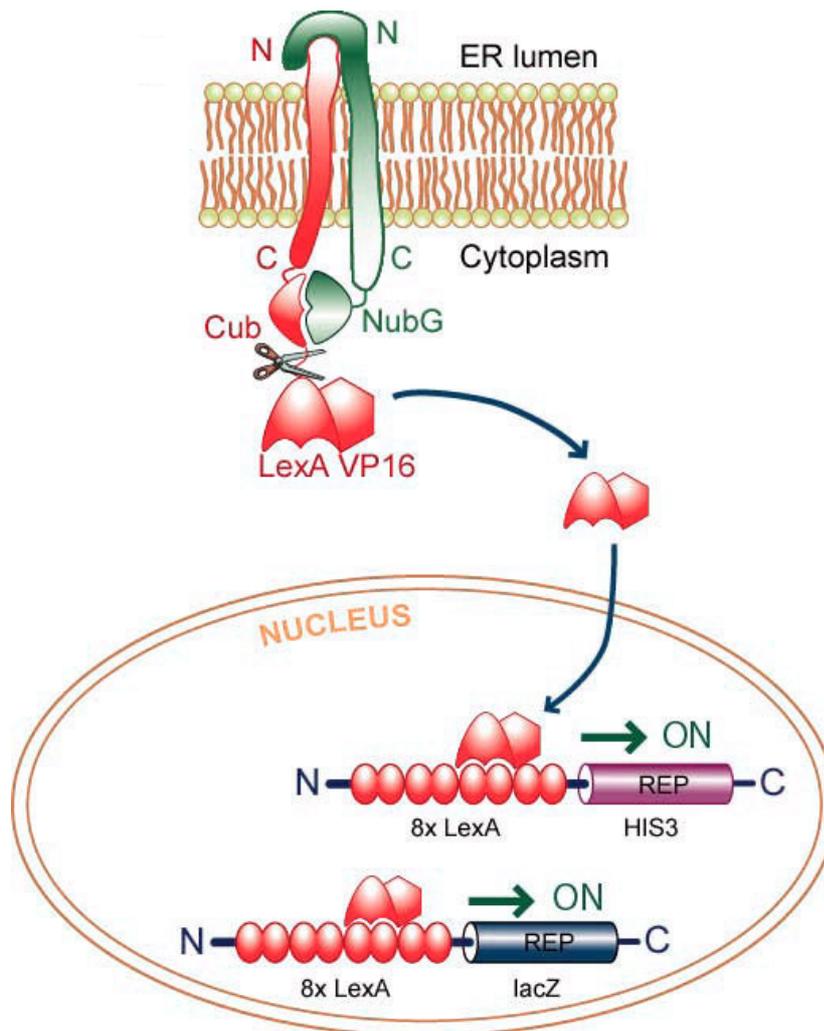


Abb. 7c: Membranbasiertes Twohybrid-System
(Quelle: Dualsystems Biotech AG)

Mit Hilfe dieses Systems können Protein-Interaktionen direkt am Ort ihrer Lokalisation (z.B. in der Membran) nachgewiesen werden. Diese Leistung kann das *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System nicht erbringen, da hier eine Interaktion durch Verwendung von *Gal4* nur im Kern nachgewiesen werden kann (vergleiche Abb. 6, S. 18).

1.3.2 Biolistische Transformation, "green fluorescent protein" (*GFP*) und Proteinsortierung

1.3.2.1 Biolistische Transformation und "green fluorescent protein" (*GFP*)

Um eine pflanzliche Zelle mit rekombinanter DNA zu transformieren, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen gibt es den indirekten Weg der Nutzung von *Agrobacterium tumefaciens* als Genfähre. Dieser wird jedoch eher bei dikotyledonen Pflanzen wie Tomate, Kartoffel oder Tabak eingesetzt. Da in den monokotyledonen Pflanzen wie z.B. Mais der Einsatz von Agrobakterien schwierig ist, wird hier häufig die biolistische (biologisch + ballistisch) Transformation gewählt. Hierbei wird die zu transformierende DNA an ca. 1-3 µm große Goldkügelchen gebunden und mit Hilfe einer Partikel-Kanone (Particle-Gun) in das zu untersuchende Gewebe geschossen (Kpt. 2.2.2.12 und 3.2.2). Nach einer Inkubationsphase im Dunkeln, die abhängig von der Expressionsstärke des zu untersuchenden Proteins unterschiedlich lang ist, kann das Protein durch Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert werden. Durch diese Methode der Visualisierung werden zelluläre Details wie Zellkern, Cytoplasma, Plasmastränge, ER-Netzwerk und die Plasmamembran sichtbar (siehe Kpt. 3.2.2).

Um ein Protein innerhalb einer Zelle lokalisieren zu können, bedient man sich heute meist des "green fluorescent protein" (*GFP*). Das *GFP* aus der Qualle *Aequorea victoria* wurde erstmals 1994 von Chalfie als Marker für die Genexpression vorgestellt (Chalfie *et al.*, 1994). Gegenüber anderen Markern wie *GUS* (β-Glucuronidase, Jefferson *et al.*, 1987) oder Luciferase (Ow *et al.*, 1986) hat *GFP* den Vorteil, weder cytotoxisch zu sein noch ein exogenes Substrat für seinen Nachweis zu benötigen. Ein weiterer Vorteil von *GFP* ist neben seiner geringen Größe von 26,9 kD (238 AS) eine mögliche N-terminale oder C-terminale Fusion mit dem zu untersuchenden Protein. Hierdurch wird eine Untersuchung von Protein Lokalisationen erst möglich (Kaether und Gerdes, 1995). Eine C-terminale Fusion des *GFP* an das zu untersuchende Protein wird meist bevorzugt, da sonst mögliche N-terminale Signalsequenzen für die Proteinlokalisierung maskiert würden (siehe Kpt. 1.3.2.2). Nach Klonierung des Zielproteins 5' von *GFPII* (modifiziertes *GFP*) in einen modifizierten Expressionsvektor (für modifiziertes *GFP* (*GFPII*) und modifizierten pmon30049-Vektor, siehe Kpt. 3.2.1) wird die DNA mit Hilfe der biolistischen

Transformation (s.o.) in die Zelle transferiert. Danach erfolgt die Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop.

1.3.2.2 Proteinsortierung in der Zelle

In der Zelle müssen viele Proteine durch Sortierungsmechanismen an ihren Zielort gelangen. Nur bestimmte Proteine verbleiben nach ihrer Translation im Cytoplasma, wie z.B. die Enzyme des Primärstoffwechsels aus der Glykolyse. Viele andere Proteine werden in andere Zell-Kompartimente (Membranen, Zellwand, Vakuole) oder Organellen transportiert. Diese Proteine weisen meist eine N-terminale Signalsequenz auf, sie kann aber auch C-terminal oder intern lokalisiert sein. Diese Signalpeptide werden nach erfolgter Translokation häufig durch Proteasen entfernt, können aber auch am Protein verbleiben. Neben den Signalsequenzen der zu transportierenden Proteine werden häufig Rezeptorproteine (an die Signalmoleküle binden können), Co-Faktoren (wie das "signal recognition particle" (SRP) bei der Co-Translation von Proteinen in das ER (Walter und Johnson, 1994)) und Nukleosid-Triphosphate (wie ATP und GTP als Energielieferanten) für einen erfolgreichen Transport benötigt.

Die Entscheidung, ob ein Protein zu den Organellen transportiert oder für den sekretorischen Weg bestimmt ist, wird schon im Cytoplasma festgelegt. Proteine, die an freien Ribosomen synthetisiert werden, verbleiben im Cytoplasma oder werden zum Nukleus, den Mitochondrien, den Plastiden oder den Peroxisomen transportiert. Proteine hingegen, die an ER-gebundenen Ribosomen (rauhes ER) synthetisiert werden, gehen den sekretorischen Weg. Sie werden zunächst durch Co-Translation in das ER importiert und von hier zu ihrem Bestimmungsort weitergeleitet. Diese im Cytoplasma erfolgte Einteilung wird jedoch nicht durch die Ribosomen bestimmt, sondern durch die Signalsequenz am synthetisierten Protein (Bar-Peled *et al.*, 1996). Wie oben erwähnt, werden an der ER-Membran synthetisierte Proteine auf dem sekretorischen Weg (oder "sekretorisches System") weitergeleitet. Dieser Weg umfasst alle Membransysteme, Vesikel und Cisternae. Er ist beteiligt an der Sortierung, Modifikation und Transport von Proteinen, umfasst die Lipid- und Polysaccharidsynthese und dient als Calcium-Speicher (Vitale *et al.*, 1993). Das für den sekretorischen Weg bestimmte Protein ist durch ein ca. 16-30 AS langes N-terminales Signal-Peptid (SP) gekennzeichnet (von Heijne, 1994) und wird in das

ER-Lumen transportiert. Proteine, die hingegen in der ER-Membran verbleiben sollen, weisen zusätzlich oder anstelle von SP eine interne hydrophobe Signalregion auf (signal anchor (SA)). Hierbei dienen die Transmembrandomänen des vollständigen Proteins häufig als SA (Kutay *et al.*, 1993). Der Weitertransport der Proteine im Lumen des ER zum Golgi-Apparat und von hier zum Tonoplast oder der Plasmamembran erfolgt über Vesikel, welche Abschnürungen der Membran darstellen. Für diesen GTP-abhängigen Transportmechanismus müssen die Proteine nicht mehr entfaltet werden (Palade, 1975).

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das Ziel verfolgt werden, die Regulation des Fettsäureelongations-Komplexes (FAE-Komplex für fatty acid elongation) aus *Zea mays* auf verschiedenen Ebenen zu charakterisieren. Insbesondere sollte die Regulation auf Protein-Ebene (Protein-Protein Interaktion), auf RNA-Ebene (Expression von FAE-Enzymen in WT- und Mutanten-Pflanzen) und die Lokalisation des Komplexes in der Zelle untersucht werden.

Regulation des FAE-Komplexes auf Proteinebene

In *Zea mays* findet die Elongation von Fettsäuren zu sogenannten very long chain fatty acids (VLCFAs) im FAE-Komplex statt (Agrawal und Stumpf, 1985; Lessire *et al.*, 1985a, 1985b, 1985c, 1989; von Wettstein-Knowles, 1993; Ohlrogge und Browse, 1995), dessen genaue Struktur noch unbekannt ist. Die Proteine können jedoch auch separiert vorliegen. Den Ketoacyl-CoA-Synthasen kommt innerhalb des Komplexes eine zentrale Rolle zu, da sie für die Spezifität des Elongationsschrittes und dessen Umsatzrate verantwortlich sind (James *et al.*, 1995). Aus diesem Grund sollten mit Hilfe eines *Gal4*-Hefe-Twohybrid-Systems, bei dem *ZmKCS-1* als Köderprotein eingesetzt wurde, Interaktionspartner für dieses Protein identifiziert werden. Es könnte sich dabei um die drei fehlenden hypothetischen Enzyme des Komplexes handeln (β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase, Enoyl-CoA-Reduktase, siehe Abb. 2), oder um bisher noch unbekannte Bindungspartner, welche für die Funktion der Fettsäureelongation benötigt werden. Die Bindungsfähigkeit der isolierten putativen Interaktionspartner von *ZmKCS-1* sollten durch verschiedene Enzymassays bestätigt werden.

Eine Membranständigkeit einiger FAE-Komplexenzyme konnte durch verschiedene Versuche in mehreren Organismen wie Raps (*Brassica napus*), Lauch (*Allium porrum*) und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) belegt werden (Cassagne und Lessire, 1978; Agrawal *et al.*, 1984; Post-Beittenmiller, 1996; Harwood, 1988; Kohlwein *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002). Auch in *Zea mays* verdichten sich bezüglich der β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, welche vom *glossy8*-Gen codiert wird, die Hinweise auf eine Membranständigkeit (Xu *et al.*, 1997 und 2002).

Durch den Einsatz eines membranbasierten Twohybrid-Systems sollte neben der Verifizierung der Interaktion auch die Orientierung der FAE-Komplexenzyme in der Membran überprüft werden.

Lokalisation des FAE-Komplexes in der Zelle

Eine Membranständigkeit einiger Enzyme der Fettsäureelongation konnte bereits nachgewiesen werden. Unklar ist bisher jedoch, ob die FAE-Komplexe in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder der Plasmamembran lokalisiert sind. Obwohl sich die Hinweise auf eine Lokalisation in der ER-Membran verdichten, wäre auch das Plasmalemma eine denkbare Alternative.

Durch die biolistische Transformation sollen Fusions-Konstrukte aus FAE-Komplexenzymen und dem "green fluorescent protein" (*GFP*) in Lauchzwiebelzellen transformiert werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie soll die Expression dieser Konstrukte visualisiert und so die Lokalisation der Proteine in der Zelle bestimmt werden.

Regulation der FAE-Komplexenzyme auf RNA-Ebene

Für die sogenannten "glossy"-Mutanten aus Mais ist neben anderen manchmal auftretenden morphologischen Veränderungen immer auch eine gestörte Wachssynthese an den Keimlingsblättern charakteristisch (siehe Kpt. 1.2.3). Interessant ist dabei, dass in den unterschiedlichen "glossy"-Mutanten verschiedene Gene der Fettsäureelongation mutiert sind.

Eine Untersuchung des Expressionsmusters einzelner FAE-Proteine in verschiedenen "glossy"-Mutanten würde demnach zu einem besseren Verständnis der Fettsäuresynthese in Pflanzen beitragen. Insbesondere soll in diesem Zusammenhang eine Beeinflussung der Expression von *ZmKCS-1* sowie weiterer möglicher Komplexpartner durch die "glossy"-Mutationen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad "zur Analyse"), Enzyme und dazugehörige Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Applichem (Darmstadt)
- BioRad (Hercules, USA)
- Boehringer (Mannheim)
- Duchefa (Haarlem, NL)
- Eurogentec (Seraing, Belgien)
- Invitrogen (Carlsbad, USA)
- MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
- Merck (Darmstadt)
- Pharmacia (Hamburg)
- Quiagen (Hilden)
- Roth (Karlsruhe)
- Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Die Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt . Zur Sterilisation wurde 20 Minuten bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert oder steril filtriert.

2.1.2 Molekularbiologische Kits

In dieser Arbeit wurden die nachfolgenden molekularbiologischen Kits verwendet:

- BD Matchmaker™ Library Construction and Screening Kit (BD Biosciences, USA)
- Dual membrane Kit (Dual Systems, Schweiz)
- HybriZap®-2.1 XR cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Heidelberg)
- Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitek, Berlin)
- NucleoSpin® Plasmid-Kit (Machery Nagel, Düren)
- NucleoTrap® Kit (Machery Nagel, Düren)

2.1.3 Vektoren

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die nachfolgenden Vektoren für Klonierung und Expression verwendet:

| Vektor | Verwendung | Selektionsmarker | Firma |
|--------------------------|------------------|-------------------------------------|--------------|
| pBS (SK-) | Klonierung | Amp ^R | Stratagene |
| pCR [®] 2.1Topo | Klonierung | Amp ^R , Kan ^R | Invitrogen |
| pAD-Gal4 2.1 | Hefe Twohybrid | LEU2, Amp ^R | Stratagene |
| pBD-Gal4 Cam | Hefe Twohybrid | TRP1, Cam ^R | Stratagene |
| pTMBV | Membran-Twoybrid | LEU2, Kan ^R | Dual Systems |
| pCMBV | Membran-Twoybrid | LEU2, Kan ^R | Dual Systems |
| pDL2-xN | Membran-Twoybrid | TRP1, Amp ^R | Dual Systems |
| pDL2-Nx | Membran-Twoybrid | TRP1, Amp ^R | Dual Systems |

Tab 3: Aufstellung der verwendeten Vektoren

2.1.4 Bakterien- und Hefestämme

| Stamm | Genotyp | Firma/ Referenz |
|------------------------|--|---|
| <u><i>E. coli</i></u> | | |
| XL1-Blue | recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)] | Stratagene, BULLOCK <i>et al.</i> 1987 |
| XL1Blue MRF | Δ (mrcA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)] | Stratagene, JERPSETH <i>et al.</i> 1992 |
| XLOLR | Δ(mrcA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)] Su ⁻ (nonsuppressing) λ ^R (lambda resistant) | Stratagene, JERPSETH <i>et al.</i> 1992 |

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| TOP10F' | F ['] [lacI ^q Tn10 (Tet ^R)] mcrA Δ(mrr-hsd RMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG | Invitrogen |
| <u>S. cerevisiae</u> | | |
| DSY-1 | MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3, 112 ade2 LYS2:::(lexAop) ₄ -HIS3 URA3:::(lexAop) ₈ -lacZ GAL4) | Dualsystems Biotech |
| YRG-2 | MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 gal4-54 gal80- 538 LYS2::UAS _{GAL1} -TATA _{GAL1} -HIS3 URA3::UAS _{GAL4} 17mers(x3) ⁻ TATA _{CYC1} -lacZ | Stratagene, CALLAHAN <i>et al.</i> 1995 |

Tab 4: Aufstellung der verwendeten Bakterien- und Hefestämme

2.1.5 Maislinie

| Linie | Quelle/Hintergrund |
|-------|-------------------------|
| A188 | Green und Philips, 1974 |

Tab 5: Aufstellung der verwendeten Mais-Linien

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen und Aufbewahrung

Mittels eines sterilen Zahnstochers wurden Zellen einer Einzelkolonie entnommen und in 3 ml LB-Flüssigmedium überführt bzw. auf einer 1,5 % LB-Agarplatte ausgestrichen. Für die Selektion enthielt das Medium das entsprechende Antibiotikum. Zur Langzeitaufbewahrung wurden Glycerolstocks angelegt. Hierfür wurden 300 µl 50 % Glycerin mit 700 µl einer Übernachtskultur vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.2.1.2 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Bakterien wurden in einer 3 ml Übernachtkultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden 250 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton; 0,5 % yeast extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) mit 250 µl der Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 18°C im Schüttelinkubator wachsen lassen. Die Kultur wurde nun für 10 min auf Eis gekühlt und bei 2500g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes; 55 mM MnCl₂; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; pH 6,7 mit KOH) resuspendiert, für 10 min auf Eis gekühlt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 20 ml TB-Puffer unter Zugabe von 7 % DMSO (finale Konzentration) resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Abschließend wurde die Kultur zu 200 µl in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.3 Transformation chemokompetenter Bakterienzellen

Die benötigte Anzahl von Bakterienzellenaliquots wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl TCM-Puffer (1 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM CaCl₂; 1 M MgCl₂) und die DNA zugegeben. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurde eine Hitzeschock für 1 min bei 43°C durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden 200 µl pro LB-Medium Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 DNA

2.2.2.1 Plasmid-DNA Mini Präparation (TENS)

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Eine 1,5 ml Bakterienübernachtkultur mit dem entsprechendem Medium wurde für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl

abgegossen. Das Pellet wurde resuspendiert und anschließend 300 µl 5x TENS-Puffer (1mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 N NaOH; 0,5 % SDS) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde 5 min bei RT inkubiert und danach 150 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) hinzugegeben. Nach Mischung des Ansatzes wurde für 3 min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol abs. gefällt. Nach Waschung mit 70 % Ethanol wurde der Alkohol entfernt, das Pellet getrocknet und in 50 µl RNase-Lösung (20 µg/ml) aufgenommen.

2.2.2.2 Plasmid-DNA Midi Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Eine 50 ml Übernachtskultur mit dem entsprechendem Antibiotikum wurde bei 3500 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4,5 ml Midi-I-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Lysozym (10mg/ml) und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Midi-II-Puffer (0,2 M NaOH; 1 % SDS) hinzugegeben und nach Durchmischung 5 min auf Eis inkubiert. Es wurden 7,5 ml Midi-III-Lösung (60 ml 5 M Kaliumacetat; 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml Aqua dest.) zugegeben, gründlich gemischt und bei 3500 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Miraclothpapiers gefiltert. Das Filtrat wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt, für 10 min auf Eis gestellt und zentrifugiert (3500 rpm, 4°C, 20 min). Die gefällten Nukleinsäuren wurden in 1 ml Midi-I-Puffer gelöst, 1 ml 4 M LiCl zugegeben und erneut zentrifugiert (15000 rpm, 0°C, 20 min). Zum Überstand wurde 5 ml eiskaltes Ethanol abs. gegeben und 30 min bei -70°C gefällt. Der Ansatz wurde nun zentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 20 min) und das Pellet in 500 µl Midi-I-Lösung aufgenommen. Nach einem RNA-Verdau für 30 min bei 37°C mit 10 µl RNase (10 mg/ml) erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook et al., 1989). Nach einer Ethanol-fällung über Nacht mit nachfolgendem Waschschrift wurde die Plasmid-DNA getrocknet und je nach Ausbeute in 100-300 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.2.2.3 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben. Dabei wurde 1 µg Plasmid für 2 h bei der für das jeweilige Enzym benötigten Temperatur inkubiert. Die restringierte DNA wurde über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel isoliert.

2.2.2.4 Präparation von genomischer DNA aus Pflanzen (Dellaporta)

Die Präparation von genomischer DNA aus Maisblättern erfolgte nach Dellaporta *et al.* (1983).

2.2.2.5 Auftrennung von DNA im elektrischen Feld

Für die Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose in Konzentrationen von 0,7-1,5 % in 1 x TAE-Puffer (2 M Tris-Acetat; 100 mM EDTA pH8) aufgekocht. Anschließend wurde die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, in ein Gelbett gegossen und nach dem Aushärten in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer (50 % 2 x TAE; 50 % Glycerin; 1 Spatelspitze Orange G) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung in 1 x TAE-Puffer. Für die Größen- und Mengenbestimmung wurde ein Größenstandard (Smart Ladder, Eurogentec) aufgetragen. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte unter UV-Strahlung.

2.2.2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mit Hilfe eines Skalpells auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und laut Herstellerangaben mit dem NucleoTrap[®] Kit (Machery Nagel, Düren) aufgereinigt.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines restringierten Vektors mit einem DNA-Fragment wurde ein dreifacher molarer Überschuss des Fragments eingesetzt. Unter Verwendung von 1 µl T4-DNA-Ligase in einem 20 µl Ansatz mit 1/10 Volumen Ligationspuffer wurde die DNA für eine Stunde bei 22°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der gesamte Ligationsansatz in chemokompetente Bakterienzellen transformiert (2.2.1.3).

2.2.2.8 Southernblot

Der Transfer genomischer DNA aus dem Gel auf eine Membran erfolgte mit Hilfe der Kapillarblottechnik (Southern, 1975) nach Sambrook *et al.* (1989). Die DNA wurde auf die Nylonmembran Hybond-XL der Firma Amersham Biosciences transferiert. Für die Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese mit UV-Licht (120 mJoules/cm²) bestrahlt.

2.2.2.9 Radioaktive Sondenmarkierung und DNA-Hybridisierung

Die aus den Southernblots stammenden Nylonmembranen wurden in 25 ml Prähybridisierungslösung (1 M NaCl; 1 % SDS; 10 % Dextransulfat; 100 µg/ml Lachssperma DNA) gegeben und 3 h bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Für die Herstellung radioaktiv markierter Sonden wurde α -³²P dCTP und das Prime-it[®] II Random Primer Labeling Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte nach den Protokollen des Herstellers. In Abänderung des Protokolls wurde die Markierung der Sonden 3 h bei 37°C durchgeführt. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Ansatz nach Herstellerangaben über eine Micro Spin[™] S-300 HR Säule der Firma Amersham Biosciences aufgereinigt. Die Sonde wurde für 5 min bei 96°C denaturiert und in die Prähybridisierungslösung der Membran gegeben. Die DNA auf der Membran wurde über Nacht bei 65°C mit der Sonde hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran einmal kurz mit 2 x SSC (+ 0,5 % SDS) gespült und anschließend 5 Minuten bei 65°C gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschschrte mit 0,2 x SSC (+ 0,5 % SDS) für je 15 min bei 65°C. Die Dauer der Expositionszeit mit einem Röntgenfilm richtete sich nach der Stärke des von der Membran abgegebenen Signals.

2.2.2.10 DNA-Amplifikation durch PCR

Die Amplifikation von DNA erfolgte im Allgemeinen unter Verwendung einer *Taq*-DNA Polymerase. Wenn Fragmente mit einer niedrigen Fehlerrate beim Nucleotideinbau hergestellt werden sollten, wurde eine Pfu-DNA Polymerase mit 3'Exonukleaseaktivität verwendet. Nachfolgend ist ein 50 µl Standard-PCR Ansatz aufgeführt:

| Reagenz | Volumen |
|---|---------|
| DNA-Template (10ng/µl) | 1 µl |
| PCR-Puffer (10x) | 5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3 µl |
| dNTP-Mix (je 10 mM dATP,dCTP,dGTP,dTTP) | 1 µl |
| Primer hin (10 µM) | 1 µl |
| Primer rück (10µM) | 1 µl |
| DMSO | 1 µl |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1U/µl) | 1 µl |
| Aqua dest. | 36 µl |

Tab 6: Standard PCR-Ansatz

Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und die Reaktion im Thermocycler wie folgt durchgeführt:

| | | |
|--------|------------------------|-------|
| 3 min | 94 °C | |
| 45 sec | 94 °C | ← 34x |
| 1 min | 62 °C (Primerabhängig) | |
| 2 min | 72 °C | |
| 5 min | 72 °C | |
| ∞ | 4 °C | |

2.2.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzreaktionen erfolgten nicht-radioaktiv nach der Methode von Sanger *et al.* (1977).

Nachfolgend ein 20 µl Standard-Sequenzierungsansatz:

| Reagenz | Volumen |
|--|---------|
| Plasmid-DNA (300 ng/μl) | 3,0 μl |
| Big Dye Terminator mit Amply-Taq [®] DNA Polymerase | 3,0 μl |
| Half Term Puffer | 7,0 μl |
| DMSO | 0,5 μl |
| Primer (10 μM) | 1,0 μl |
| Aqua dest. | 5,5 μl |

Tab 7: Standard Sequenzierungs-Ansatz

Der Sequenz-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und die Reaktion im Thermocycler wie folgt durchgeführt:

| | | | |
|--------------|-------|---|-----|
| 2 min | 96 °C | | |
| 30 sec | 96 °C | ← | 25x |
| 15 sec | 50 °C | | |
| 3 min 30 sec | 60 °C | | |
| 10 min | 60 °C | | |
| ∞ | 4 °C | | |

Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung mit 50 μl Ethanol abs. (RT) und 2 μl 3 M Na-Acetat (pH 5,2). Der Ansatz wurde bei 15000 rpm und 18 °C für 20 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Die Sequenzreaktion wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des DNA-Sequenzierers 311 der Firma Perkin Elmer/ Applied Biosystems durchgeführt. Die Analyse und Sequenzvergleiche erfolgten mit den Programmen Seqman und EditSeq (DNASTAR 3.6 Inc., USA), MacVector[™] 4.1.4 (Scientific Imaging Systems, USA) sowie BLASTX, BLASTN und BLASTP (Altschul *et al*, 1997).

2.2.2.12 Transformation, Expression und Visualisierung von GFP-Konstrukten in Pflanzen

Zu Beginn wurden 40 mg Goldpartikel (0,3-3 μg) in 1 ml Ethanol abs. (RT) gewaschen. Nach zweiminütigem vortexen wurde für 10 sec. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und der Waschvorgang wiederholt. Das Gold wurde zum Schluss in 1 ml Aqua dest. resuspendiert, kurz gevortext und in 50

μl Aliquots bei -20°C bis zur Benutzung eingefroren. Für die biolistische Transformation werden pro Vierfach-Ansatz (4 Schüsse) $12,5 \mu\text{l}$ der Gold-Aliquots benötigt. Diese werden mit $1,25 \mu\text{g}$ Plasmid versetzt und für 30 sec. gevortext. Im Deckel des Eppendorfreaktionsgefäßes wurden $12,5 \mu\text{l}$ $2,5 \text{ M CaCl}_2$ und $5 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ Spermidin gemischt und nach invertieren des Gefäßes kurz gevortext. Nach einer Zentrifugation (20 sec., 13000 rpm, RT) wurde der Überstand entsorgt und das Pellet in $50 \mu\text{l}$ Ethanol abs. (RT) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in $45 \mu\text{l}$ Ethanol abs. (RT) resuspendiert. Pro Schuss wurden je $10 \mu\text{l}$ auf einem Makrocarrier für die biolistische Transformation eingesetzt. Diese erfolgte unter Verwendung des PDS-1000 He-System von BioRad (siehe Bild unten). Für die Transformation nach Angaben des Herstellers wurde epidermales Gewebe aus dem Stengel einer Frühlingszwiebel (*Allium fistulosum* L.) eingesetzt. Nach dem Beschuss wurden die Proben für 4-22h (je nach Expressionsstärke des Konstrukts) bei RT und in Dunkelheit inkubiert. Die Visualisierung der GFP-Konstrukte erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Modell Zeiss Axioskop MC 80) bei 50-400-facher Vergrößerung mit dem Filtersatz 38 (Zeiss, Anregung BP 470/40, Emission: BP525/50). Zur Erzeugung des UV-Lichts wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 W der Firma Osram verwendet. Die Bilder wurden mit der Digitalkamera C4040 Zoom der Firma Olympus dokumentiert.



Abb. 8: Partikelkanone PDS-1000 He-System
(Quelle: <http://www.biorad.com>)

2.2.3 RNA

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe

Bis zu 2 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in vorgekühlte Falconröhrchen überführt. Das Pulver wurde sofort mit 5 ml Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0; 100 mM NaCl; 20 mM EGTA; 2 % SDS), 2,5 ml Phenol (pH 4-5) und 100 µl β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 Minuten im Tumbler durchmischt. Nach der Zugabe von 2,5 ml Chloroform wurden die Proben für weitere 5 Minuten geschüttelt, zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, RT) und die wäßrige obere Phase in ein neues Falcon überführt. Die Lösung wurde erneut wie oben beschrieben behandelt (ohne β-Mercaptoethanol), bis nach der Zentrifugation keine Interphase mehr zu sehen war. Danach wurde noch einmal mit Chloroform extrahiert und die wäßrige Phase einer Na-Acetat/Ethanol-Fällung unterworfen (30 min, -70°C). Nach einer Zentrifugation (3500 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Pellet in 2,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 2,5 ml 4 M LiCl versetzt. Der Ansatz wurde für 3 h auf Eis gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (3500 rpm, 15 min, 4°C), das Pellet in 1 ml Aqua dest. gelöst und erneut einer Na-Acetat/Ethanol-Fällung unterworfen. Die Gesamt-RNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und je nach Ausbeute in 20-60 µl Aqua dest. aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.2.3.2 Auftrennung von RNA im elektrischen Feld

Zur Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen wurden einprozentige Agarosegele mit Formaldehyd (Endkonzentration 6 % Formaldehyd) in 1 x MOPS-Puffer (200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA pH 8) verwendet. Es wurden 10 µg RNA je Probe mit 20 µl RNA-Probenpuffer (1 ml Formamid; 380 µl Formaldehyd; 200 µl 10 x MEN; 420 µl Aqua dest; 5 % Bromphenolblau) versetzt, 2 Minuten bei 65°C denaturiert und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) auf das Gel geladen. Als Längenstandard diente die 0,24-9,25 kb RNA ladder der Firma Life Technologies/Gibco BRL. Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung in 1 x MEN-Puffer (10 x MEN: 400 mM MOPS pH 7; 100 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA). Die Dokumentation erfolgte wie bei DNA-Gelen.

2.2.3.3 Northernblot

Der Transfer von RNA auf Hybond XL-Nylonmembranen (Amersham Biosciences) erfolgte analog zu dem Transfer von DNA (2.2.2.8).

2.2.3.4 Radioaktive Sondenmarkierung und RNA-Hybridisierung

Die Sondenmarkierung und Hybridisierung von RNA erfolgte nach dem Protokoll für die Markierung und Hybridisierung von DNA (2.2.2.9).

2.2.4 Hefen

2.2.4.1 Anzucht der Hefe *S. cerevisiae* und Lagerung

Die Hefezellen wurden in YPAD-Medium (20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 55 mg Adeninsulfat; 40 ml 50%-ige Glucose; 960 ml Aqua dest.) über Nacht bei 30 °C im Schüttelinkubator bei 220 rpm angezogen. Zur kurzzeitigen Lagerung bei 4 °C wurden 1,5 % YPAD-Agarplatten (15 g Agar; 1 l YPAD-Medium) verwendet. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Hefen als so genannte Glycerol-Stocks angelegt. Dazu wurde 1 ml 25 %-iges Glycerin mit 150 µl einer Übernachtskultur gemischt, 10 min bei RT inkubiert und bei -70 °C eingefroren und gelagert.

2.2.4.2 Co-Transformation von zwei Vektoren in Hefe

Es wurden zunächst 50 ml YPAD mit einer Kolonie des frisch ausgestrichenen Hefestammes YRG-2 angeimpft und über Nacht bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Für jede Transformation wurden 1,5 ml dieser Kultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Hefezellen 10 sec in der Laborzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in der restlichen Flüssigkeit (ca. 50-100 µl) resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 µg Carrier DNA (DNA aus Lachssperma, 10mg/ml) wurden je 1 µg Gal4-Bindedomäne- und Gal4-Aktivierungsdomänevektor zugesetzt und gemischt. Es wurden 500 µl eines PLATE-Puffers (90 ml 45 %-iges PEG 4000; 10 ml 1 M LiAc pH 7,5; 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,2 ml 0,5 M EDTA) und nach erneutem mischen 20 µl 1 M DTT zur Suspension gegeben. Die Hefezellen inkubierten für 6 h bei RT, damit sich die Hefezellen auf dem Boden absetzen

konnten. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 10 min. Nach dem runterkühlen auf Eis wurden jeweils 200 µl auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert und bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert.

Drop Out Lösung

| | |
|--|---------------------------------|
| 0,3 g L-Isoleucin | 0,2 g L-Tryptophan ^b |
| 1,5 g L-Valin | 0,3 g L-Tyrosin |
| 0,2 g L-Adenin-hemisulfat | 0,2 g L-Uracil |
| 0,2 g L-Arginin-HCl | 1,0 g L-Glutaminsäure |
| 0,2 g L-Histidin-HCl-Monohydrat ^c | 1,0 g L-Asparaginsäure |
| 1,0 g L-Leucin ^a | 4,0 g L-Serin |
| 0,3 g L-Lysin-HCl | 2,0 g L-Threonin |
| 0,2 g L-Methionin | 0,5 g L-Phenylalanin |

ad Aqua dest. 1 l

^a Leucin wurde weggelassen, um auf Gal4-Aktivierungsdomänevektoren zu selektieren.

^b Tryptophan wurde weggelassen, um auf Gal4-Bindedomänevektoren zu selektieren.

^c Histidin wurde weggelassen, um auf Interaktion der Hybridproteine zu selektieren.

SD-Medium

6,7 g Yeast Nitrogen Base ohne AS
ad Aqua dest. 800 ml
autoklavieren, pH auf 5,8 einstellen

Selektionsmedium

800 ml SD-Medium
100 ml Drop Out Lösung
100 ml 50 %-ige Glucose
(für Platten mit 20 g Agarose)

2.2.4.3 Sequentielle Transformation von zwei Vektoren in Hefe (library screening)

50 ml Selektionsmedium ohne Tryptophan wurden mit 3 Kolonien des mit dem Gal4-Bindedomänevektor vortransformierten Hefe angeimpft und bei 30°C und 220 rpm ÜN schütteln lassen. Am nächsten Tag um 16.00 Uhr wurde die gesamte Kultur in einen Kolben mit 500 ml Selektionsmedium ohne Tryptophan transferiert und bei 20°C und 220 rpm bis zum nächsten Morgen schütteln lassen. Es wurden 1500 ml YPAD-Medium mit der Menge an Hefezellen aus der ÜN-Kultur angeimpft, um auf

eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 zu kommen. Diese Kultur wurde 4 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 min, RT, 3500 rpm) wurde das Pellet in 800 ml H₂O resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml frisch angesetztem LiAc/TE-Mix (400 µl 100 x TE bestehend aus 1 M Tris und 100 mM EDTA; 4 ml 10 x LiAc; 35,6 ml H₂O) aufgenommen und für 15 min bei 30°C ohne schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 2 ml Carrier-DNA (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml) und 500 µg library-Plasmid (Gal4-Aktivierungsdomänevektor) wurde die DNA/Zellsuspension gevortext und 280 µl PEG/LiAc-Mix (56 ml 50 %-iges PEG; 7 ml 10 x LiAc; 750 µl 100 x TE; 6,25 ml Aqua dest.) zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30°C und 200 rpm inkubiert und 35 ml DMSO unter vorsichtigem Mischen zugefügt. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 1 h bei 42°C im Wasserbad. Die Kultur wurde dabei alle 15 min leicht geschwenkt. Nach einem dreiminütigem Abkühlen auf Eis wurden die Zellsuspension für 5 min bei RT und 3500 rpm zentrifugiert und in 1 l YPAD-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde noch einmal für 1 h bei 30°C und 230 rpm inkubiert und nach einer Zentrifugation (5 min, RT, 3500 rpm) mit 40 ml 1 x TE gewaschen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet je nach Ausbeute in 12-14 ml 1 x TE aufgenommen. Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 5 µl und 10 µl auf -Leu/-Trp-Platten (100 mm) ausplattiert und 5-7 Tage bei 30°C inkubiert. Je 250 µl wurden auf -Leu/-Trp/-His-Platten ausgestrichen und ebenso für 5-7 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.4.4 Colorimetrischer *lacZ*-Assay nach der "filter lift"-Methode

Die Hefekolonien wurden auf neue Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Dann wurde von jeder Platte ein Filterabdruck angefertigt. Dazu wurde Whatman[®]-Papier auf die Platte gelegt, die Position markiert und nach 2 min vorsichtig abgezogen. Die Filter wurden für 10 sec in flüssigen Stickstoff getaucht und bei RT aufgetaut. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt. Die Filter wurden mit der Kolonieseite nach oben auf ein mit Z-Puffer-X-Gal getränkten Filter gleicher Größe luftblasenfrei aufgelegt. Die Filter wurden bis zu 2 Tagen bei RT in einem geschlossenen Behältnis aufbewahrt, bis die Kontrollen eine Blaufärbung zeigten. Der Vergleich der Filter mit der zugehörigen Platte identifizierte die positiven Klone.

Z-Puffer (pH 7,0)

60 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O

40 mM NaH₂PO₄ · H₂O

10 mM KCl

1 mM MgSO₄ · 7 H₂O

Z-Puffer-X-Gal

8,00 ml Z-Puffer

0,27 ml β-Mercaptoethanol

1,67 ml X-Gal (20 µg/ml)

2.2.4.5 Colorimetrischer *lacZ*-Assay nach der Dot Blot Methode

Die Hefekolonien wurden für 2 Tage bei 30 °C in Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und mit Aqua dest. auf eine OD₆₀₀ = 1,5 eingestellt. Mittels einer Dot-Blot-Apparatur (siehe Bild unten) wurden verschiedene Volumina auf ein Filterpapier aufgebracht. Dazu wurde zunächst zwischen der Ober- und Unterseite der Dot-Blot-Apparatur ein Whatman-Filter gelegt und die Apparatur dicht verschraubt. Nach dem Probenauftrag in die Vertiefungen der Dot-Blot-Apparatur wurden die Proben mittels einer angeschlossenen Vakuumpumpe durch die Membran gesaugt. Das Aufschließen der Zellen und die anschließende X-Gal-Farbreaktion erfolgten wie in der filter lift Methode beschrieben.

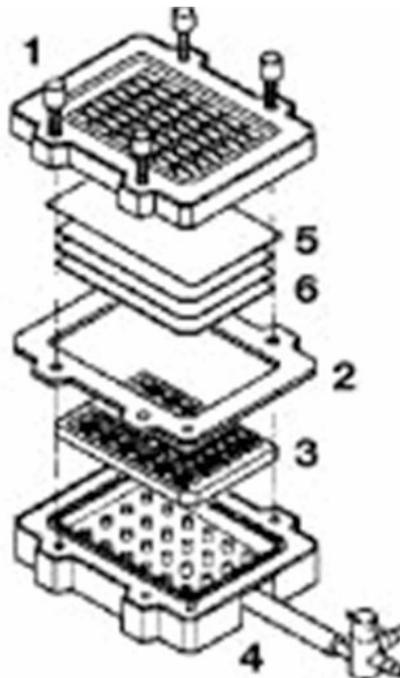


Abb. 9: Dot Blot Apparatur

(Quelle: <http://www.biorad.com>)

2.2.4.6 Photometrischer *lacZ*-Assay

Für die quantitative Bestimmung von Interaktionsstärken zweier Hybridproteine wurde ein photometrischer Assay auf der Basis von ortho-Nitrophenylpyrogalaktosid (oNPG) verwendet.

Hierfür wurde eine Hefekolonie von DSY-1 in 5 ml Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin für ein bis zwei Tage im Schüttelinkubator angezogen. Die Kultur wurde zentrifugiert (2500 rpm, 5 min, RT) und mit YPAD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Die Zellen wurden im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 inkubiert und erneut zentrifugiert (2500 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 350 µl Z-Puffer resuspendiert und auf Eis gekühlt. Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls unter Kühlung durchgeführt. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 950 µl Aqua dest. verdünnt und die OD₆₀₀ bestimmt. Die restlichen 300 µl wurden in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Für das Aufbrechen der Zellwände wurden 150 µl Glasperlen (Ø 425-600) und 50 µl 0,1 % SDS hinzugegeben und zweimal für je 1,5 min gevortext. Zwischendurch wurden die Zellen für 1 min auf Eis gelagert. Nun wurden 200 µl frisch angesetzte ortho-Nitrophenylpyrogalaktosid – Lösung (oNPG-Lsg.) zur Suspension gegeben, gemischt und bei RT inkubiert. Dies entspricht dem Zeitpunkt t_0 der Zeitmessung. Die Gelbfärbung erfolgte nach 1-3 Minuten. Die Enzymreaktion wurde nach zweieinhalb Minuten durch die Zugabe von 400 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min und RT bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im Photometer bei 420 nm gemessen, wobei die Extinktion optimal zwischen 0,2 und 0,8 liegen sollte.

oNPG-Lösung

4 mg/ml Phosphatpuffer

Phosphatpuffer (pH 7,0)

60 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O

40 mM NaH₂PO₄ · H₂O

2.2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe (yeast boiling mini prep)

Eine Hefekolonie wurde in 5 ml Selektionsmedium für 2 Tage bei 30°C und 220 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Es wurden 2 ml der Kultur pelletiert (10 sec, 10000 rpm) und das Pellet in 130 µl STET-Puffer (8 % Sucrose; 50 mM Tris/HCl pH8; 50 mM EDTA; 5 % Triton-X-100) resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,26 g

Glaskügelchen (425-600 µm) wurde für 5 min sehr kräftig gevortext. Anschließend wurden noch einmal 130 µl STET-Puffer zugegeben, kurz gevortext und der Ansatz für den Zellaufschluß für 3 min bei 96°C erhitzt. Die Probe wurde auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (10 min; 15000 rpm; 4°C). Vom Überstand wurden 120 µl mit 60 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt und 1 h bei -20°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wie zuvor wurden 120 µl des Überstandes zu 240 µl eiskaltem Ethanol abs. gegeben für 45 min bei -20°C gefällt. Es wurde zentrifugiert (10 min; 15000 rpm; 4°C) und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 25 µl 5 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen.

2.2.4.8 Transformation von Plasmid-DNA aus Hefe in *E.coli*

Die Transformation von Hefe-Plasmid-DNA in *E.coli* erfolgte wie im Kapitel 2.2.1.3 beschrieben.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, genaueres über die Regulation des Fettsäureelongations-Komplexes (FAE-Komplex für *f*atty *a*cid *e*longation) aus *Zea mays* L. herauszufinden. Insbesondere sollte die Regulation auf der Protein-Ebene (Protein-Protein Interaktion), auf der RNA-Ebene (Expression in WT- und Mutanten-Pflanzen) und die Lokalisation des Komplexes in der Zelle untersucht werden.

Die sogenannten *v*ery *l*ong *c*hain *f*atty *a*cids (VLCFAs), welche einen großen Anteil am Aufbau cuticulärer Wachse von Maiskeimlingen haben, entstehen durch die sukzessive Verkettung von C₂-Körpern aus Malonyl-CoA. Sie beginnt mit der plastidären *de novo* Fettsäure-Biosynthese im Fettsäuresynthese-Komplex [**FAS-Komplex**], bei der Fettsäuren mit C₁₆ bzw. C₁₈ langen Kohlenstoffketten hergestellt werden. Die Enzyme der FAS-Komplexe kommen als separate, lösliche Proteine in der Form von Homodimeren im Stroma der Plastiden vor, so dass die Bezeichnung "Komplex" nur auf ihr funktionelles Zusammenwirken hinweist (siehe Kpt. 1.2.1). Nach der Ausschleusung der Fettsäuren findet die sogenannte Fettsäureelongation bis zu einer Länge von C₃₄-Körpern in Fettsäureelongations-Komplexen [**FAE-Komplex**] statt, die wie die FAS-Komplexe mindestens vier Enzyme pro Verlängerungsschritt der Acyl-CoAs umfassen (siehe Kpt. 1.2.1 und 1.2.2). Unklar für die FAE ist, ob es sich um separate Enzyme oder eine Komplexstruktur handelt. Durch verschiedene Experimente konnte gezeigt werden, dass das kondensierende Enzym für die Spezifität des Elongationsschrittes und dessen Umsatzrate verantwortlich ist (James *et al.*, 1995). Eines der im Mais bekannten kondensierenden Enzyme des FAE-Komplexes ist *ZmKCS-1*. Da *ZmKCS-1* innerhalb des FAE-Komplexes eine so zentrale Rolle zukommt, wurde schon früher von Frenzel (2000) versucht, diese weiter zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte eine vollständige cDNA dieses Enzyms isoliert werden. Außerdem wurden erste Expressionsanalysen mit der *ZmKCS-1* durchgeführt.

Eine genaue Lokalisation des FAE-Komplexes ist bisher nicht gelungen. Vieles weist jedoch darauf hin, dass dieser ER-membranständig agiert (Agrawal *et al.*, 1984; Agrawal und Stumpf, 1985; Lessire *et al.*, 1985a, 1985b, 1985c, 1989; Ohlrogge und Browse, 1995) (siehe hierzu Kpt. 3.2). Viele der VLCFAs werden als Wachsester für den Aufbau der Cuticula und der epicuticulären Wachsschicht benötigt. Eine zellwandnahe Produktion der Fettsäuren wäre demnach ebenso denkbar. Der FAE-

Komplex könnte hierbei an den sogenannten Plasmamembran-assoziierten Membranen (plasmamembrane associated membranes = PAMs) lokalisiert sein, bei denen die ER-Membran Kontakt zur Plasmamembran hat (siehe Kpt. 1.2.2.2). Eine weitere Option ist, dass der FAE-Komplex direkt in der Plasmamembran lokalisiert ist. Unterstützt wird diese These durch das Ergebnis des Protein-Lokalisationsprogramms PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>), welches für *ZmKCS-1* eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Plasmalemma-Lokalisation als einer Lokalisation in der ER-Membran angibt (siehe für Übersicht der Wachssynthese in der Zelle Abb. 1, S. 3).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der Isolierung von Interaktionspartnern für die *ZmKCS-1* auch die Lokalisation dieses Proteins innerhalb der Zelle zu bestimmen. Für die Suche nach Interaktionspartnern wurde das Hefe-Twohybrid-System ausgewählt, da hier das Überprüfen von vielen verschiedenen Klonen in kurzer Zeit möglich ist. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass die Gensequenzen des Bindungspartners sofort verfügbar sind (siehe hierzu auch Abb. 6). Das eben genannte System und eine membranbasiertes Twohybrid-System wurden auch für einen Interaktionstest zwischen *ZmKCS-1* und schon isolierten möglichen Interaktionspartnern wie z.B. dem Produkt des *glossy8*-Gens, eine Ketoacyl-CoA-Reduktase und damit das zweite Enzym der FAE-Komplexe (Xu *et al.*, 1997 und 2002), eingesetzt (für *glossy* siehe auch Abb. 5, S.15).

Um die Lokalisation von *ZmKCS-1* und möglichen Komplexpartnern in der Zelle zu bestimmen, wurden *GFP*-Studien mit diesen Proteinen durchgeführt.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit sollten Expressionsanalysen mit verschiedenen "glossy"-Mutanten aus Mais durchgeführt werden, wobei ein Vergleich des Expressionsmusters der FAE-Komplexkomponenten zwischen Mutanten- und WT-Pflanzen einen möglichen Einfluss der betroffenen "glossy"-Gene auf die KCS-Gene aufdecken soll.

3.1 Untersuchungen zur Regulation der Fettsäureelongation in *Zea mays* L.

Im Verlauf dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Twohybrid-Experimenten untersucht werden, mit welchen Proteinen die β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 (*ZmKCS-1*) aus *Zea mays* interagiert. Bei der Klonierung einer Twohybrid-Bank ist darauf zu achten, dass das Köder-Protein (hier die *ZmKCS-1*) möglichst stark in dem für die Herstellung der

Bank eingesetzten Gewebes exprimiert ist. Bei einer starken Expression des Köders in einem Gewebe kann man davon ausgehen, dass potentielle Bindungspartner hier ebenfalls stark exprimiert sind. Die Wahrscheinlichkeit eines Interaktionsereignisses kann also durch die Wahl des für die Klonierung der Bank eingesetzten Gewebes beeinflusst werden.

Aus diesem Grund wurden mit einer *ZmKCS-1* cDNA-Sonde zu Beginn Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben durchgeführt.

3.1.1 Expressionsanalyse von *ZmKCS-1*

Aus der Literatur ist bekannt, dass die verschiedenen β -KCS Gene innerhalb eines Organismus unterschiedlich exprimiert werden können. Todd *et al.* konnten dieses 1999 in *Arabidopsis thaliana* für das Gen *KCS-1* zeigen. Auch Frenzel (2000) bestätigte dieses im Rahmen seiner Dissertation für die Gene *ZmKCS-1* und *ZmKCS-2* aus *Zea mays*, wobei er eine besonders hohe Expression von beiden Genen in unreifen männlichen Blüten (auch unreife Fahne genannt) entdeckte.

Für die Untersuchung des Expressionsmusters von *ZmKCS-1* in *Zea mays* wurde Gesamt-RNA aus mehreren Geweben adulter Pflanzen und Keimlingen isoliert. Dabei wurden unterschiedliche Gewebe von adulten Pflanzen und Keimlingen ausgewählt. Die RNA wurde nach der Auftrennung im formaldehydhaltigen Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert und mit *ZmKCS-1* hybridisiert. Die untersuchten Gewebe bei der adulten Pflanze sind Blütengewebe (unreife und reife männliche Blüten, nicht pollinierte Stempel) und Stamm- bzw. Blattgewebe (Stengel, Knoten, Hüllblätter, Blattscheide, adultes Blatt). Von sieben Tage alten Keimlingen wurden Blatt, Korn und Wurzel separiert untersucht. Zusätzlich wurde RNA aus vollständigen 36 h und 7 Tage alten Keimlingen aufgetragen (Abb. 10).

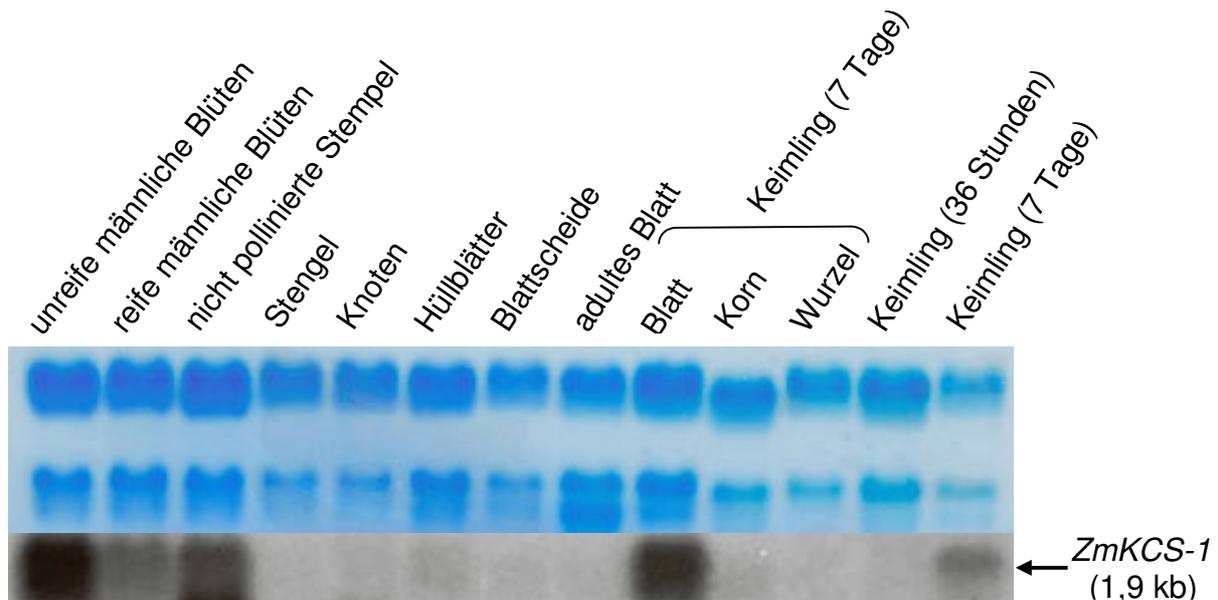


Abb. 10: Expression von *ZmKCS-1* in unterschiedlichen Geweben von *Zea mays*
 Neben Gesamt-RNA aus Geweben von adulten Pflanzen wurde auch Gesamt-RNA aus Keimlingen zum Vergleich der Expression aufgetragen. Der Blot wurde mit dem ORF von *ZmKCS-1* (1,5 kb) hybridisiert. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Methylenblaufärbung als Beladungskontrolle gezeigt.

Eine besonders starke Expression des Gens in unreifen männlichen Blüten konnte erneut bestätigt werden.

In anderen Geweben wie reifen männlichen Blüten oder nicht pollinierten Stempeln wurde eine deutlich niedrigere Expression von *ZmKCS-1* entdeckt. In Geweben aus adulten Pflanzen wie Stengel, Knoten oder Hüllblätter scheint es keine oder nur eine äußerst schwache Expression von *ZmKCS-1* zu geben.

Da die starke Expression von *ZmKCS-1* in unreifen männlichen Blüten von *Zea mays* auch schon früher beobachtet worden ist (Frenzel, 2000), wurde dieses Gewebe in den nachfolgenden Twohybrid-Experimenten für die Herstellung einer cDNA-Bank verwendet.

3.1.2 Experimente zur Interaktion von *ZmKCS-1* mit anderen Proteinen

Um zu untersuchen, ob und wenn ja mit welchen Proteinen *ZmKCS-1* interagiert, sollte ein Hefe-Twohybrid-System verwendet werden. Bei dieser Methode wird ein Protein X an die DNA-Bindungsdomäne und ein Protein Y an die

Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors gebunden. Folglich werden die potentiellen Bindungspartner als Fusionsproteine mit einer der Domänen exprimiert. Nur im Falle einer Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen wird ein Reporter gen exprimiert und ist somit für den Experimentator sichtbar (siehe auch Abb. 6, S. 18).

Im folgenden Kapitel wird mit *ZmKCS-1* ein Twohybrid-Screen durchgeführt, welcher auf dem Transkriptionsaktivator *Gal-4* aus Hefe basiert. (Kpt. 3.1.2.1). Die Interaktionsstärken zwischen *ZmKCS-1* und den aus dem Screening isolierten Klonen wurden anschließend in quantitativen Assays genauer bestimmt (Kpt. 3.1.2.2).

3.1.2.1 Twohybrid Versuche zur Isolierung von Interaktionspartnern für *ZmKCS-1*

Für die Durchführung eines *Gal4*-Hefe-Twohybrid-Screens muss neben der Klonierung des bait-Proteins und der Herstellung einer cDNA-Bank getestet werden, wie stark eine mögliche basale *His3*-Expression des eingesetzten Hefestamms ist, da dieses Gen neben *Gal4* als Reporter gen verwendet wird (siehe Abb. 12). Diese basale *His3*-Expression ermöglicht den Hefen ein Wachstum auf Selektionsmedium ohne Histidin. Jeder Hefestamm zeigt dabei eine unterschiedlich starke Basalexpression dieses Reporter gens. Um ein Wachstum dieser falsch positiven Klone soweit wie möglich zu unterdrücken, kann 3-Amino-(1,2,4)-Triazol (3-AT) zum Selektionsmedium hinzugegeben werden. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des *His3*-Reporter genprodukts, der Imidazolglycerol-Phosphat Dehydratase (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993).. Zu beachten ist jedoch, dass jeder Hefestamm unterschiedlich auf den Einsatz von 3-AT anspricht. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Konzentrationen von 3-AT mit dem eingesetzten Hefestamm YRG-2 getestet (Abb. 11).

3. Ergebnisse

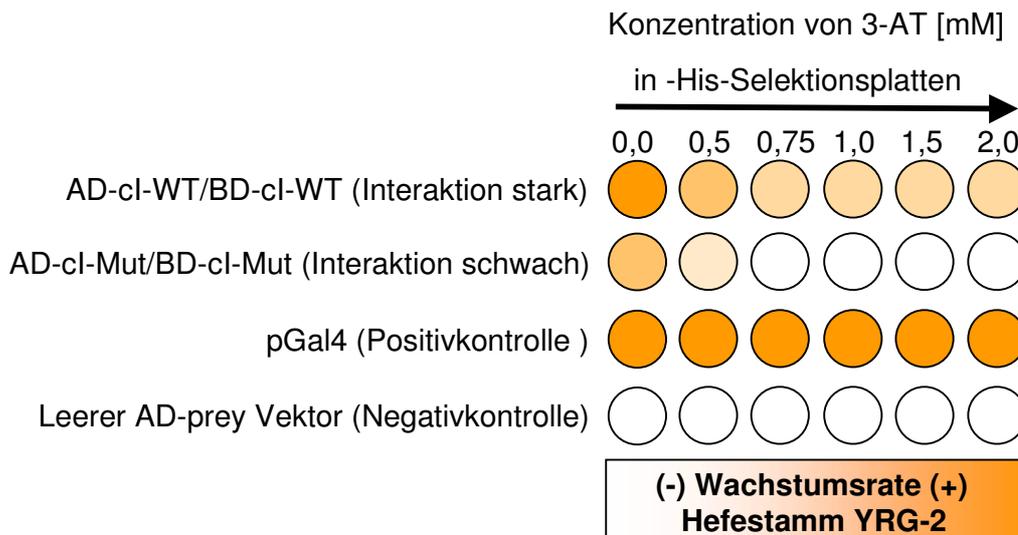


Abb. 11: 3-Amino-(1,2,4)-Triazol Wachstumstest mit dem Hefestamm YRG-2

Der Hefestamm YRG-2 wurde mit verschiedenen Plasmiden transformiert. Anschließend wurde die Hefe auf –Histidin-Selektionsplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen von 3-Amino-(1,2,4)-Triazol (3-AT) ausgestrichen. Die Klone mit den transformierten AD-cl-WT/BD-cl-WT Konstrukten zeigten Wachstum auf Platten bis zu einer Konzentration von 2,0 mM 3-AT. Die cl-Proteine aus dem lambda-Phagen bilden natürlicherweise Homodimere, daher konnten die Hefen durch starke Interaktion der Proteine bei höheren Konzentrationen wachsen. Die Klone, welche mit den Konstrukten für das mutierte cl-Protein transformiert worden sind (AD-cl-Mut/BD-cl-Mut), konnten hingegen nur bis zu einer Konzentration von 0,5 mM 3-AT wachsen. Die Hefen mit der Positivkontrolle (native β -Galaktosidase) als auch der Negativkontrolle (leerer AD-prey-Vektor) zeigten wie erwartet bei jeder Konzentration Wachstum bzw. kein Wachstum.

Wie in Abb. 11 zu sehen, konnten nur die Klone bis zu einer Konzentration von 2,0 mM 3-AT auf den –His-Selektionsplatten wachsen, deren Bindungspartner eine starke Interaktion zeigen. Dieses ist im Falle des cl-Proteins des lambda-Phagen gegeben, welches natürlicherweise Homodimere bildet. Das durch einen Aminosäureaustausch in seiner Interaktionsstärke beeinflusste mutierte cl-Protein (cl-Mut) kann nur noch schwach interagieren. Die mit diesen Konstrukten transformierten Hefen konnten daher nur auf –His-Selektionsplatten bis zu einer 3-AT Konzentration von 0,5 mM wachsen, wobei sie nur noch ein schwaches Wachstum zeigten. Ab 0,5mM wirkte 3-AT letal. Dieses Ergebnis führte zu der Entscheidung, kein 3-AT in dem durchgeführten Twohybrid-Bankenscreening einzusetzen, da der Stamm YRG-2 sehr sensitiv auf 3-AT reagiert. Eine schwache Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und einem unbekanntem potentiellen Bindungspartner wäre bei dem Einsatz von 3-AT möglicherweise herausgefiltert worden.

(Für die folgende Darstellung der Durchführung eines Twohybrid-Screens siehe Abb. 12) Eine cDNA-Bank lag bereits zu Beginn der Arbeit vor und wurde von Frenzel (2002) aus unreifen männlichen Blüten der Maislinie *A188* hergestellt. Ein Kriterium

für die Wahl dieser cDNA-Bank stellte die starke Expression von *ZmKCS-1* in diesem Gewebe dar (Kpt. 3.1.1).

ZmKCS-1 wurde in den bait-Vektor an das 5`-Ende der *Gal4*-Bindedomäne kloniert. Dieser Vektor enthält als Hefeselektionsmarker das *Trp1*-Gen zur Eigensynthese von Tryptophan. Die cDNA-Bank lag wie oben beschrieben bereits im prey-Vektor vor, welcher die Aktivierungsdomäne von *Gal-4* und das *Leu2*-Gen aus Hefe enthält.

Der Hefestamm YRG-2 wurde zuerst mit dem bait-Vektor, in welchen *ZmKCS-1* kloniert wurde, vortransformiert. Mit dieser Hefe wurde ein Vortest zu einer möglichen Autoaktivierung des Reporters durch die *ZmKCS-1* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die mit *ZmKCS-1* vortransformierte Hefe auf Selektionsmedium ohne Tryptophan und Histidin ausgestrichen. Auf diesem Medium konnte kein Wachstum beobachtet werden.

Im nächsten Schritt wurde nun die cDNA-Bank wie im Kpt. 2.2.4.3 beschrieben in den so vorbereiteten Hefestamm transformiert. Diese sequentielle Transformation hat gegenüber der Co-Transformation den Vorteil einer deutlich erhöhten Transformationseffizienz. Um diese Effizienz zu überprüfen, wurden verschiedene Verdünnungsstufen der transformierten Hefe auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Auf diesen Platten können nur solche Hefekolonien wachsen, welche beide Vektoren enthalten. Für die optimale Durchführung eines Twohybrid-Ansatzes sollten ca. **1x10⁶ verschiedene Klone** durchmustert werden. Diese Zahl wurde in mehreren Ansätzen erreicht.

Der mengenmäßig größere Anteil der transformierten Hefe wurde auf 50 Platten (Ø150 mm) mit Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausgestrichen. Nur im Falle einer Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und einem unbekanntem Protein sollten Hefekolonien auf diesem Medium wachsen. Durch die Interaktion der beiden Proteine kann die Transkription des Reporters *His3* aktiviert werden, wodurch die Hefe die Möglichkeit zur Eigensynthese von Histidin erhält. Allerdings können auch sogenannte falsch positive Klone auf den Platten wachsen. Diese Kolonien können auf verschiedene Arten entstehen. Einerseits können die Hefen auf einen gewissen Restpool von Histidin zurückgreifen, welcher ihnen ein Wachstum auf Medium ohne Histidin so lange ermöglicht, bis dieser aufgebraucht ist. Diese Kolonien sind meist kleiner als solche, die tatsächliche Interaktionsereignisse repräsentieren und können daher häufig über die Größe ausselektiert werden. Andererseits kann das isolierte Protein (also das Protein aus der cDNA-Bank) eine

Autoaktivierung des Reporters zeigen. Dieser Fall tritt ein, wenn es sich bei diesem Protein z.B. um einen Transkriptionsfaktor handelt. Auf dieser Selektionsstufe wuchsen ca **2000 Kolonien/1x10⁶ überprüfter Klone**.

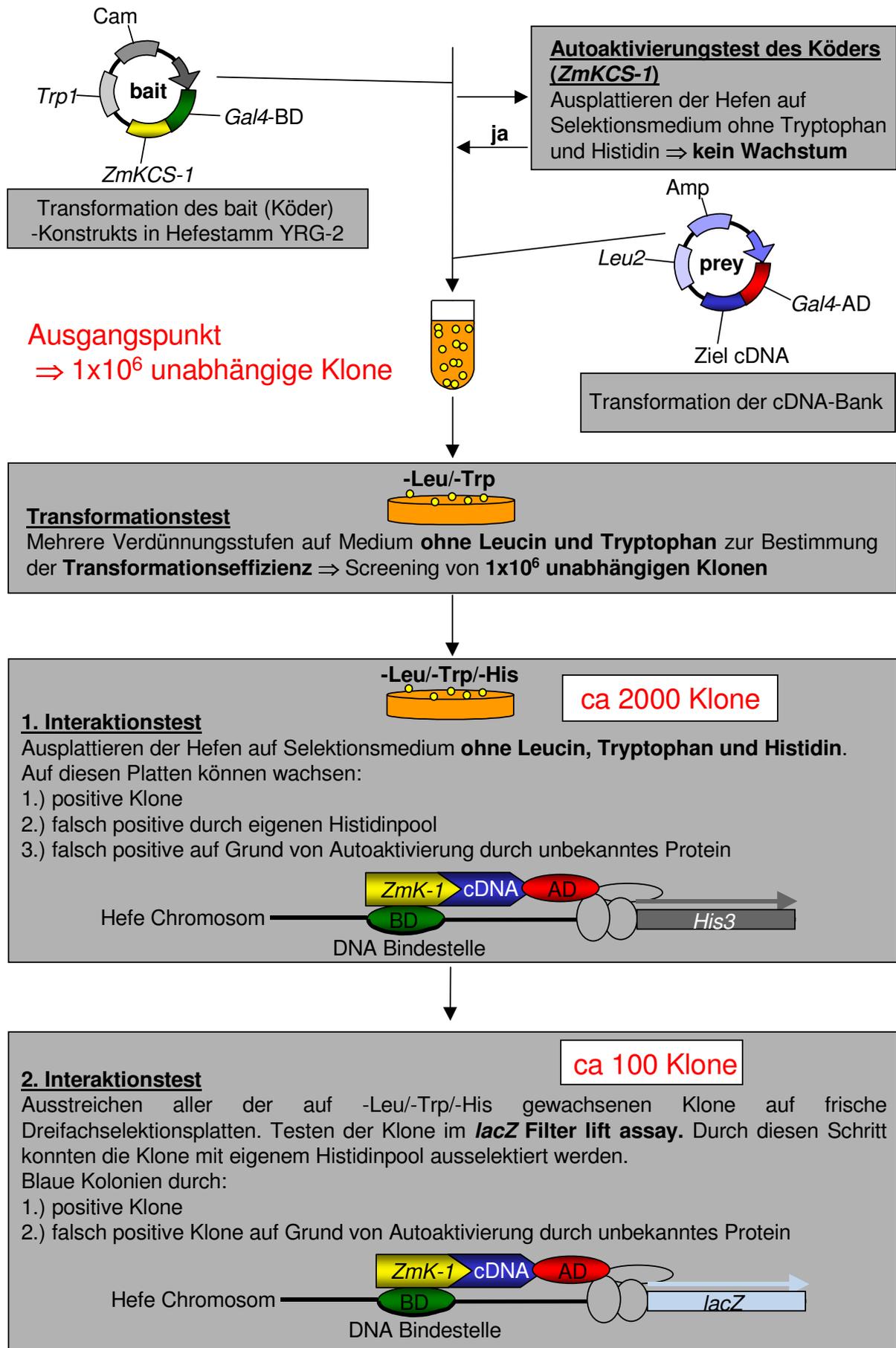
Um das Ergebnis der Interaktion zu verifizieren, wurden alle Hefekolonien, welche Wachstum auf –Leu/-Trp/-His zeigten, auf frische Platten der gleichen Selektionsstufe ausgestrichen. Diese wurden nach fünftägiger Inkubation bei 30°C auf ein Whatmanpapier überstempelt, um einen *lacZ*-Assay durchführen zu können. Hierfür wurde das Whatmanpapier mit den Kolonien in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurde das Papier mit der Kolonieseite nach oben auf ein mit *lacZ*-Puffer durchtränktes zweites Whatmanpapier gelegt und für 24 h bei RT inkubiert. Durch die erneute Selektionsrunde können die falsch positiven Klone ausgesiebt werden, welche aufgrund eines Restpools von Histidin gewachsen sind. Diese bleiben weiß. Auf dieser Selektionsstufe wuchsen noch **100 Kolonien**. Diese repräsentieren entweder positive Klone oder solche, welche nur durch Autoaktivierung des Reporters eine Blaufärbung aufwiesen und daher als falsch Positive angesehen werden müssen. In diesem Fall wäre die zu beobachtende Blaufärbung nicht auf ein wirkliches Interaktionsereignis zwischen dem Köder-Protein (hier die *ZmKCS-1*) und dem Banken-Protein zurückzuführen.

Um sicherzustellen, dass es sich bei der beobachteten Blaufärbung nicht um eine Autoaktivierung des Reporters durch das noch unbekannte Protein handelt (s.o.), musste dieser Fragestellung in einem erneuten Test nachgegangen werden. Hierzu wurde eine Plasmidpräparation der potentiell positiven Hefeklone durchgeführt (Kpt. 2.2.4.7). Durch Anziehen der Hefekulturen in Medium ohne Leucin lag der Selektionsdruck auf dem prey-Vektor (Bibliotheksvektor). Die isolierten prey-Vektoren wurden anschließend in *E.coli* transformiert (Kpt 2.2.1.3), um eine Vermehrung dieser Vektoren zu erreichen. Auch hier lag der Selektionsdruck durch die Zugabe von Ampicillin auf dem prey-Vektor, wodurch eine weitere Anreicherung dieses Vektors ermöglicht wurde.

Nach der Plasmidpräparation aus den Bakterien (Kpt. 2.2.2.1) erfolgte der Test zur fraglichen Autoaktivierung des Reporters durch das unbekannte Protein. Hierfür wurde der prey-Vektor mit dem potentiellen Interaktionspartner in zwei getrennten Ansätzen in Hefen transformiert. Im ersten Ansatz wurde der prey-Vektor in einer Co-Transformation zusammen mit einem leeren bait-Vektor transformiert. Im zweiten Ansatz hingegen wurde der prey-Vektor zusammen mit einem bait-Vektor

transformiert, welcher *ZmKCS-1* enthielt. Der zweite Ansatz spiegelt also die Situation der möglichen Interaktion wieder, während der erste Ansatz eine fragliche Autoaktivierung des Reporters durch das unbekannte Protein aufdecken soll. Die folgende Selektion wurde wie zuvor beschrieben durch Wachstum auf –Leu/-Trp und –Leu/-Trp/-His durchgeführt. Nach dem Überimpfen auf frische Dreifachselektions-Platten wurde ein erneuter *lacZ*-Assay nach der Filterliftmethode durchgeführt. Von den 100 in dieser Hefe-Re-Transformation getesteten Klonen zeigten **3 Klone eine Blaufärbung**. Diese Klone erhielten bedingt durch die fortlaufende Nummerierung die Bezeichnung Klon 2, Klon 7 und Klon 23 (im folgenden *PRP23* genannt ⇒ für Prolinreiches Protein 23 siehe auch Kpt. 3.1.3).

3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

Plasmidpräparation der potentiell positiven Klone aus Hefen. Durch Anziehen der Hefen in Medium ohne Leucin liegt der Selektionsdruck auf dem prey-Vektor

Vermehrungsschritt

Transformation der prey-Vektoren in E.coli. Durch Verwendung von Ampicillin liegt der Selektionsdruck auf dem prey-Vektor

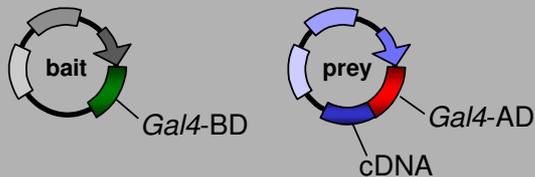
Plasmidpräparation aus E.coli

3. Interaktionstest

Re-Transformation der prey-Vektoren in Hefe in zwei unterschiedlichen Ansätzen

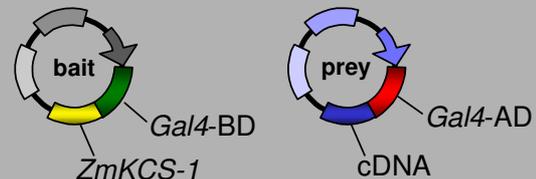
Test zur Autoaktivierung

Prey-Vektor mit unbekannter cDNA wird im ersten Ansatz nur mit leerem bait-Vektor transformiert. Dieses ist ein Test zur möglichen **Autoaktivierung des Reporters** durch das unbekannte Protein.



Wiederholung lacZ-Test

Im zweiten Ansatz wird der prey-Vektor, welcher die unbekannte cDNA enthält, zusammen mit dem *ZmKCS-1* tragendem bait-Vektor transformiert. Dieses ist die Gegenkontrolle.



Nach zwei Selektionsrunden auf -Leu/-Trp und -Leu/-Trp/-His erneuter *lacZ*-Test

⇒ *lacZ*-Test **negativ**

ja

⇒ *lacZ*-Test **positiv**

ja

⇒ **Endgültige Verifizierung in quantitativen Assays und Sequenzierung**

Kontr.



Klon 2

Klon 7

3 Klone (Klon 2, Klon 7, Klon 23) zeigten hier eine Blaufärbung (Ergebnis des X-Gal Tests beispielhaft für Klon 2 und 7 gezeigt). Mit diesen Klonen wurden quantitative Enzym-Assays zur endgültigen Bestätigung durchgeführt

Abb. 12: Übersichtsschema der durchgeführten Twohybrid-Screens

PRP23 zeigte hierbei die stärkste Blaufärbung der drei Klone. **Von ca. 1×10^6 durchmusterten Klonen zeigten also drei Klone eine mögliche Interaktion mit *ZmKCS-1*.**

Um die Stärke dieser Interaktionen zu bestimmen bzw. die Interaktion erneut zu verifizieren, wurden nun quantitative Assays durchgeführt.

3.1.2.2 Quantitative Enzym-Assays zur Bestimmung von Interaktionsstärken von *ZmKCS-1* und anderen Proteinen

In den durchgeführten Twohybrid-Screens (Kpt. 3.1.2.1) konnten Klon 2, Klon 7 und Klon 23 (*PRP23*) als mögliche Interaktionspartner für *ZmKCS-1* isoliert werden. Neben der Interaktionsbestätigung wurde in weiteren Enzym-Assays auch eine mögliche Homodimerisierung von *ZmKCS-1* und *PRP23* überprüft, da die Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS) als Homodimere vorliegen (siehe Kpt. 1.2.1). Auch die FAE-Enzyme könnten daher diese Art der Struktur aufweisen. Die genaue Kombination der in den Assays eingesetzten Konstrukte wird jeweils in den Beschreibungen zu den Tests unter A) und B) erklärt. Die hier beschriebenen Enzym-Tests bieten gegenüber dem im Twohybrid-Screen angewendeten *lacZ*-Filterlift Assay die Möglichkeit zur Quantifizierung der eingesetzten Zellzahl (colorimetrischer *lacZ*-Assay mit Dot Blot und oNPG-Assay mit membranbasiertem Twohybrid-System) bzw. der Interaktion (oNPG-Assay mit membranbasiertem Twohybrid-System). Zu Beginn wurde ein colorimetrischer *lacZ*-Assay nach der Dot Blot Methode durchgeführt (Kpt. 2.2.4.5). Hierbei handelt es sich um eine Variation des *lacZ*-Filterlift Assays, bei dem definierte Mengen Hefezellen aufgetragen werden. Außerdem wurde ein photometrischer *lacZ*-Assay durchgeführt (Kpt. 2.2.4.6), welcher auf der Umsetzung von ortho-Nitrophenylpyrogalaktosid (oNPG) basiert.

A) Colorimetrischer *lacZ*-Assay nach der Dot Blot Methode (Kpt. 2.2.4.5)

Die mit den jeweiligen Konstrukten transformierten Hefen wurden in Selektionsmedium angezogen und auf eine OD_{600} von 1,5 eingestellt. Anschließend wurden die Hefen in unterschiedlichen Volumina mittels einer Dot Blot-Apparatur auf das Papier gesaugt (siehe Abb. 9, Seite 39). Danach erfolgte der Aufschluß der Zellen und ein *lacZ*-Assay. Die Interaktionsstärke der einzelnen Proteine wurde durch die Intensität der Blaufärbung der Hefezellen angezeigt. Zum Vergleich wurden verschiedene Kontrollen verwendet. Das *ci*-Protein aus dem lambda-Phagen bildet natürlicherweise Homodimere, stellt also in der Kombination *ci*-WT/*ci*-WT eine starke

Positivkontrolle dar. cl-Mut/cl-Mut diene als schwächere Positivkontrolle, da hier das cl-Protein mutiert worden ist, was zu einer Abschwächung der Interaktion führt. Das LaminC (LC)-Konstrukt exprimiert einen Teil des humanen LaminC. Dieses Protein fungiert in der Kombination mit cl-WT (cl-WT/LC) als Negativkontrolle, da diese zwei Proteine nicht interagieren.

Die Intensität nahm wie erwartet von cl-WT/cl-WT über cl-Mut/cl-Mut bis cl-WT/LC ab (Abb. 13). Die leichte Blaufärbung der cl-WT/LC-Negativkontrolle ist damit als Hintergrund zu werten. Die drei aus den Twohybrid-Screens isolierten Klone (Klon 2, 7 und 23, im prey-Vektor vorliegend) wurden jeweils mit *ZmKCS-1* im bait-Vektor und in einem zweiten Transformationsansatz mit einem leeren bait-Vektor transformiert und aufgetragen. In der Kombination mit dem leeren bait-Vektor kann eine mögliche Autoaktivierung durch den unbekanntenen Klon detektiert werden. Klon 23 (*PRP23*), welcher im Filterlift-*lacZ*-Assay die stärkste Interaktion mit *ZmKCS-1* aufwies, wurde zusätzlich auf eine mögliche Ausbildung von Homodimeren getestet. Zu diesem Zweck wurde Klon 23 jeweils in den *Gal4*-Aktivierungsdomäne- und den *Gal4*-Bindungsdomäne-Vektor kloniert und in Hefen transformiert.

Das Produkt des *glossy8*-Gens, eine Ketoacyl-CoA-Reduktase (Xu *et al.*, 1997 und 2002), ist Bestandteil der Fettsäureelongation (Kpt. 1.2.3). Um das mögliche Zusammenwirken der FAE-Enzyme in einem Komplex zu untersuchen, sollte eine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *glossy8* getestet werden.

Der Dot Blot-Assay wurde insgesamt fünfmal mit jeweils unabhängigen Klonen für die untersuchten Konstrukt-Kombinationen durchgeführt. Die Intensität der Blaufärbung zeigte jeweils innerhalb eines Blots die gleiche Verteilung, daher ist in Abb. 13 nur ein Blot beispielhaft dargestellt.

3. Ergebnisse

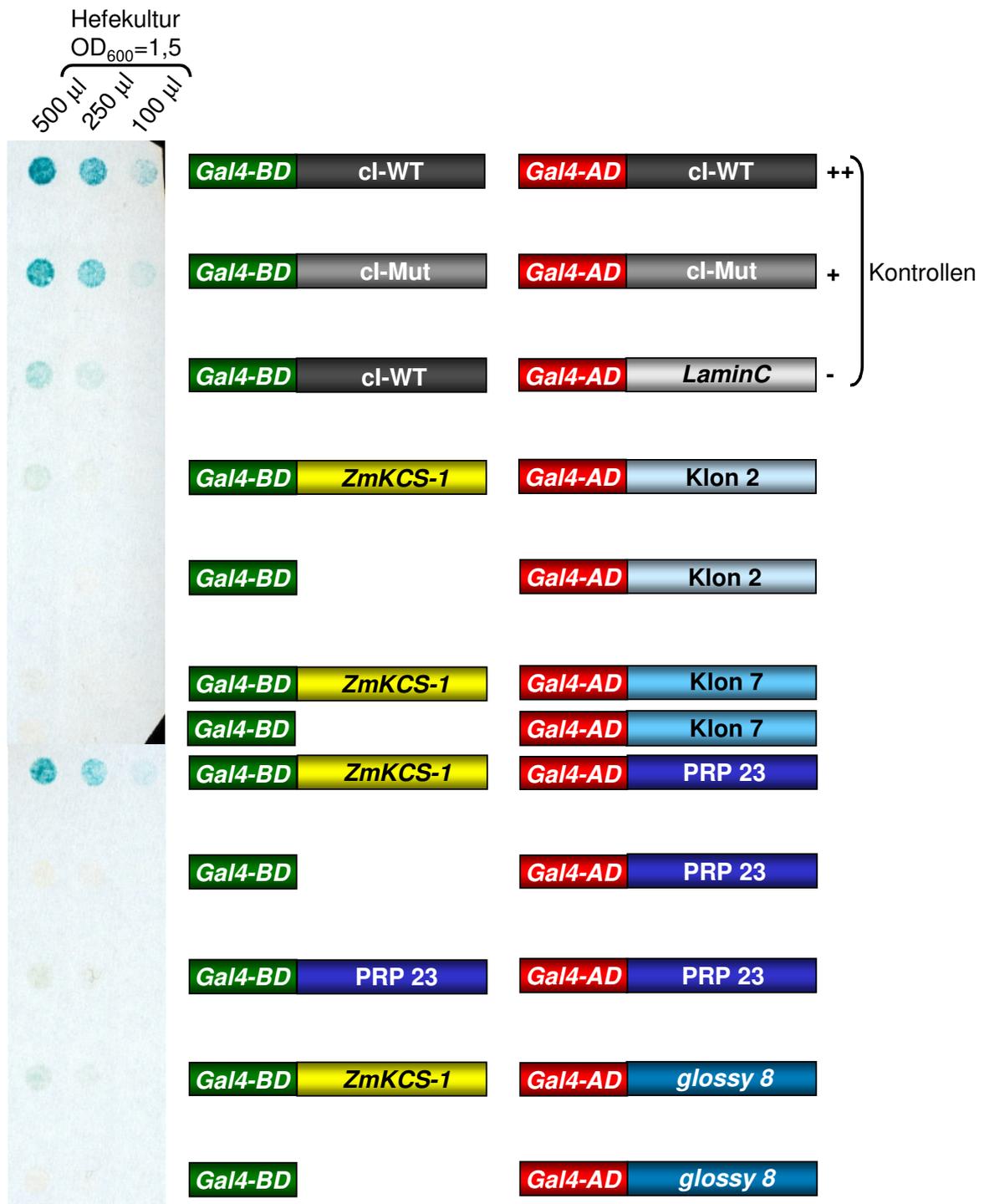


Abb. 13: Colorimetrischer *lacZ*-Assay nach der Dot Blot-Methode

Auf der linken Bildseite ist einer von fünf durchgeführten Dot Blot-Assays beispielhaft zu sehen (Die Intensität der Blaufärbung innerhalb eines Blots zeigte jeweils die gleiche Verteilung, daher wird nur ein Blot dargestellt). Die mit den unterschiedlichen Konstrukten vortransformierten Hefen wurden mit drei unterschiedlichen Volumina aufgetragen und der *lacZ*-Assay durchgeführt. Im Vergleich mit den Kontrollen ist eine deutliche Blaufärbung im Ansatz *Gal4-BD-ZmKCS-1/Gal4-AD-PRP23* zu sehen. Die übrigen untersuchten Ansätze zeigten keine Blaufärbung.

Auf der rechten Seite des Bildes sind die im Colorimetrischen *lacZ*-Assay eingesetzten Konstrukte grafisch dargestellt. Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen sind mit einem + (++ für starke Interaktion) bzw. – gekennzeichnet.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich, ist im Vergleich zu den Kontrollen nur eine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* zu beobachten. Die Blaufärbung entspricht ungefähr der cl-Mut/cl-Mut Positivkontrolle, welches auf eine ähnlich starke Interaktion hinweist. Trotz des negativen Ergebnisses für Klon 2 und Klon 7 wurden diese sequenziert. Das klonierte Stück war in beiden Fällen nur etwa 30 bp lang, ergab jedoch ausgehend vom Startcodon der Aktivierungsdomäne ein "Nonsense"-Protein, welches mit *ZmKCS-1* interagieren konnte (siehe auch Kpt. 4.1.1, S. 77).

Eine Homodimerisierung von *PRP23* konnte nicht beobachtet werden. Zu einer möglichen Homodimerisierung von *ZmKCS-1* kann in diesem Test keine Aussage gemacht werden, da die Konstrukt-Kombination AD-*ZmKCS-1*/BD-*ZmKCS-1* hier nicht getestet worden ist. Diese Fragestellung ist jedoch in den experimentellen Ansätzen mit dem Membran-Twohybrid System (siehe B)) behandelt worden.

Glossy8, welches für das zweite Enzym der Fettsäureelongation (die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase) zu codieren scheint, zeigt in diesem Assay keine Interaktion mit *ZmKCS-1*.

Die Hybridbildung zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* sollte in einem quantitativen oNPG-Assay mit Hilfe des Membran-Twohybrid Systems bestätigt werden. Zusätzlich wurden weitere Konstrukt-Kombinationen getestet.

B) Membran-Twohybrid System und Photometrischer oNPG-Assay

Die Fettsäuresynthese von Kohlenstoffketten bis zu einer Länge von C₁₆ oder C₁₈ findet im Mais durch lösliche Proteine des FAS-Komplexes in den Plastiden statt (Kpt. 1.2). Demgegenüber werden die very long chain fatty acids (VLCFAs) von membranassoziierten Proteinen im FAE-Komplex synthetisiert. Die Membranständigkeit dieser Proteine konnte durch viele Versuche in mehreren Organismen belegt werden. Xu *et al.* konnten als erste die Assoziation eines Mais-Proteins aus dem FAE-Komplex mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums durch subzelluläre Fraktionierung nachweisen. Hierbei handelt es sich um die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, welche vom *glossy8*-Gen codiert wird (Xu *et al.*, 1997 und 2002). Auch für die in dieser Arbeit in den Twohybrid-Screens als Köder eingesetzte β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 (*ZmKCS-1*) wird eine Membranständigkeit angenommen. Zwei große Transmembrandomänen weisen darauf hin (Kpt. 3.1.3,

Abb. 19). Um die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und den aus den Hefe-Twohybrid-Screens isolierten Klonen zu erhöhen, wurde zusätzlich ein membranbasiertes Twohybrid-System ausgewählt. Mit Hilfe dieses Systems können Interaktionen zwischen zwei membranständigen Proteinen oder zwischen einem membranständigen und einem cytosolischen Protein getestet werden (siehe auch Kpt. 1.3.1.2).

Damit ein Interaktionsereignis stattfinden kann, müssen die Proteine interagieren und zusätzlich in einer bestimmten Orientierung in der Membran vorliegen. Nur wenn beide Untereinheiten des Ubiquitins (Cub und Nub) in die cytoplasmatische Seite hängen, kann es zu einer Aktivierung des Reporters durch Abschneiden von *LexA* durch eine Proteinase kommen (Abb.14).

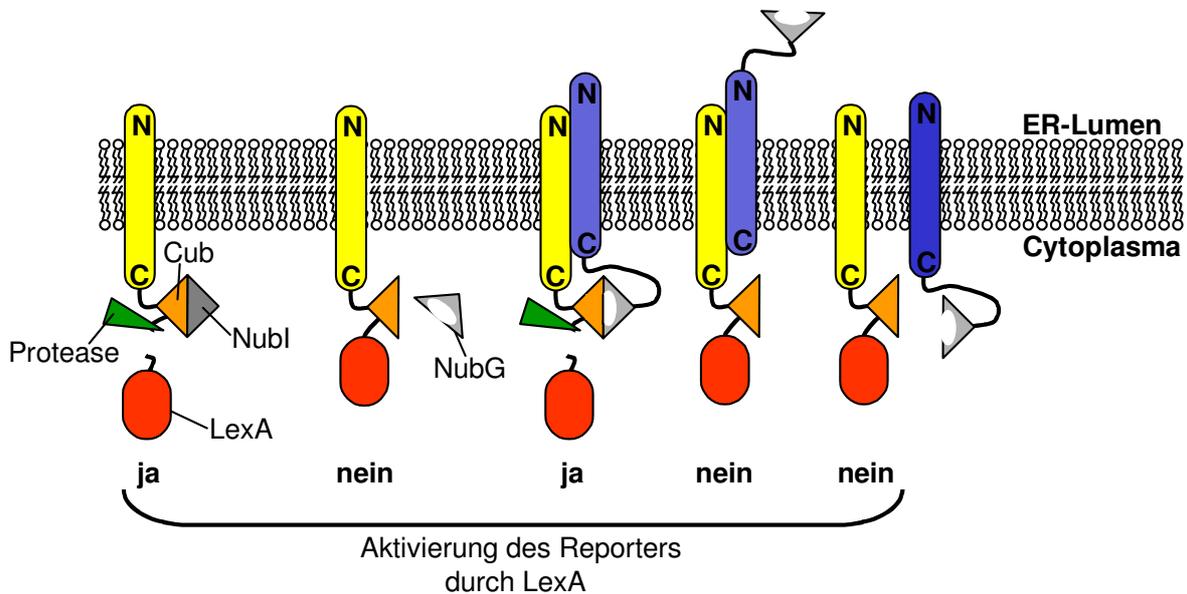
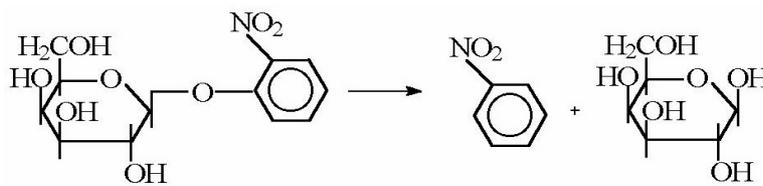


Abb. 14: Zusammenspiel von Interaktion und Orientierung zweier Proteine für die Aktivierung des Reporters

Eine Aktivierung des Reportergens im Nukleus durch das Abschneiden des Aktivators *LexA* (rot) findet nur dann statt, wenn Protein X (gelb) mit Protein Y (blau) interagiert und die Ubiquitin-Untereinheiten in die cytoplasmatische Seite ragen.

Um die Stärke der Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* quantifizieren zu können, wurde ein photometrischer oNPG-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Spaltung von ortho-Nitrophenyl- β -D-pyrogalaktosid (oNPG) zu Nitrophenol und Galaktose durch die β -D-Galaktosidase (*lacZ*).



ortho-Nitrophenyl- β -D-pyrogalaktosid Nitrophenol β -D-Galaktose
(oNPG)

Abb. 15: Umsetzung von oNPG zu Nitrophenol und β -D-Galaktose durch die β -D-Galaktosidase

Nitrophenol absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 420 nm. Optisch ist die Umsetzung von oNPG durch eine Gelbfärbung zu erkennen. Die Änderung der Lichtabsorption durch Nitrophenol kann daher photometrisch bestimmt und so die Enzymaktivität der β -D-Galaktosidase nachgewiesen werden. Diese Aktivität dient der Bestimmung der Bindungsstärke zwischen zwei möglichen Interaktionspartnern, da die Expression der β -D-Galaktosidase nur durch ein Interaktionsereignis eingeleitet werden kann (Abb. 7c).

Der beschriebene oNPG-Assay wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* zu verifizieren und zu quantifizieren. Zusätzlich wurde eine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *glossy8* und eine mögliche Homodimerisierung von *ZmKCS-1* getestet. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, liegen die löslichen Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS) als Homodimere vor. Die an der Fettsäureelongation beteiligten Enzyme, zu denen auch *ZmKCS-1* zählt, sind den FAS-Enzymen in ihrer Funktion und daher möglicherweise in der Fähigkeit zur Ausbildung von Homodimeren sehr ähnlich (Kpt. 1.2.1).

Um den oNPG-Assay durchführen zu können, wurde der Hefestamm DSY-1 mit den zu testenden Konstrukt-Kombinationen transformiert. Die transformierten Hefen wurden anschließend in Flüssigselektionsmedium für 24 h angezogen und die Zellzahl über eine Messung der optischen Dichte angepasst. Nach Aufschließen der Zellen wurde oNPG hinzugefügt. Dieses entspricht dem Zeitpunkt t_0 . Das Substrat wurde für zweieinhalb Minuten bei RT inkubiert und zum Stoppen der Enzymreaktion Na_2CO_3 zugefügt. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand bei 420 nm im Photometer gemessen. Dieser oNPG-Assay wurde sechsmal mit je sechs unabhängigen Klonen für alle eingesetzten Konstrukt-Kombinationen wiederholt und das arithmetische Mittel aus den Werten gebildet. Der Wert für die Positivkontrolle

(*ZmKCS-1-Cub/Nubl*) wurde auf 100% β -Galaktosidaseaktivität gesetzt, der Wert für die Negativkontrolle (*ZmKCS-1-Cub/NubG*) auf 0%. Die Werte der anderen Konstrukte wurden entsprechend prozentual berechnet.

Die Konstrukt-Kombination *ZmKCS-1-Cub/PRP23-NubG* zeigt nach der Positivkontrolle mit fast 50% die höchste β -Galaktosidaseaktivität der getesteten Konstrukte (Abb. 16). Nachdem eine Interaktion dieser beiden Proteine schon im einfachen *lacZ*-Filterlift-Assay und dem colorimetrischen Dot Blot-Assay beobachtet wurde, konnte diese auch im oNPG-Assay bestätigt werden. Mit rund 25% im Vergleich zur Positivkontrolle zeigt die Kombination *ZmKCS-1-Cub/ZmKCS-1-NubG* die zweithöchste β -Galaktosidaseaktivität. Mit dieser Konstrukt-Kombination sollte eine mögliche Homodimerisierung von *ZmKCS-1* getestet werden. Einzig die Kombination *ZmKCS-1-Cub/glossy8-NubG* zeigte in den durchgeführten Assays keine β -Galaktosidaseaktivität. Auffällig ist bei den mit dieser Kombination transformierten Hefen ein schlechtes Wachstum im Selektionsmedium gewesen. Überraschenderweise konnten keine Hefen mit Konstrukt-Kombinationen in Selektionsmedium angezogen werden, bei denen die NubG-Untereinheit an das N-terminale Ende des zu testenden Proteins gebunden war (in den Kombinationen *ZmKCS-1-Cub/NubG-PRP23* und *ZmKCS-1-Cub/NubG-ZmKCS-1*). Folglich konnte mit diesen Kombinationen kein oNPG-Assay durchgeführt werden (siehe hierzu auch Kpt. 4.1.2.1 und 4.1.2.2).

Die Ergebnisse des colorimetrischen und des photometrischen Twohybrid-Assays konnten zeigen, dass

- ***ZmKCS-1* und *PRP23* tatsächlich interagieren**
- ***ZmKCS-1* und *glossy8* nicht zu interagieren scheinen**
- ***ZmKCS-1* Homodimere zu bilden scheint**
- ***ZmKCS-1* und *PRP23* membranständig zu sein scheinen und in einer bestimmten Orientierung in der Membran vorliegen müssen (siehe hierzu Kpt. 4.1.2.1 und 4.1.2.2)**

3. Ergebnisse

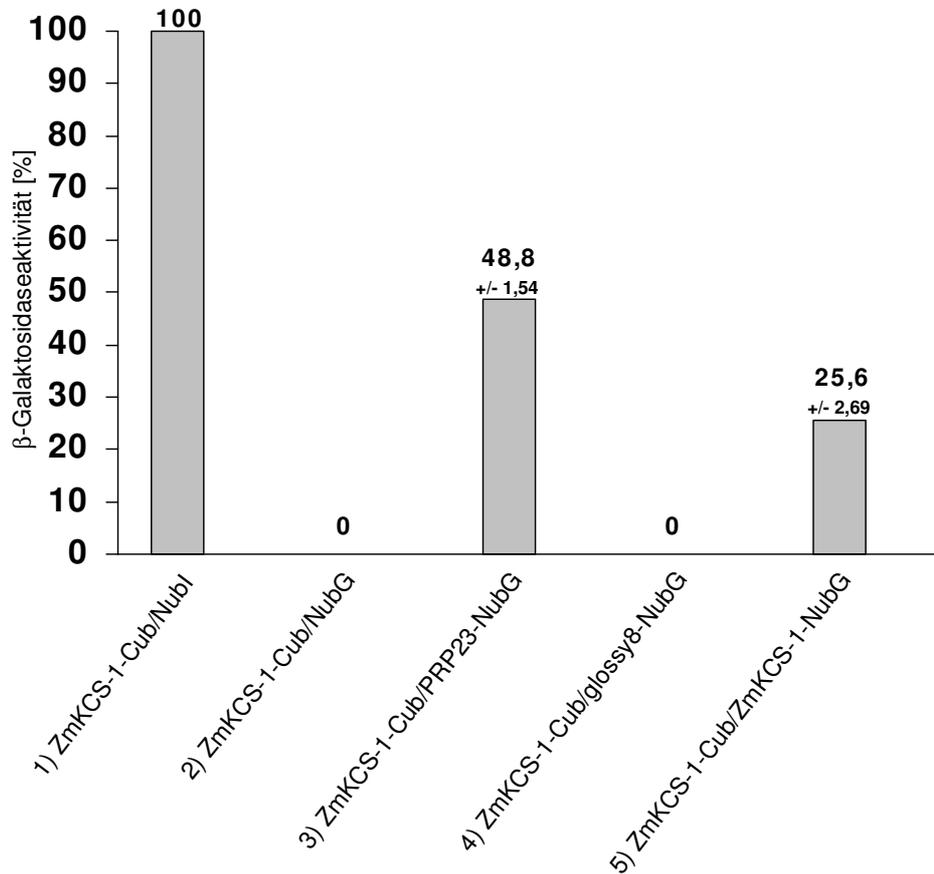
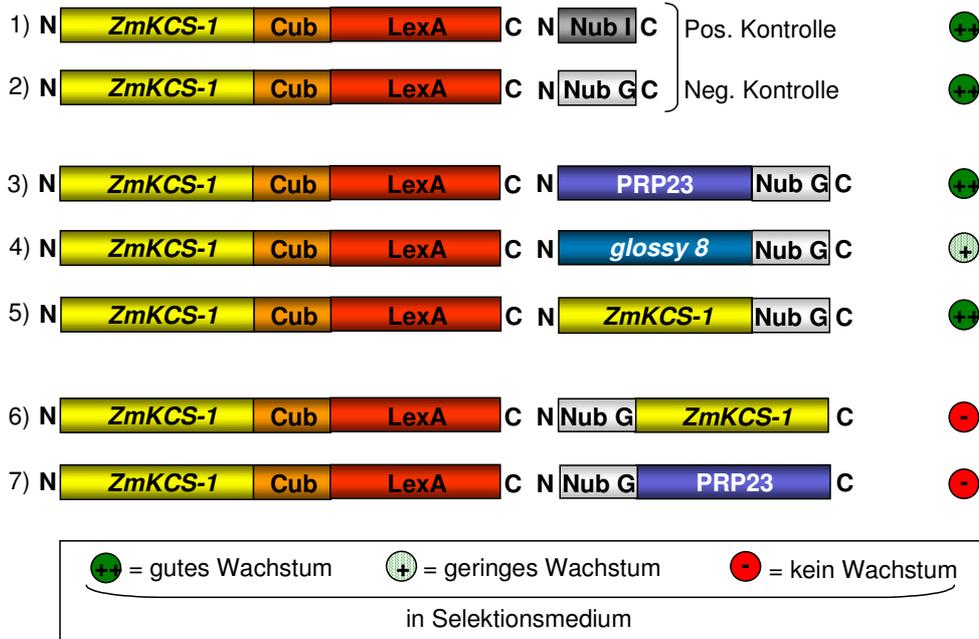


Abb. 16: Ergebnisse des oNPG-Assays

Im oberen Teil des Bildes wurden die eingesetzten Konstrukte in ihrer Proteinform schematisch dargestellt. Außerdem wird die Fähigkeit zum Wachstum in Selektionsmedium angezeigt.

Im unteren Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der oNPG-Assays als Balkendiagramm zusammengefasst. Die β-Galaktosidaseaktivität wurde auf der Y-Achse aufgetragen und in Prozent angegeben. Die angezeigten Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel von sechs unabhängigen oNPG-Assays.

3.1.3 Daten und Versuche zum putativen *ZmKCS-1* Interaktionspartner *PRP23* (Klon 23)

Nachdem die Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und Klon 23 bestätigt werden konnte, erfolgte eine eingehende Sequenzanalyse von *PRP23*. Die klonierte cDNA zeigt eine Gesamtlänge von 969 bp, von denen der mögliche "open reading frame" (ORF) 612 bp einnimmt. Der 3'-untranslatierte Bereich (3'UTR) hat eine Länge von 327 bp, während der 5'UTR nur 30 bp umfasst.

Der ORF von 612 bp ergibt ein Protein mit 203 Aminosäuren Länge und einem geschätzten Molekulargewicht von 20,1 kDa. Auffällig ist eine prolinreiche Region im Bereich des C-Terminus von Klon 23 (Aminosäure 117- 191). Aus diesem Grund wurde Klon 23 in Prolinreiches Protein 23 (*PRP23*) umbenannt. Ein häufig wiederkehrendes Sequenzmotiv in diesem Bereich ist PXPP, wobei P für Prolin und X für eine beliebige Aminosäure steht. Häufig ist X jedoch ein Serin, Alanin oder Lysin (siehe Abb. 17 und Abb. 18).

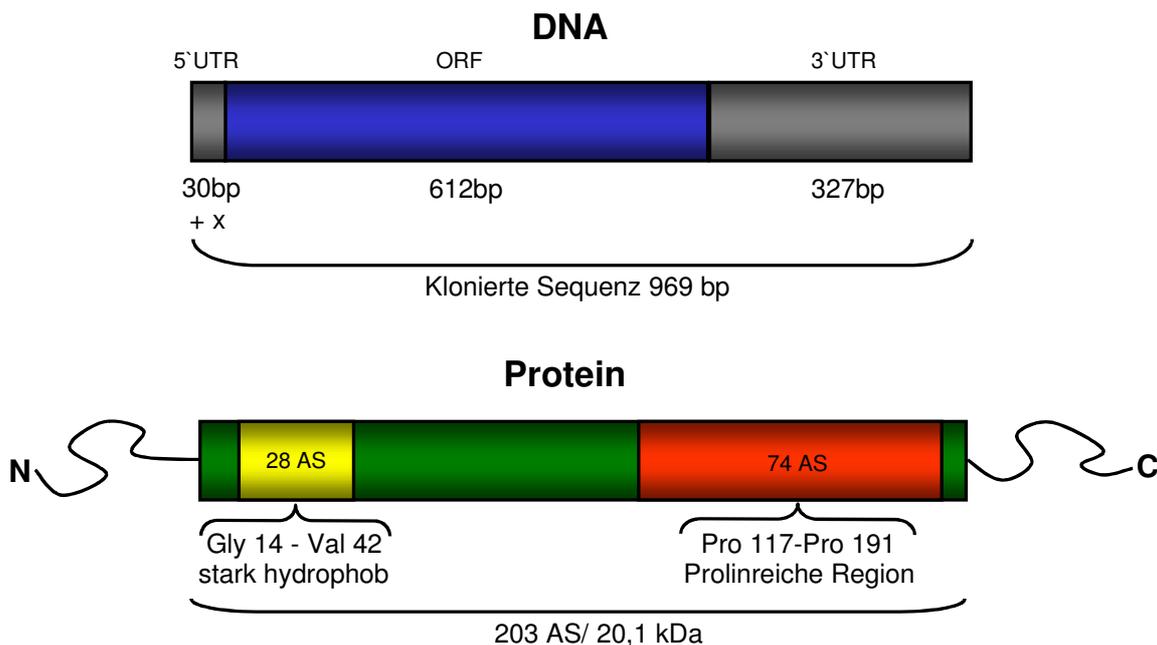


Abb. 17: Grafische Darstellung von *PRP23* auf DNA- und Protein-Ebene

Im oberen Teil des Bildes ist der von *PRP23* klonierte Bereich zu sehen. Dieser umfasst insgesamt 969 bp, wovon der 5'-UTR 30 bp, der ORF 612 bp und der 3'-UTR 327 bp einnimmt.

Unten ist die Proteinstruktur schematisch dargestellt. Der in gelb dargestellte Bereich umfasst eine stark hydrophobe Region im Bereich des N-Terminus von Gly 14 bis Val 42. Der rote Bereich markiert eine prolinreiche Region von Pro 117 bis Pro 191.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe der Datenbanken BLAST und Swiss-Prot wurden Homologievergleiche durchgeführt. Hierbei konnte eine Homologie zu einem möglichen Membranprotein *LEM1* aus *Hordeum vulgare* festgestellt werden, welches mit der Organentwicklung der Ähren in dieser Pflanze in Verbindung gebracht wird (Skadsen *et al.*, 2002) (Abb.18). Daneben wurden Homologien zu putativen antherenspezifischen Proteinen aus *Oryza sativa* entdeckt (nicht gezeigt).

```

PRP23   1  MAAAMTGSTRAASGGSFLLVLLFVVLAVVVDVASAATTAASATVATNSGDSN
LEM1    1  MARTGATTTTAAAAALLLLLALVATGAAAAAGAGYEMNAA-----

PRP23  51  AAALLTMPASASTGQLNGIITQCLLGCFTQVFSCSFGCMGKQ-GADLPLCI
LEM1   41  -----PAAGGRARPAGLTQCVGVCGTTVASCLLDCYDTAAGGTLPICF

PRP23 100  IGC DQRSVVCMIRCGLAPSPPTPSPPAPKPPSPKPPTPKPPTPKPPTPAP
LEM1   84  LGC TNTAVFCATDCSTQAL-----

PRP23 150  PTPAPTPKPPTPKPPTPAPPTPAPPTPMPPTPAPPGPPYTPPYAVTGRKT
LEM1   -----

PRP23 200  ATFD.
LEM1   ----.

```

Abb. 18: Sequenzvergleich von PRP23 und LEM1 auf Proteinebene

Die bei beiden Proteinen homologen Aminosäuren wurden in grün dargestellt. Der rote Bereich markiert die Prolinreiche Region. Ein häufig wiederkehrendes Sequenzmotiv in diesem Bereich ist PXPP (P = Prolin, X = beliebige AS, meist Serin, Alanin, Lysin),

Um einen Hinweis auf mögliche Transmembrandomänen zu erhalten, wurde mit *PRP23* ein Hydrophobizitätsplot nach Kyte-Doolittle (1982) durchgeführt. Es wurde eine stark hydrophobe Region im Bereich des N-Terminus (von Glycin 14 bis Valin 42) entdeckt. *LEM1*, welches Homologie zu *PRP23* zeigt, wurde ebenfalls für diesen Test ausgewählt. Auch dieses Protein weist eine hydrophobe Domäne an ähnlicher Position wie in *PRP23* auf. Zum Vergleich wurde der gleiche Plot mit *ZmKCS-1* und *glossy8* durchgeführt. *ZmKCS-1* weist zwei hydrophobe Regionen im N-terminalen Bereich des Proteins auf, welche auf mögliche Transmembrandomänen hinweisen (Abb. 19).

3. Ergebnisse

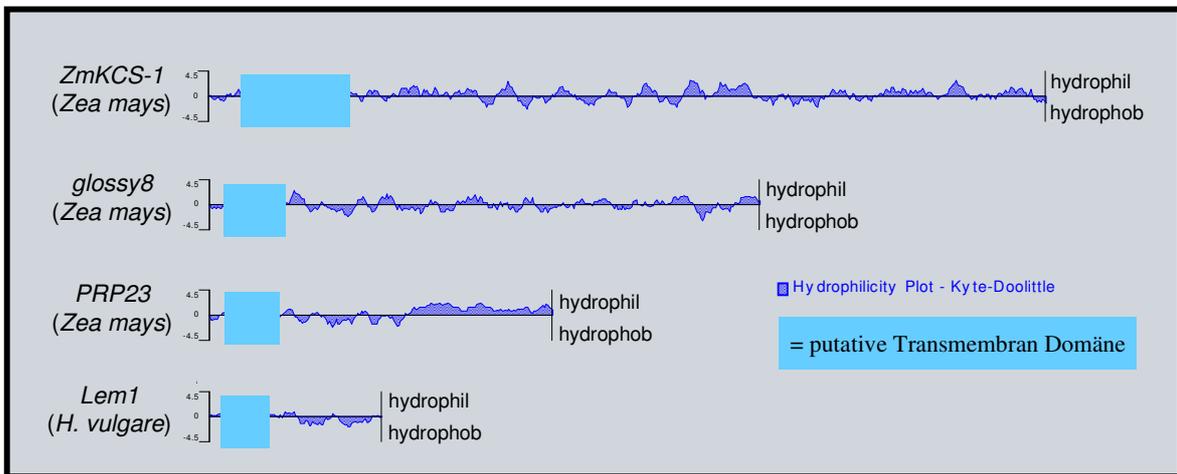


Abb. 19: Hydrophobizitätsmuster verschiedener Proteine im Vergleich

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Hydrophobizität von verschiedenen Proteine nach Kyte-Doolittle (1982). Stark hydrophobe Bereiche wurden hellblau unterlegt.

Für eine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* in den unterschiedlichen Geweben von *Zea mays* wurde postuliert, dass beide Proteine ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen müssten. Diese These wurde durch ein Northernexperiment überprüft, bei welchem Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben aufgetragen wurde. Die Membran wurde erst mit dem ORF von *ZmKCS-1* und anschließend mit *PRP23* hybridisiert (Abb. 20).

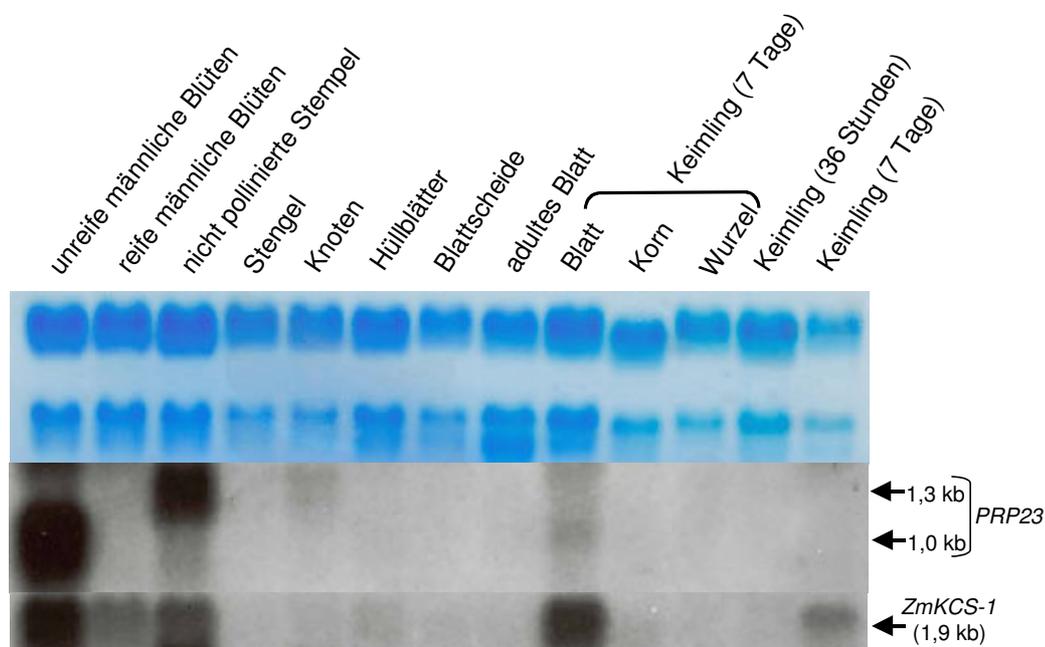


Abb. 20: Expressionsanalyse von *ZmKCS-1* und *PRP23* in unterschiedlichen Geweben von *Zea mays*

Es wurde Gesamt-RNA aus Geweben von adulten Pflanzen und Keimlingen aufgetragen. Die Membran wurde mit der *PRP23*-cDNA (1,0 kb) hybridisiert. Zum Vergleich ist das Expressionsmuster von *ZmKCS-1* in den getesteten Geweben gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Methylenblaufärbung als Beladungskontrolle gezeigt.

ZmKCS-1 zeigt wie erwartet ein Signal bei 1,9 kb. Neben einem starken Signal in unreifen männlichen Blüten konnte ein fast gleich starkes Signal im Blatt aus 7 Tagen alten Keimlingen detektiert werden. Schwächere Signale traten in reifen männlichen Blüten und nicht pollinierten Stempeln auf. Das Signal der gesamten 7 Tage alten Keimlinge ist im Vergleich zu den Keimlingsblättern erwartungsgemäß schwächer, da hier die Blatt-RNA natürlich geringer konzentriert ist.

PRP23 zeigte im Vergleich zu *ZmKCS-1* Signale in zwei unterschiedlichen Höhen. In unreifen männlichen Blüten und Keimlingsblatt wurden je 1 kb detektiert, während in nicht pollinierten Stempeln und Knoten Signale in einer Höhe von 1,3 kb ausgemacht werden konnten (siehe auch Kpt. 4.1.2, S. 88). *PRP23* zeigte eine starke Expression in nicht pollinierten Stempeln und in unreifen männlichen Blüten. Eine starke Expression in der unreifen Fahne ist erwartet worden, da *PRP23* aus diesem Gewebe isoliert werden konnte. Eine schwächere Expression konnte im Knoten und Keimlingsblatt detektiert werden. Das Expressionsmuster von *PRP23* ähnelt dem von *ZmKCS-1*. Es unterscheidet sich nur in der jeweiligen Stärke der Expression im untersuchten Gewebe.

Ein solches nahezu übereinstimmendes Expressionsmuster wurde erwartet, da diese beiden Proteine mögliche Interaktionspartner sind (siehe Kpt. 4.1.2.1).

3.2 Untersuchungen zur Lokalisation von *ZmKCS-1* und *PRP23* in der Zelle

Die Komponenten des Fettsäureelongations-Komplexes (FAE-Komplex von fatty acid elongation), welche für die Elongation von Fettsäuren bis zu einer Länge von 34 Kohlenstoffatomen zuständig sind, scheinen nach allen bisher vorliegenden Daten membranassoziierte Proteine zu sein. Die Membranständigkeit dieser Proteine konnte durch viele Versuche in mehreren Organismen wie Raps (*Brassica napus*), Lauch (*Allium porrum*) und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) belegt werden (Cassagne und Lessire, 1978; Agrawal *et al.*, 1984; Post-Beittenmiller, 1996, Harwood, 1988, Kohlwein *et al.*, 2001, Han *et al.*, 2002). Besonders interessant ist die Entdeckung eines membranständigen FAE-Komplex-Proteins aus *Zea mays*. Hierbei handelt es sich um die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, welche vom *glossy8*-Gen codiert wird (Xu *et al.*, 1997 und 2002).

Auch für die β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 aus Mais (*ZmKCS-1*) wird eine Membranständigkeit angenommen. Der in der dieser Arbeit mit *ZmKCS-1* und anderen Proteinen durchgeführte Hydrophobizitätsplot (Abb. 19) konnte für die β -Ketoacyl-CoA-Synthase zwei große hydrophobe und alphahelicale Regionen im Bereich des N-Terminus dokumentieren.

Um einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Lokalisation des FAE-Komplexes innerhalb der Zelle zu leisten, wurden in dieser Arbeit *GFP*-Konstrukte (für green fluorescent protein) mit *ZmKCS-1* und *PRP23* hergestellt. Diese wurden transient in Lauchzwiebelzellen transformiert und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie visualisiert. Hiermit sollte eine mögliche ER- bzw. Plasmamembran-Lokalisation dieser Proteine belegt werden (siehe auch Kpt. 1.2.2.2).

3.2.1 Herstellung der *GFP*-Konstrukte

Die in dieser Arbeit durchgeführte Klonierung der *GFP*- ("green fluorescent protein") Konstrukte von *ZmKCS-1* und *PRP23* wurde in einem von H. Brylka (2002) modifizierten pmon30049-Vektor vorgenommen, bei dem ein am C-Terminus modifiziertes synthetisches *GFP* (*GFP II*) kloniert worden ist (Abb. 21). In dieser Region ist eine Aminosäuresequenz mit der Abfolge –MDEL- deletiert worden, da diese Sequenz möglicherweise ein ER-Retentionssignal darstellt (Dr. R. Lorbiecke, persönliche Mitteilung). Problematisch könnte hierbei sein, dass häufig nur die

Aminosäure-Abfolge –DEL- konserviert ist, die erste Aminosäure dieses Quartetts jedoch austauschbar ist (Review: Kermode, 1996). Zusätzlich ist in diesem Vektor der 35S-Promotor und das dahinterliegende HSP70-Intron durch einen Ubiquitin-Promotor aus *Zea mays* ausgetauscht worden. In der folgenden Abbildung sind die *GFP*-Konstrukte schematisch dargestellt.

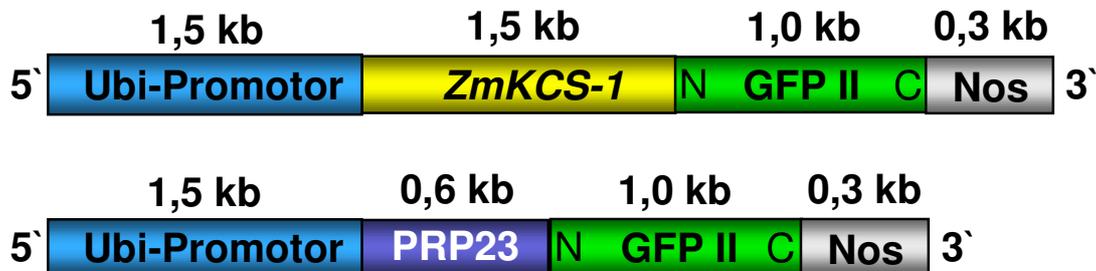


Abb. 21: Schematische Darstellung der *GFP*-Konstrukte

Ubi = Ubiquitin-Promotor aus *Zea mays*; *GFP II* = modifiziertes grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*; Nos = Terminator der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*

Um nach einer Fusion von *ZmKCS-1* und *PRP23* an das N-terminale Ende von *GFP* einen durchgängigen Leserahmen zu erhalten, wurden die Stopcodons der beiden Proteine durch eine PCR-Reaktion entfernt.

3.2.2 Nachweis der *GFP*-Fusionsproteine in transient transformierten Geweben

Für die Untersuchung der Expression der *GFP*-Konstrukte wurden epidermale Zellen von Frühlingszwiebeln (*Allium fistulosum* L.) eingesetzt. Diese haben gegenüber der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) den Vorteil, dass sie meist frischer im Handel zu beziehen sind und sich daher für Expressionsstudien von *GFP*-Konstrukten besser eignen. Darüber hinaus lassen sie sich gegenüber einem Gewebe aus Mais einfacher präparieren. Für jede Transformation der *GFP*-Konstrukte wurde ein ca. 2 cm langes Stück des weißen Teils der Frühlingszwiebel herausgeschnitten, in der Mitte halbiert und eine Zwiebelschuppe in der biolistischen Transformation verwendet (Kpt. 2.2.2.12). Die Proben wurden anschließend für 4-24h (je nach Expressionsstärke des Konstrukts) unter feuchten Bedingungen bei RT und in Dunkelheit inkubiert. Zum Nachweis der Expression der *GFP*-Konstrukte wurde ein Zwiebelhäutchen entfernt und in der Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt (Abb. 22 und 23).

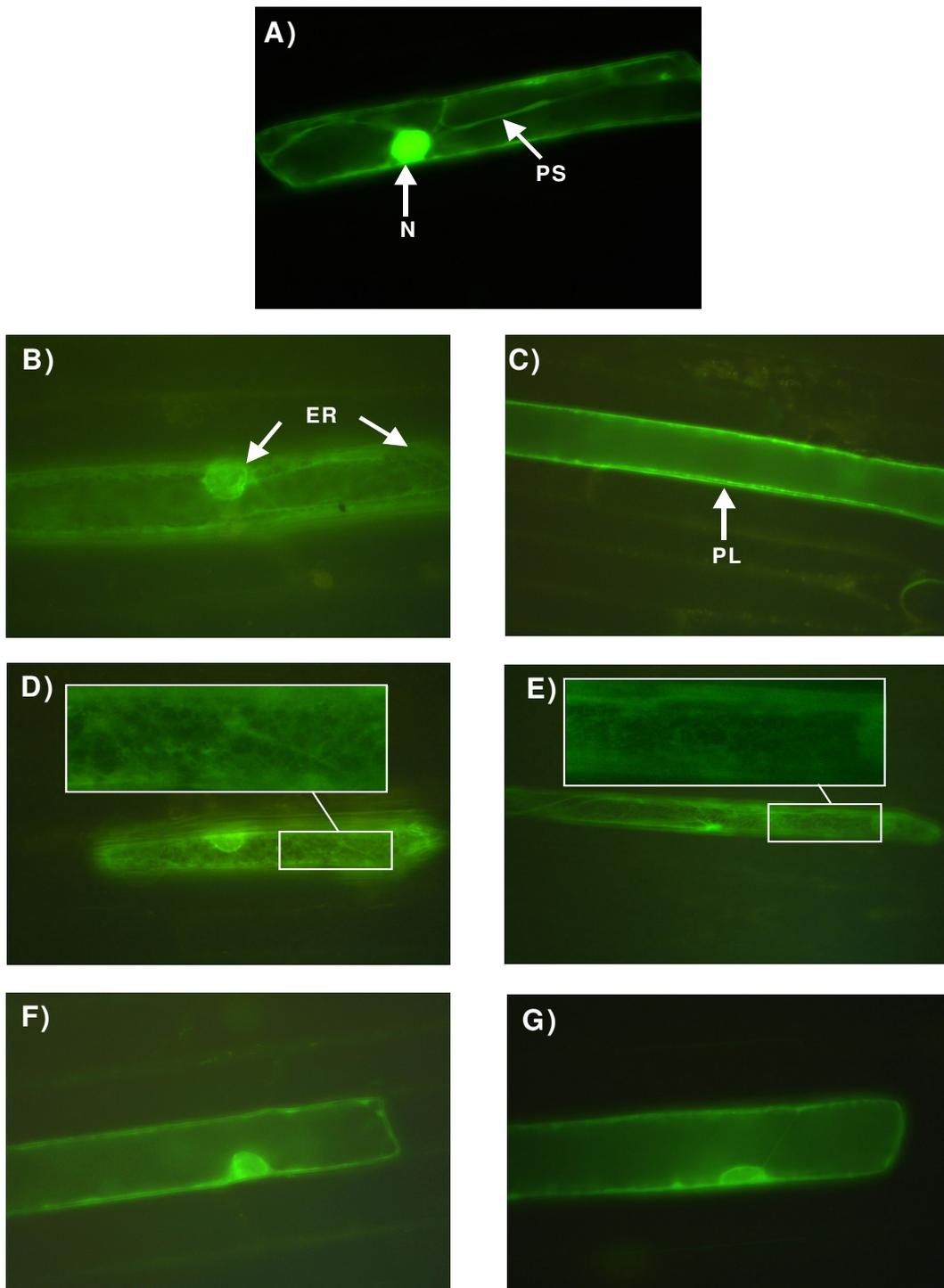


Abb. 22: Lokalisationsstudien von *ZmKCS-1* in Zellen aus *Allium fistulosum* L.

Die Bilder A), B), und C) zeigen jeweils die Expression eines Kontrollproteins. In Bild A) wird nur *GFP* exprimiert. Es findet sich hauptsächlich im Kern (N). Zu sehen sind auch die Plasmastränge (PS). Bild B) zeigt die Expression einer ER-ständigen Steroylglycosyl-Transferase aus *Arabidopsis* (Quelle: Oleg Kusmakow, 2004, nicht publiziert; ER-Lokalisation durch persönliche Mitteilung Pr. Dr. H. Quader, Universität Hamburg, bestätigt). In Bild C) wird das Plasmalemma-ständige (PL) Protein *Pti* aus *Zea mays* exprimiert.

Die Bilder D) und E) zeigen jeweils die Expression von *ZmKCS-1*. Deutlich ist eine Lokalisation im plasmamembrannahen ER als netzartige Struktur zu sehen. Die Photos F) und G) zeigen die Expression eines deletierten *ZmKCS-1*-Gens, bei welchem zwei putative Membrandomänen entfernt worden sind. Das Protein scheint nun im gesamten Cytoplasma verteilt zu sein, teilweise jedoch auch im Kernbereich.

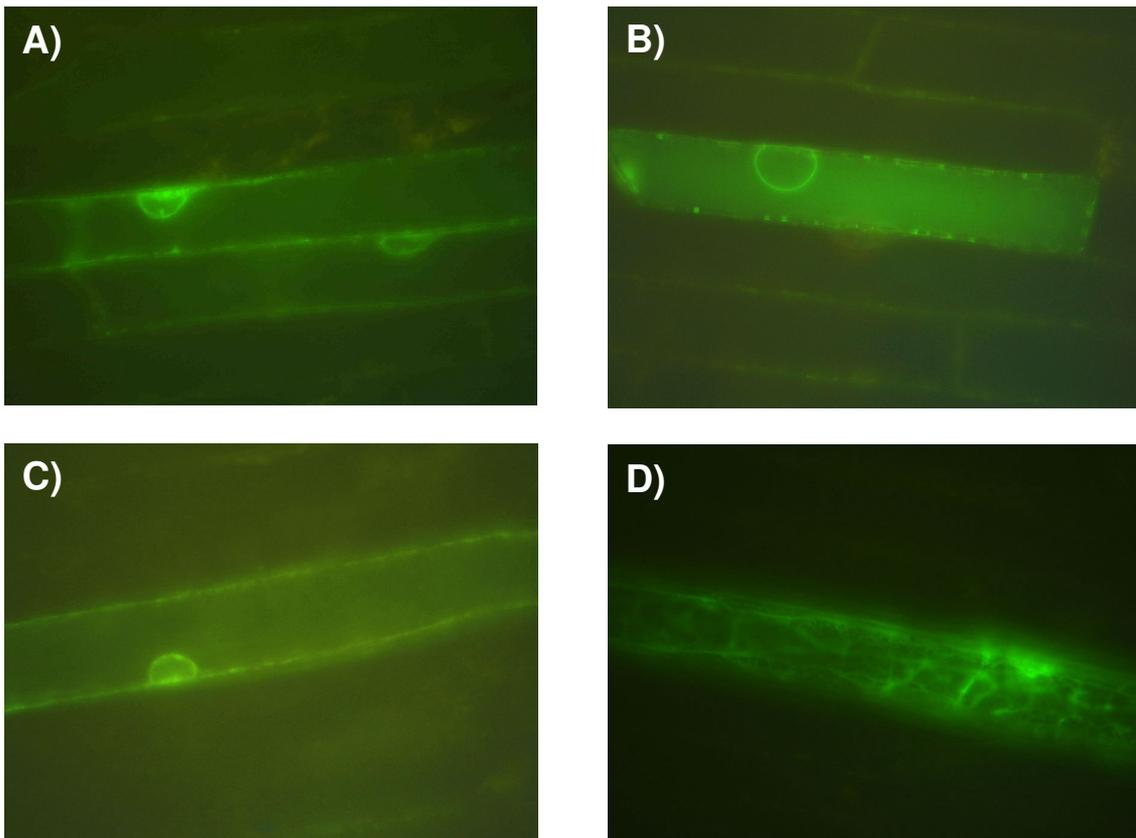


Abb. 23: Lokalisationsstudien von *PRP23* in Zellen aus *Allium fistulosum* L.

Die Bilder A) und B) zeigen jeweils die Expression von *PRP23*. Eine genaue Lokalisation des Proteins ist nicht zu erkennen. Es scheint über die ganze Vakuole verteilt sowie im Bereich des Kerns ER-ständig.

Die Photos C) und D) zeigen die Expression von *ZmKCS-1* und *PRP23* nach einer parallelen Transformation. Es ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Photo C) zeigt eine Lokalisation vermutlich im Cytoplasma, möglicherweise auch in der Vakuole sowie ER im Kernbereich. In Photo D) ist eine deutliche Expression im ER zu erkennen.

Um die Lokalisation von *ZmKCS-1* und *PRP23* besser zuordnen zu können, wurden in separaten Ansätzen Kontrollkonstrukte transformiert. Hierbei wurde *GFP* ohne Fusionsprotein transformiert. Durch seine geringe Größe von 26,9 kDa kann es aus dem Kern austreten und frei in der Zelle diffundieren (Bild A) in Abb. 22). Außerdem wurde *GFP* als Fusionsprotein mit einer ER-ständigen Steroilyglycosyl-Transferase (Quelle: Oleg Kusmakow, 2004, nicht publiziert; ER-Lokalisation durch persönliche Mitteilung von Pr. Dr. Hartmut Quader, Universität Hamburg, bestätigt) aus *Arabidopsis* transformiert (Bild B)). Als drittes Kontrollkonstrukt wurde *GFP* als Fusionsprotein mit der Proteinkinase *ZmPti* aus *Zea mays* transformiert (Herrmann, 2004). Dieses Protein ist im Plasmalemma lokalisiert (Kluth, 2004, je Bild C)).

Abb. 22: Lokalisationsstudien von *ZmKCS-1* in Zellen aus *Allium fistulosum* L.

In Abb. 22 zeigen die Bilder D) und E) Frühlingszwiebelzellen, welche mit dem *ZmKCS-1/GFP* Konstrukt transformiert worden sind. Deutlich ist hier die netzartige

Struktur des Endoplasmatischen Retikulums zu erkennen, welche auch das ER-Kontrollprotein aufweist (Bild B). Diese netzartige Struktur zeigt das plasmamembrannahe ER.

Die Bilder F) und G) derselben Abbildung zeigen Zellen, welche mit einem deletierten *ZmKCS-1*-Protein als Fusion mit *GFP* transformiert worden sind. Es wurden die im Hydrophobizitäts-Plot nach Kyte-Doolittle entdeckten beiden putativen Membrandomänen deletiert (siehe Abb. 19). Wie aus den Bildern F) und G) zu erkennen ist, scheint durch diese Deletion keine eindeutige ER-Lokalisation mehr gegeben zu sein. Das Protein verteilt sich nun über das gesamte Cytoplasma und scheint nur noch im Bereich des Nukleus ER-ständig zu sein.

Abb. 23: Lokalisationsstudien von *PRP23* in Zellen aus *Allium fistulosum* L.

Die Bilder A) und B) dieser Abbildung zeigen mit einem *PRP23/GFP*-Konstrukt transformierte Zellen. Die Lokalisation dieses Proteins erscheint nicht ganz eindeutig. Es ist, ähnlich wie das deletierte *ZmKCS-1*, über die gesamte Vakuole verteilt und im Kernbereich ER-ständig.

Für die Zellen, in die *ZmKCS-1/GFP* und *PRP23/GFP* parallel transformiert worden sind (Bilder C) und D)), ergibt sich ein eher uneinheitliches Bild. Bild C) zeigt eine Expression in der Vakuole sowie im ER des Kernbereiches. In Bild D) ist deutlich die netzartige Struktur des ER's zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, dass *ZmKCS-1* im plasmamembrannahen ER exprimiert wird. Eine Deletion der putativen Transmembrandomänen führt zu einer Delokalisierung dieses Proteins. Es wird nur geringfügig in das ER integriert.

Für *PRP23* konnte keine eindeutige Lokalisierung in Frühlingszwiebelzellen festgestellt werden (siehe auch Kpt. 4.2).

3.3 Expressionsanalysen von FAE-Komplex Komponenten in verschiedenen "glossy"-Mutanten

Very long chain fatty acids (VLCFAs) sind in der Form von Wachsestern ein wichtiger Bestandteil von cuticulären Wachsen in Mais-Keimlingen. Die Synthese dieser VLCFAs wird vermutlich von zwei hintereinandergeschalteten Systemen

übernommen: Zum einen von der plastidären *de novo* Fettsäure-Biosynthese, und zum anderen von dem Fettsäureelongationskomplex, dessen Enzyme aus der mikrosomatischen Fraktion isoliert werden konnten. In *Zea mays* sind 20 loci ("glossy"-loci) identifiziert worden, welche die Menge und/oder die Zusammensetzung der cuticulären Wachse auf der Oberfläche von Keimlings-Blättern beeinflussen (Schnable *et al.*, 1994). Durch die Veränderung der Wachszusammensetzung kann Wasser auf der Oberfläche der Keimlinge anhaften, wodurch der "glossy"-Effekt erzielt wird. Die einzelnen "glossy"-Mutationen zeigen zwar den gleichen Phänotyp, sind molekularbiologisch jedoch auf unterschiedliche Genmutationen zurückzuführen. Bemerkenswert ist hierbei die molekulare Charakterisierung der *glossy15*-Mutation, welche erst sekundär auf die Wachssynthese einwirkt. Primär scheint *glossy15* den Übergang von juvenilen zu adulten Blättern zu steuern (siehe auch Kpt. 1.2.3).

Da in allen "glossy"-Mutanten die Wachssynthese beeinflusst ist, sollte untersucht werden, ob in diesen Pflanzen die Expression von *ZmKCS-1* als Bestandteil des FAE-Komplexes verändert ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob auch die Expression mit dem möglichen Interaktionspartner *PRP23* durch die "glossy"-Mutationen beeinflusst ist. Für diesen Zweck wurde Gesamt-RNA aus unreifen männlichen Blüten verschiedener "glossy"-Mutanten von Mais isoliert und in einem formaldehydhaltigem RNA-Gel aufgetrennt. Zum Vergleich der Expression wurde RNA aus unreifen und reifen männlichen Blüten der WT-Maislinie *A188* aufgetrennt. Nach dem Northernblot wurden die Membranen mit dem ORF von *ZmKCS-1* und der vollständigen *PRP23*-cDNA hybridisiert (Abb. 24).

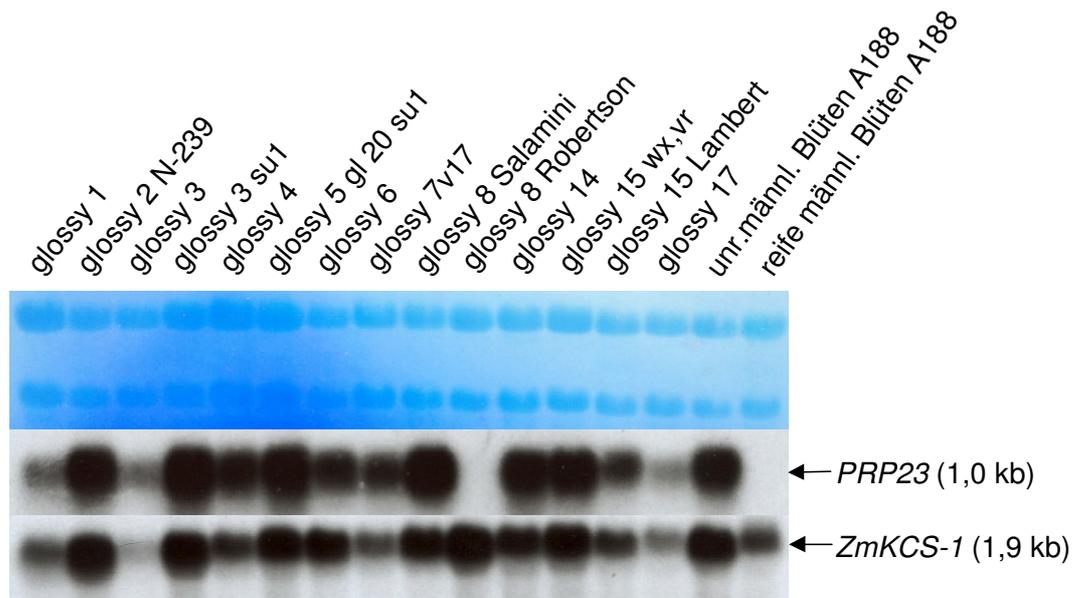


Abb. 24: Expressionsanalyse von *ZmKCS-1* und *PRP23* in unreifen männlichen Blüten unterschiedlicher "glossy"-Mutanten von *Zea mays*

Es wurde RNA aus unreifen männlichen Blüten verschiedener "glossy"-Mutanten von Mais aufgetragen. Zum Vergleich der Expression wurde zusätzlich RNA aus unreifen und reifen männlichen Blüten einer WT-Maislinie (A188) aufgetrennt. Die Membranen wurden mit dem ORF von *ZmKCS-1* (1,5 kb) und einer vollständigen *PRP23*-cDNA (1 kb) hybridisiert. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Methylenblaufärbung als Beladungskontrolle gezeigt.

Für *PRP23* konnte im Vergleich mit den unreifen männlichen Blüten der WT-Pflanze eine deutliche Abnahme der Expression in *glossy1*, *glossy3* und *glossy17* beobachtet werden. In *glossy8* Robertson wurde keine Expression detektiert. Die anderen "glossy"-Mutanten zeigten nur eine geringe oder keine Abweichung der Expression. Eine Bande in der Höhe von 1,3 kb für *PRP23* ist in diesem Versuch nicht erwartet worden, da die RNA für alle "glossy"-Mutanten aus unreifen männlichen Blüten isoliert worden ist und in diesem Gewebe nur eine Bande bei 1,0 kb zeigt (siehe auch Abb. 20).

Im Vergleich hierzu zeigte der putative Interaktionspartner *ZmKCS-1* ein ähnliches Muster der Expression. In den Mutanten, bei denen bei *PRP23* eine Abnahme zu beobachten war, konnte dieses auch bei *ZmKCS-1* beobachtet werden. Einzig bei *glossy8* Robertson und in reifen WT-Fahnen zeigte sich eine Abweichung, da hier nur bei *ZmKCS-1* eine Expression zu beobachten ist.

Zum Vergleich der zuvor durchgeführten Northernanalysen wurde RNA aus "glossy"-Mutanten Maiskeimlingen isoliert und der Northernblot durchgeführt. Die Membran wurde mit dem ORF von *ZmKCS-1* hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die Membran mit einem 1,2 kb Fragment aus einer Proteasom UE hybridisiert (Abb. 25).

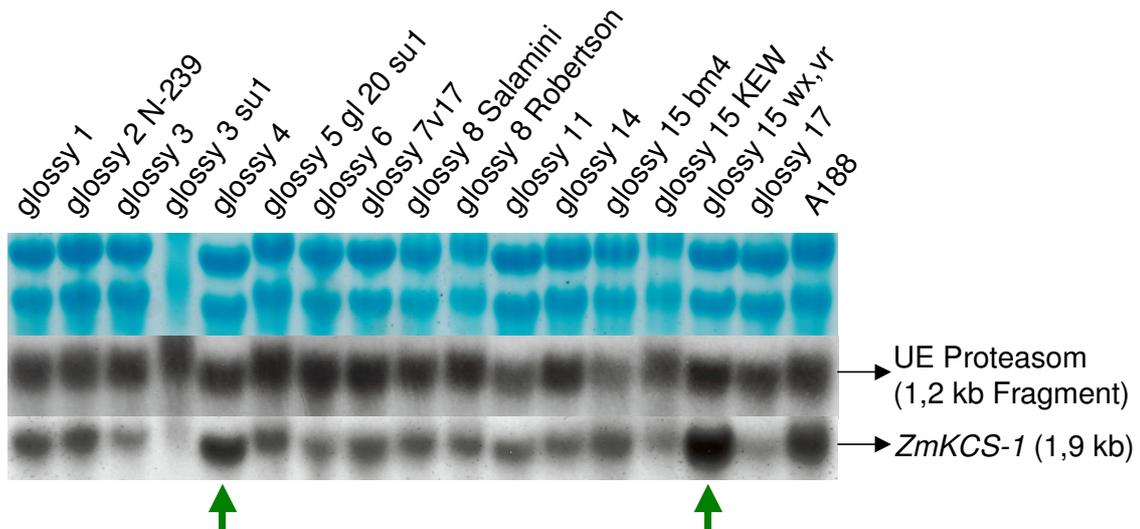


Abb. 25: Expressionsanalyse von *ZmKCS-1* in unterschiedlichen "glossy"-Mutanten Keimlingen von *Zea mays*

Northernblots von RNA aus sieben Tage alten "glossy"-Mutanten Keimlingen. Zum Vergleich der Expression wurde RNA eines WT-Keimlings (*A188*) aufgetrennt. Die Membran wurde mit dem ORF von *ZmKCS-1* (1,5 kb) hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde die Membran mit einem 1,2 kb Fragment einer Proteasom UE aus Mais hybridisiert. Eine Steigerung der Expression von *ZmKCS-1* in den "glossy"-Keimlingen im Vergleich zu *A188* (WT) wird durch einen grünen Pfeil angezeigt. Als zusätzliche Beladungskontrolle ist im oberen Teil der Abbildung eine Methylenblaufärbung gezeigt.

Wie aus der Abbildung zu erkennen, zeigt *ZmKCS-1* in den meisten "glossy"-Mutanten ein schwächeres Signal als in *A188* (WT). Einzig die Mutanten *glossy4* und *glossy15 wx,v* zeigen möglicherweise eine verstärkte Expression dieses Proteins. Zusätzlich zu der in unreifen männlichen Blüten von *glossy1*, *glossy3* und *glossy17* festgestellten Reduktion der *ZmKCS-1*-Expression (Abb. 24) konnte in Keimlingen also in fast allen "glossy"-Mutanten (bis auf *glossy4* und *glossy15 wx,v*) eine verminderte Expression dieses Proteins beobachtet werden.

Die Expression von *PRP23* wurde in "glossy"-Keimlingen nicht untersucht. Eine solcher Test wäre aber vor dem Hintergrund einer möglichen Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* sehr interessant (siehe auch Kpt. 4.4).

Zusammenfassend lassen sich also folgende Aussagen machen (siehe hierzu auch Kpt. 4.3):

- Die "glossy"-Mutationen haben einen Einfluss auf die Expression von *ZmKCS-1* sowie *PRP23*
- Eine erwartete parallele Expression von *ZmKCS-1* und *PRP23* (da putative Komplexpartner) hat sich bestätigt (Abb. 24)

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Regulation des Fettsäureelongations-Komplexes (FAE-Komplex für *fatty acid elongation*) aus *Zea mays* auf verschiedenen Ebenen untersucht werden. Um einen Beitrag zur Aufklärung der Regulation des FAE-Komplexes auf der Protein-Ebene zu leisten, wurden in dieser Arbeit mit der β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 aus *Zea mays* (*ZmKCS-1*) verschiedene Twohybrid-Assays durchgeführt. Hierdurch sollten mögliche Interaktionspartner für das Protein isoliert bzw. Interaktionen zwischen *ZmKCS-1* und putativen Komplexpartnern verifiziert werden. In einem weiteren Teil sollten durch *GFP*-Studien die Lokalisation der *ZmKCS-1* in der Zelle sowie die Expressionsmuster verschiedener FAE-Komplexpartner in WT- und "glossy"-Mutanten von Mais untersucht werden.

Die *ZmKCS-1* ist an der Synthese sogenannter *very long chain fatty acids* (VLCFA) beteiligt. Die VLCFAs haben in Form von Wachsestern einen großen Anteil am Aufbau cuticulärer Wachse von Maiskeimlingen und werden in zwei nacheinandergeschalteten Zellkompartimenten synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das kondensierende Enzym (die *ZmKCS-1*) für die Spezifität des Elongationsschrittes und dessen Umsatzrate verantwortlich ist.

Da den Ketoacyl-CoA-Synthasen innerhalb der Fettsäureelongation eine so zentrale Rolle zukommt, wurde im Verlauf dieser Arbeit versucht, durch den Einsatz von *ZmKCS-1* als Köderprotein in Twohybrid-Screens Komplexpartner zu isolieren. An dieser Stelle wird das Twohybrid-System einer kritischen Betrachtung unterworfen. Für die Enzyme der Fettsäureelongation wird diskutiert, ob diese tatsächlich in einem Komplex organisiert sind oder ob die Enzyme einzeln agieren und die Fettsäuren von einem zum anderen Protein weitergegeben werden (Abb. 4, Seite 13). Auch die Isolierung eines bisher unbekanntes potentiellen Interaktionspartners für *ZmKCS-1*, das *PRP23* (für *P*rolinreiches *P*rotein), wird im Zusammenhang mit der Struktur des Komplexes diskutiert. In diese Betrachtung fließen auch Ergebnisse aus den *lacZ*-Assays (im Hefe-Twohybrid- und membranbasierten Twohybrid-System) mit ein, mit deren Hilfe weitere Interaktionsstudien durchgeführt worden sind und welche einen Hinweis auf die Anzahl der putativen Transmembrandomänen von *ZmKCS-1* liefern konnten.

Eine genaue Lokalisation des FAE-Komplexes in der Zelle ist bisher noch nicht erfolgt. Vieles weist jedoch darauf hin, dass dieser in der ER-Membran lokalisiert ist. Hierbei könnten auch die PAM-Stellen eine Rolle spielen. Der Komplex könnte jedoch auch in der Plasmamembran lokalisiert sein. Diese These wird anhand von in dieser Arbeit angefertigten *GFP*-Bildern diskutiert.

In einem weiteren Abschnitt wird die Expression von *ZmKCS-1* und *PRP23* in "glossy"-Mutanten von Mais kritisch betrachtet, in welchen die Wachssynthese beeinflusst ist.

Abschließend wird ein Ausblick über folgende Versuche mit den Enzymen des FAE-Komplexes gegeben.

4.1 Interaktionsexperimente von FAE-Komplexenzymen in verschiedenen Twohybrid-Systemen

Für die Suche nach Interaktionspartnern für *ZmKCS-1* wurde ein *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System genutzt (Abb. 12, S. 52). In diesem System wurde *ZmKCS-1* als Köder für die Durchmusterung einer Mais-cDNA-Bank aus unreifen männlichen Blüten gewählt. In diesem Zusammenhang werden Vor- und Nachteile des Twohybrid-Systems diskutiert. Nach dem Durchmustern von 1×10^6 unabhängigen Klonen konnten insgesamt drei potentielle Interaktionspartner für *ZmKCS-1* detektiert werden, von denen nur *PRP23* als Bindungspartner in weiteren Twohybrid-Assays (*Gal4*-Hefe-Twohybrid mit Dot Blot-Assay und membranbasiertes Twohybrid-System mit oNPG-Assay) verifiziert werden konnte. Die zu *PRP23* erhaltenen Daten aus den Sequenzanalysen, Hydrophobizitäts-Plots und *GFP*-Experimenten werden anschließend kritisch betrachtet. Am Ende dieses Kapitels wird die Orientierung von *ZmKCS-1* in der Membran besprochen.

4.1.1 Vorteile und Limitierungen des Hefe-Twohybrid-Systems

Für das Untersuchen der eingesetzten cDNA-Bank wurde *ZmKCS-1* als Köderprotein in einem Twohybrid-Ansatz gewählt. Verwendet man wie in dieser Arbeit geschehen eine mit oligo (dT)-Primern hergestellte Bank, wird nur ein Drittel der Proteine im richtigen Leserahmen exprimiert. In diesem Drittel wiederum können die 5'-Enden von sehr langen Transkripten (und damit der Aminoterminus mancher Proteine) unterrepräsentiert sein. Damit ein Screening aussagekräftig ist, müssen daher

mindestens 1×10^6 unabhängige Klone getestet werden. Diese Zahl wurde in mehreren Ansätzen erreicht.

Von Vorteil ist bei der Arbeit mit diesem System, dass man in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl unbekannter Klone testen kann. Außerdem kann man bei einer detektierten Interaktion sofort auf die Gensequenz zurückgreifen, welche im Vektor als cDNA vorliegt. Nutzt man andere Systeme wie z.B. die Affinitätschromatographie muss nach der erfolgten Interaktion erst einmal die Sequenz kloniert werden.

Ein Problem bei der Arbeit mit dem Twohybrid-System ist jedoch ein Auftreten sogenannter "falsch positiver Klone". Diese können aus unterschiedlichen Gründen detektiert werden. Sie können entstehen durch A) Autoaktivierung des Reporters durch das Köderprotein (bait, hier *ZmKCS-1*), B) basale Histidinproduktion, C) Autoaktivierung des Reporters durch das unbekannte isolierte Protein und D) "Nonsense"-Proteine

Zu A) Autoaktivierung des Reporters durch *ZmKCS-1* (bait)

Viele falsch positive Klone können durch eine Autoaktivierung des Reportergens durch das Köderprotein entstehen. Einerseits kann eine Autoaktivierung stattfinden, wenn das Köderprotein eine eigene Transkriptions-Aktivierungsdomäne besitzt. In diesem Fall kann das Fusionsprotein aus der *Gal4*-Bindedomäne und der Aktivierungsdomäne des Köderproteins an Aktivierungssequenzen des Promotors binden und den Reporter aktivieren (Abb. 26) (Ma und Ptashne, 1987; Ruden *et al.*, 1991; Ruden, 1992).

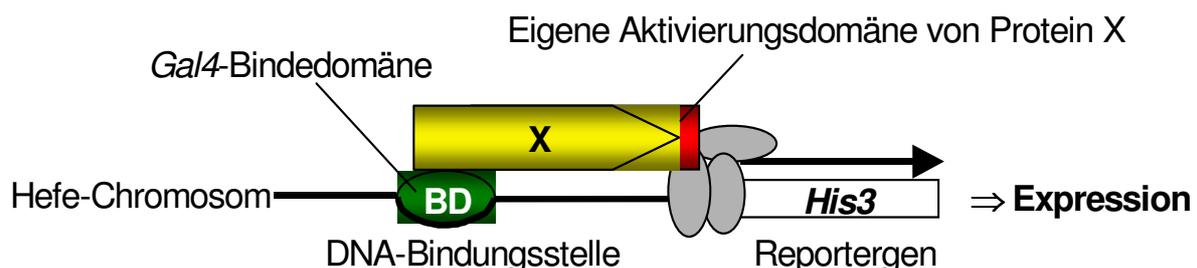


Abb. 26: Autoaktivierung des Reportergens durch das Köderprotein

Durch eine eigene Aktivierungsdomäne (bzw. saure amphipatische Domäne, welche ebenso wirken kann) von Protein X kann eine Autoaktivierung des Reporters bewirkt werden.

Eine solche Aktivierungsdomäne konnte für *ZmKCS-1* jedoch nicht festgestellt werden.

Andererseits kann eine ungewollte Aktivierung der Transkription durch große saure amphipatische Domänen innerhalb des Köders ausgelöst werden (Ruden *et al.*, 1991; Ruden, 1992). Auch eine solche Domäne konnte nicht bei *ZmKCS-1* identifiziert werden. Trotzdem wurde mit *ZmKCS-1* ein Test zur Autoaktivierung durchgeführt, bei dem der mit dem bait-Konstrukt vortransformierte Stamm (BD-*ZmKCS-1*) auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Histidin ausgestrichen worden ist. Auf diesen Platten konnte kein Wachstum der Hefen beobachtet werden, eine Autoaktivierung der Reportergene durch die *ZmKCS-1* konnte also ausgeschlossen werden.

Zu B) Basale Histidinproduktion

Viele Hefen zeigen eine basale *His3*-Expression, die ihnen ein Wachstum auf Selektionsmedium ohne Histidin ermöglicht. Jeder Hefestamm zeigt dabei eine unterschiedlich starke Hintergrundexpression dieses Reportergens. Um diese falsch positiven Klone herauszufiltern, wird zusätzlich zu dem für die Hefe ernährungsphysiologisch wichtigen Reportergen *His3* ein weiteres Reportergen unter Kontrolle eines anderen Promotors eingesetzt. Der in dieser Arbeit eingesetzte Stamm enthält das *lacZ*-Gen, welches einen Nachweis mit X-Gal ermöglicht. Durch diese erneute Selektionsrunde (nach dem Testen von Wachstum der Hefen auf Selektionsmedium ohne Histidin) konnte die Anzahl der positiv getesteten Klone in dieser Arbeit von ca. 2000 Klonen auf ca. 100 Klone reduziert werden (siehe Abb. 12, S. 52). Eine weitere Möglichkeit zum Ausschluss dieser Art von falsch positiven Klonen bietet der Einsatz des kompetitiven Inhibitors 3-Amino-(1,2,4)-Triazol (3-AT) für das *His3*-Genprodukt, die Imidazolglycerol-Phosphat Dehydratase (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993). Hiermit kann eine basale *His3*-Expression der Hefe verhindert werden. Der im *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System eingesetzte Hefestamm zeigt allerdings eine hohe Sensibilität gegenüber 3-AT, so dass diese Chemikalie nicht im Twohybrid-Screen zum Einsatz kam (siehe Kpt. 3.1.2.1).

Zu C) Autoaktivierung des Reporters durch das unbekannte isolierte Protein

Eine weitere Art von falsch positiven Klonen kann durch die Autoaktivierung des Reportergens durch den potentiellen Bindungspartner entstehen. Zeigt dieses Protein DNA-Bindungseigenschaften, welche zu den Bindungsstellen am Promotor des Reporters passen, kann es zur Autoaktivierung durch die *Gal4*-Aktivierungsdomäne kommen (Abb. 27).

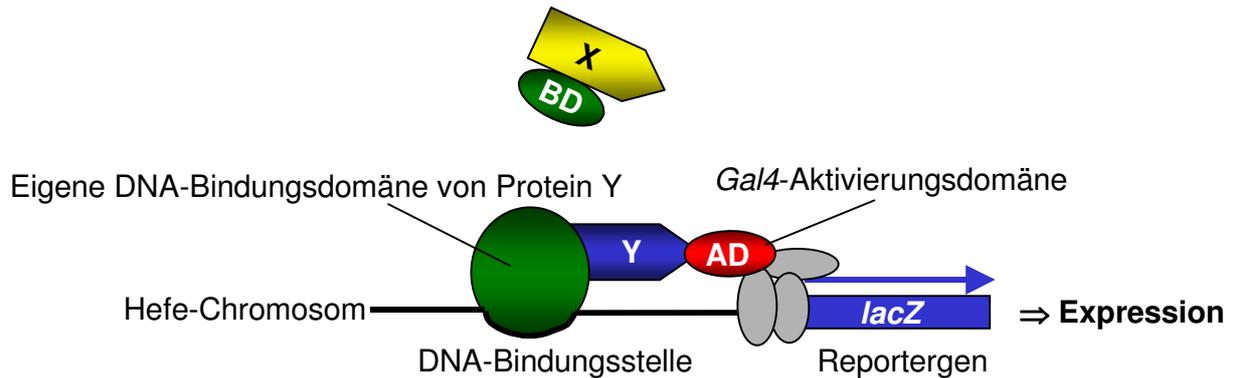


Abb. 27: Autoaktivierung des Reporters durch den isolierten potentiellen Interaktionspartner
 Durch eine eigene DNA-Bindungsdomäne von Protein Y kann die Expression des Reporters aktiviert werden. Die hierdurch detektierte Blaufärbung der Hefen ist also nicht durch ein echtes Interaktionsereignis zwischen Protein X und Y ausgelöst worden.

Um eine solche Autoaktivierung durch das isolierte Protein auszuschließen, wurde ein Test zu dieser Fragestellung durchgeführt. Hierfür wurde der neue potentielle Interaktionspartner (AD-Protein Y) einmal mit einem leeren BD-Vektor und einmal mit *ZmKCS-1* im Bindedomäne-Vektor (BD-*ZmKCS-1*) transformiert und ein *lacZ*-Assay durchgeführt (siehe Abb. 12, S. 52). Durch diesen Test konnten drei Klone (Klon 2, Klon 7 und *PRP23*) als mögliche Bindungspartner für *ZmKCS-1* bestätigt werden.

Zu D) "Nonsense"-Proteine

Durch den Hefe-Twohybrid-Screen konnten drei Klone (Klon 2, 7 und 23, Abb. 12) isoliert werden. Nur Klon 23 (*PRP23*) wurde in folgenden Twohybrid-Tests als Interaktionspartner von *ZmKCS-1* bestätigt. Klon 2 und Klon 7 wurden später als falsch positive Klone erkannt, da sie keine Interaktion in den Dot Blot- (*Gal4*-Twohybrid-System, Abb. 13, S. 55) und den oNPG-Assays (membranbasiertes Twohybrid-System, Abb. 16, S. 60) zeigten. Eine Sequenzierung dieser Klone ergab, dass durch Klonierungsartefakte "Nonsense"-Proteine entstanden sind, welche im *lacZ*-Filterlift-Assay Interaktion mit dem Köderprotein zeigten. Eine Interaktion von "Nonsense"-Proteinen ist schon öfter beobachtet worden (Matchmaker *Gal4* Twohybrid-System 3 User Manual, Aufl. Juni 1999).

4.1.2 Mögliche Interaktionspartner von *ZmKCS-1*

4.1.2.1 *PRP23*: Ein kleines prolinreiches Protein ist als putativer Bindungspartner von *ZmKCS-1* möglicherweise am FAE-Komplex beteiligt

Mit Hilfe des *Gal4*-Hefe-Twohybrid-Systems konnte der mögliche *ZmKCS-1*-Interaktionspartner *PRP23* isoliert werden (Kpt. 3.1.2.1). Diese Interaktion konnte in weiteren Enzym-Assays mit Hilfe eines Dot Blot-Assays (*Gal4*-Hefe-Twohybrid-System, Kpt. 3.1.2.2 A)) und eines oNPG-Assays (membranbasiertes Twohybrid-System, Kpt. 3.1.2.2 B)) verifiziert werden. Eine Homodimerisierung von *PRP23* konnte im oNPG-Assay jedoch nicht festgestellt werden (siehe auch Kpt. 4.1.2.1, Abschnitt "Struktur von *PRP23*").

Regulation von *PRP23*: Die Expression von *PRP23* ist in sich entwickelnden Geweben besonders stark und zeigt ein ähnliches Muster wie die Expression von *ZmKCS-1*

In einem Northernexperiment wurde die Expression von *PRP23* in verschiedenen Geweben von *Zea mays* L. getestet (Abb. 20. S. 65). Hierbei zeigte sich eine besonders starke Expression dieses Proteins in sich entwickelndem Gewebe. *PRP23* könnte daher am Aufbau der Cuticula in diesen Geweben beteiligt sein (siehe auch Kpt. 4.1.2.1, Abschnitt "Funktion von *PRP23*")

Damit die in den verschiedenen *lacZ*-Assays beobachtete Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* auch *in vivo* stattfinden kann, wurde postuliert, dass beide Proteine ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen müssen. Diese These wurde in einem Northernexperiment überprüft (Abb. 20. S. 63). Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigen *ZmKCS-1* und *PRP23* wie erwartet ein ähnliches Expressionsmuster. Erwartungsgemäß gibt es eine parallele starke Expression der beiden Proteine in unreifen männlichen Blüten, da *PRP23* aus einer Bank dieses Gewebes isoliert worden ist. Das *PRP23* und *ZmKCS-1* nicht zusammen in reifen männlichen Blüten exprimiert werden, könnte damit zusammenhängen, dass in unterschiedlichen Geweben Proteine exprimiert werden, welche funktional dieselben Aufgaben wie *PRP23* übernehmen und mit *ZmKCS-1* interagieren. Von der Sequenz her müssen diese Proteine jedoch nicht übereinstimmen. Bei dem Vergleich des Expressionsmusters in diesem Experiment ist auch zu beachten, dass die Membran mit der vollständigen cDNA von Klon 23 hybridisiert worden ist. Daher könnten neben *PRP23* auch verwandte Proteine detektiert werden, wenn es sich bei diesem Gen um

ein Multicopy-Gen handelt. Um eine genauere Aussage zur gemeinsamen Expression von *ZmKCS-1* und *PRP23* in den unterschiedlichen Geweben machen zu können, müsste die Membran jeweils mit dem 3'-untranslatierten Bereich der beiden Gene hybridisiert werden.

Die bei *PRP23* in zwei unterschiedlichen Höhen zu beobachtenden Banden bei 1,0 kb und 1,3 kb könnten einerseits von verwandten Proteinen stammen, welche eine ähnliche Sequenz aufweisen und mit denen die Sonde von *PRP23* kreuzhybridisiert. Andererseits könnten die unterschiedlich großen Transkripte durch differentielles Spleißen entstanden sein, wodurch die Proteine an die Erfordernisse des jeweiligen Gewebes angepasst werden. Das sogenannte differentielle oder alternative Spleißen ist in allen Eukaryoten ein weit verbreitetes System für die Herstellung verschiedener Proteine von einem Genort ausgehend. Diese genetische Diversität wird durch das Weglassen bzw. Hinzufügen bestimmter Exonsequenzen erreicht, wobei der Mechanismus häufig gewebespezifisch reguliert wird (Breitbart *et al.*, 1987). Eines der am besten in Pflanzen untersuchten Proteine, welches durch alternatives Spleißen reguliert wird, ist die Ribulosebisphosphat Carboxylase (Rubisco) Aktivase (Eckardt, 2002). Dieser Spleißmechanismus konnte für dieses Protein neben anderen Pflanzen schon in Spinat und *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Werneke *et al.*, 1989).

Struktur von *PRP23*: Das prolinreiche Protein 23 hat möglicherweise eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen und ragt mit dem C-Terminus in das Cytoplasma

Für die FAE-Komplexe wurde in vielen Organismen eine Membranständigkeit vorhergesagt (siehe Kpt. 1.2.2.2). Neben einer noch nicht belegten Lokalisation in der ER-Membran oder der Zellmembran ist auch die genaue Struktur und Orientierung der Proteine in der Membran bisher noch nicht bekannt. Eine Vorhersage für einige Proteine gibt es in diesem Bereich dennoch. Für das Produkt des *glossy8*-Gens, eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, werden eine bzw. vier Transmembrandomänen vorhergesagt (Xu *et al.*, 1997 und 2002). Auch für einige der bisher bekannten β -Ketoacyl-CoA-Synthasen werden Transmembrandomänen vorhergesagt (Blacklock und Jaworski, 2002). Da *PRP23* ein möglicher Interaktionspartner von *ZmKCS-1* zu sein scheint, ist auch die Aufklärung der Membran-Topologie dieses Proteins von Bedeutung für das Verständnis der Funktionsweise des FAE-Komplexes. Daher wurde dieses Protein mit Hilfe

verschiedener Algorithmen auf seine Anzahl der möglichen Transmembrandomänen untersucht. Nachfolgend die Ergebnisse dieser Untersuchung:

PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>): keine Transmembrandomäne

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>): eine Transmembrandomäne

PHD (<http://cubic.bioc.columbia.edu>),

SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.al.jp>) und

TMpred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html): je zwei Transmembrandomänen

HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/server/hmmtop.cgi>): drei Transmembrandomänen

Da durch diese Analysen in Bezug auf die Membran-Topologie von *PRP23* keine einheitliche Aussage getroffen werden konnte, sollte das membranbasierte Twohybrid-System neben der Verifizierung von Interaktionsereignissen zur Aufklärung dieser Frage dienen (Abb. 16, S. 60). Zu diesem Zweck wurde der oNPG-Assay auch mit Konstrukten durchgeführt, welche die NubG-UE von Ubiquitin am N-terminalen Ende statt am C-terminalen Ende des Proteins exprimieren. Interessanterweise konnten keine Hefen in –His-Selektionsmedium zum Wachsen gebracht werden, bei denen die NubG-UE N-terminal exprimiert wird. Dazu gehören die Konstrukt-Kombinationen *ZmKCS-1-Cub/NubG-PRP23* und *ZmKCS-1-Cub/NubG-ZmKCS-1*. Die Kombinationen jedoch, bei denen NubG an das C-terminale Ende des Proteins gehängt worden ist (in *ZmKCS-1-Cub/PRP23-NubG* und *ZmKCS-1-Cub/ZmKCS-1-NubG*), zeigten eine relativ starke Interaktion und die Hefeklonen ein normales Wachstum. Um aus diesen Ergebnissen in Bezug auf die Membran-Topologie von *PRP23* (für *ZmKCS-1* siehe Kpt. 4.1.2.2) Schlussfolgerungen ziehen zu können, muss der besondere Aufbau des Membran-Twohybrid-Systems betrachtet werden. Die Voraussetzung für einen erfolgreichen Versuch ist die Lokalisation der Cub-UE auf der cytoplasmatischen Seite, damit der LexA-Transkriptionsaktivator nach Rekonstitution des Ubiquitins durch eine Protease von Cub abgespalten werden kann und im Kern das Reporterogen aktiviert (hier für Wachstum in Selektionsmedium ohne Histidin das Reporterogen *His3*).

Die Ergebnisse des membranbasierten Twohybrid-Systems lassen folgende Schlussfolgerungen auf die Membrantopologie von *PRP23* zu (Abb. 28) (Vorausgesetzt wird eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen für *ZmKCS-*

1, siehe hierzu Kpt. 4.1.2.2; *ZmKCS-1* ist in Abb. 28 beispielhaft mit fünf Transmembrandomänen dargestellt):

PRP23 könnte ein cytosolisches Protein ohne Transmembrandomäne sein. Mit dem membranbasierten Twohybrid-System können Interaktionen sowohl zwischen zwei membranständigen Proteinen als auch zwischen einem membranständigen und einem cytoplasmatischen Protein detektiert werden (Kpt. 1.3.1.2). Nimmt man für *ZmKCS-1* eine Membranständigkeit an und setzt eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen voraus, müsste sowohl bei der C-terminalen als auch bei der N-terminalen Expression von NubG an *PRP23* eine Rekonstitution von Ubiquitin erfolgen. Diese Annahme kann gemacht werden, da die Cub-UE nur C-terminal an *ZmKCS-1* exprimiert wurde und für eine Aktivierung des Reportergens in das Cytoplasma hineinreichen muss (s.o.). Im Falle einer N-terminalen Expression von NubG an *PRP23* konnte jedoch keine Rekonstitution von Ubiquitin beobachtet werden.

PRP23 könnte jedoch auch ein membranständiges Protein sein und eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen (eine bzw. drei) besitzen. Im Falle einer C-terminalen Expression von NubG an *PRP23* sollte es jeweils zu einer Rekonstitution des Ubiquitins kommen, da beide Untereinheiten des Ubiquitins auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert sind (Cub an *ZmKCS-1*, NubG an *PRP23*). Bei der N-terminalen Expression von NubG an *PRP23* kann sich Ubiquitin nicht zu einer aktiven Form zusammenlagern, da die Untereinheiten von Ubiquitin nun auf unterschiedlichen Seiten exprimiert werden. Diese Annahmen konnten in der Praxis bestätigt werden, so dass ein Modell von *PRP23* mit einer als auch drei Transmembrandomänen denkbar ist.

Als letzte der durch die verschiedenen Algorithmen ausgegebenen Möglichkeiten (s.o.) könnte *PRP23* zwei Transmembrandomänen aufweisen. Hier gilt dieselbe Voraussetzung, als wenn *PRP23* ein cytoplasmatisches Protein wäre. Es muss also in jeder Kombination (NubG C- als auch N-terminal) zu einer Rekonstitution von Ubiquitin kommen. Im Versuch konnte dieses jedoch nicht für die N-terminale Expression von NubG bestätigt werden.

Diese Ergebnisse sind starke Indizien dafür, dass *PRP23* eine ungerade Anzahl (vermutlich eine oder drei) Transmembrandomänen besitzt und mit dem C-terminalen Ende in die cytoplasmatische Seite hineinragen muss.

4. Diskussion

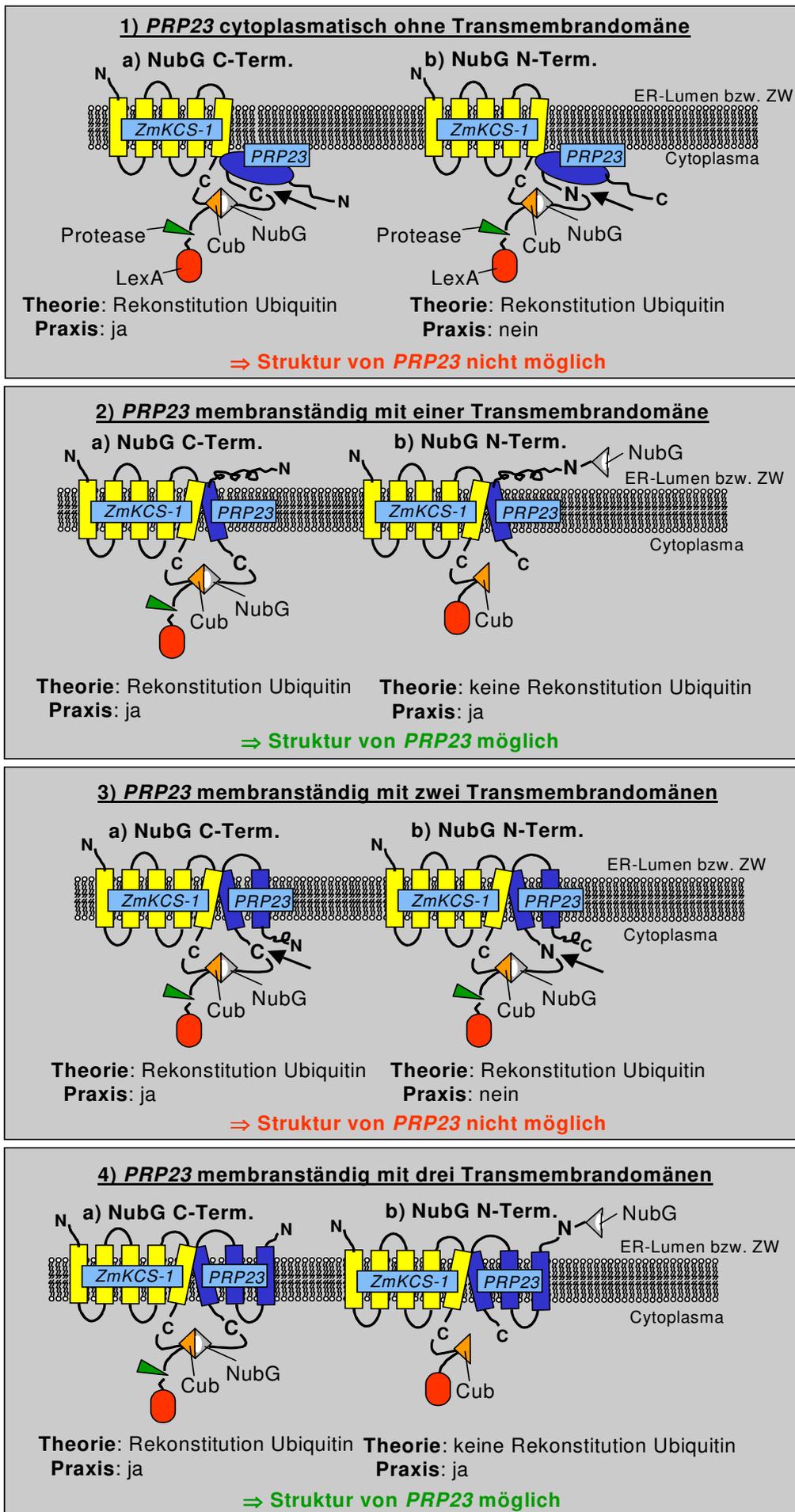


Abb. 28: Mögliche Strukturen von *PRP23* in/an der Membran

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Dot Blot-Assay (Abb. 13) sollte auch eine mögliche Homodimerisierung von *PRP23* überprüft werden. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, bilden die löslichen Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS) Homodimere. Die an der Fettsäureelongation beteiligten Enzyme sind den FAS-Enzymen in ihrer Funktion und daher möglicherweise ihrer Struktur sehr ähnlich (Kpt. 1.2.1). *PRP23* weist natürlich keine strukturellen Ähnlichkeiten zu den Enzymen der Fettsäureelongation auf. Es könnte jedoch an dieser beteiligt sein. Daher sollte auch für dieses Protein eine Homodimerisierung getestet werden.

Diese Struktur konnte jedoch in den Dot Blot-Assays nicht bestätigt werden (Abb. 13). Da *PRP23* möglicherweise membranständig ist, könnte ein solcher Test auch im membranbasierten Twohybrid-System erfolgen (siehe Kpt. 4.4).

Funktion von *PRP23*: Das prolinreiche Protein 23 ist möglicherweise am Lipid-Transport oder am Aufbau des FAE-Komplexes beteiligt

Da *PRP23* in verschiedenen Tests als Bindungspartner von *ZmKCS-1* verifiziert werden konnte, stellt sich die Frage nach der Funktion dieses Proteins in der Fettsäureelongation. Wie im Kpt. 1.2.2.3 bereits erwähnt, gibt es verschiedene Möglichkeiten für die Strukturbildung eines Komplexes. Die FAE-Komplexe könnten im Bereich sogenannter PAM-Stellen sitzen, bei denen die ER-Membran Kontakt zur Plasmamembran hat (Kpt. 1.2.2.2). Insbesondere die Isolierung einer ER-Membranfraktion aus Hefe, welche eine solche PAM-Stelle enthält und eine hohe Kapazität zur Lipidsynthese zeigt, könnte eine funktionelle Nähe der FAE-Komplexe zur Plasmamembran nahelegen (Pichler *et al.*, 2001). Extrazelluläre Lipide könnten so in der Nähe der Cuticula produziert werden, wo deren Einbau erfolgt. Problematisch ist jedoch der Transport von der ER-Membran durch die Plasmamembran und weiter durch die Zellwand. Gerade die Translokation durch die hydrophile Zellwandmatrix ist ohne eine adäquate Transportmöglichkeit für die Wachsvorläufer nahezu unmöglich. Für den Transport durch die Zellwand werden im Moment zwei verschiedene Thesen diskutiert. Einerseits könnten Lipid Transfer Proteine (LTP) die Funktion von Lipid-Carriern übernehmen. Diese LTP konnten schon aus mehreren Pflanzen isoliert und *in vitro* in ihrer Lipid-Transportfähigkeit bestätigt werden (siehe hierzu auch Kpt. 1.2.2). Die Lipide können in einem vom Protein gebildeten hydrophoben Tunnel binden und so durch die Zellwand bis zur Cuticula transportiert werden. Andererseits könnten auch Zellwandbestandteile wie Proteine und Polysaccharide durch die Bildung von hydrophoben Subdomänen eine

Passage der Lipide durch die ZW ermöglichen. Eine solche Funktion wird z.B. für die glycin-reichen Proteine (GRP) diskutiert, welche durch mehrere β -Faltblattlagen ein hydrophobes Umfeld schaffen können (siehe hierzu auch Kpt. 1.2.2).

PRP23 könnte nun analog zu den LTP Lipide binden und durch die Plasmamembran und die Zellwand transportieren. Der Transportmechanismus wäre hierbei vermutlich jedoch ein anderer, da sich *PRP23* von der Struktur der bisher isolierten LTP unterscheidet. Gemeinsames Merkmal aller LTP ist ihre geringe Größe von ~ 9 kD und das Vorhandensein von vier Alpha-Helices. Konserviert sind in der Sequenz dieser Proteine acht Cysteine, welche in einem bestimmten Abstand zueinander liegen müssen. Die dazwischen liegende Sequenz ist eher nebensächlich (Kader, 1997). *PRP23* demgegenüber zeigt jedoch eine Größe von ~ 20 kD und ist daher doppelt so groß. Diese Größe könnte bei der Translokation der Fettsäureacyl-CoAs jedoch eine wichtige Rolle spielen. Sowohl Pichler *et al.* (2001) als auch Samuels und Staehelin (nicht publiziert, aus Kunst und Samuels, 2003) konnten an den PAM-Stellen Hinweise darauf finden, dass sich die ER- und die Plasmamembran nicht nur annähern, sondern sich tatsächlich berühren. Eine direkte Verschmelzung der Membranen fand jedoch nicht statt. Diese räumliche Nähe von ER-, Plasmamembran und Zellwand könnte von *PRP23* genutzt werden, um als Carrier der in den FAE-Komplexen synthetisierten Acyl-CoAs zu dienen. Die Fettsäuren könnten dabei "direkt in die Plasmamembran synthetisiert werden", wo das *PRP23* sitzt. Der Weitertransport durch die Zellwand könnte dann entweder durch *PRP23* erfolgen als auch durch ein LTP, an welches *PRP23* die Fettsäure übergibt. Strukturell zeichnet sich *PRP23* durch eine große hydrophobe Domäne am Aminoterminus und eine stark hydrophile C-terminale Region aus (siehe Abb. 17, 18, S. 61 und 62). *PRP23* könnte daher sowohl in die Plasmamembran als auch in die Zellwand hineinreichen und so den Transport der Acyl-CoAs durch diese Region übernehmen.

Prolinreiche Proteine (PRP) sind in Pflanzen überwiegend als Zellwandproteine bekannt. Man kann sie grob in zwei Klassen unterteilen: Solche, die Komponenten der pflanzlichen Zellwand oberirdischer Organe darstellen (Sheng *et al.*, 1991), als auch Noduline, welche als Antwort auf die Infektion mit N_2 -fixierenden Bakterien in der Knöllchen-Zellwand produziert werden (Govers *et al.*, 1991). Mittlerweile konnten schon PRP aus *Arabidopsis*, Karotte, Mais, Soyabohne und weiteren Pflanzen isoliert werden (Review: Cassab, 1998). Sie übernehmen in diesen Pflanzen Aufgaben bei der Entwicklung wie z.B. des Samens (Coupe *et al.*, 1993), der Knöllchen (van de

Wiel *et al.*, 1990), aber auch des Embryos (Josè-Estanyol und Puigdomènech, 1998). Gleichzeitig wird die Expression von PRP auch durch Verwundung, Eindringen von Pilzen, Austrocknung und Licht beeinflusst (Cassab, 1998). Sie könnten also auch bei dem Wiederaufbau bzw. Verstärkung der Zellwand nach Verwundung oder anderen äußeren Einflüssen eine Rolle spielen. Die PRP werden nach einer Verwundung vermutlich durch eine Peroxidase quervernetzt und so in der Zellwand immobilisiert, wodurch die ZW verstärkt wird. Zum Aufbau der Zellwand gehört in den Zellen der Epidermis, in der PRP u.a. häufig entdeckt werden (Vignols *et al.*, 1999), natürlich auch die Neubildung der Cuticula. In Expressionsstudien von *PRP23* in verschiedenen Geweben von Mais konnte eine starke Expression dieses Proteins in sich entwickelndem Gewebe gezeigt werden (Abb. 20). In diesen Geweben könnte *PRP23* daher eine Rolle beim Aufbau der Cuticula zukommen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass *PRP23* auch nach einer Verwundung bei der Neustrukturierung der Cuticula beteiligt ist. Diese These müsste noch durch Expressionsanalysen von *PRP23* an der verwundeten Pflanze überprüft werden (siehe Ausblick in Kpt. 4.4). Strukturell unterscheidet sich *PRP23* von den meisten bisher isolierten prolinreichen Proteinen, welche eine prolinreiche Region im Bereich des N-Terminus bzw. mittig aufweisen (Josè-Estanyol *et al.*, 1992; Fowler *et al.*, 1999). *PRP23* hingegen zeigt eine solche Region im C-terminalen Bereich (siehe Abb. 17, S. 61). Auch die Sequenzmotive in *PRP23* unterscheiden sich deutlich von denen aus den bisher isolierten PRP. So konnten Josè-Estanyol *et al.* die Motive PPTPRPS und PPYV in der mittigen Region ihres isolierten HyPRP (für hybrides PRP, weil prolinreiche und cysteinreiche Sequenzabschnitte) entdecken, welche mehrmals wiederholt werden. Der C-terminale hydrophobe Teil des Proteins enthält acht Cysteine, welche für die Ausbildung von intramolekularen Verbindungen und damit für die Sekundärstruktur von Bedeutung sein könnten. *PRP23* enthält auch acht Cysteine, die jedoch in der Mitte des Proteins in einem hydrophilen Bereich kurz vor der C-terminalen prolinreichen Region liegen. Ein häufig wiederkehrendes Sequenzmotiv am C-Terminus von *PRP23* ist PXPP, wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann, häufig jedoch ein Serin, Alanin oder Lysin (siehe auch Abb. 18, S. 62). Die Unterschiede zwischen den bisher isolierten prolinreichen Proteinen und *PRP23* sind noch einmal tabellarisch zusammengefasst:

| Merkmale prolinreiche Proteine insges. | | <i>PRP23</i> |
|--|---|--|
| prolinreiche Domäne | mittig oder N-terminal | C-terminal |
| Cysteine | C-terminale, hydrophobe Region mit acht konservierten Cysteinen | Acht Cysteine in hydrophiler Region kurz vor prolinreicher Region |
| Sequenz-motive | PPTPRPS; PPYV; PPVYK | PXPP; X meist S, A oder K |
| Isoliert aus | Mais, Tomate, Soyabohne | Mais, Homologie zu putativem Zellmembran-Protein <i>LEM1</i> aus Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) |
| Funktion | Pathogenabwehr ?, Speicher-protein ?, Zellwandaufbau ? | Lipidtransport ? (<i>PRP23</i>), Organentwicklung ? (<i>LEM1</i>) |

Tab. 8: Merkmale prolinreicher Proteine

Zusammengefasst kann also gesagt werden, dass *PRP23* zwar eine sehr prolinreiche Region besitzt, sich ansonsten jedoch in Struktur und Sequenz von den bisher isolierten prolinreichen Proteinen unterscheidet. Mit Hilfe verschiedener Datenbanken wurde nach homologen Proteinen für *PRP23* gesucht. Hierbei wurde eine Homologie zu dem 102 AS langen putativen Membranprotein *LEM1* aus Gerste (*Hordeum vulgare*) festgestellt (siehe Abb. 18, S. 62). Interessant ist daher das Hydrophobizitätsmuster, welches dem von *PRP23* ähnelt. Da *PRP23* (203 AS) ca. doppelt so lang ist wie *LEM1*, fehlt im Gerstenprotein natürlich die hydrophile und prolinreiche C-terminale Region. *LEM1* wird in den äußeren Organen Lemma und Palea exprimiert, welche die sich entwickelnden Samen umschließen. In den Zellen ist *LEM1* möglicherweise zellmembranständig und hat vermutlich eine Funktion in der Organentwicklung der Ähren (Skadsen *et al.*, 2002). Die hier beobachtete Lokalisation in der Zellmembran könnte daher auch für *PRP23* basierend auf der Sequenzhomologie und eines ähnlichen Hydrophobizitätsmusters gegeben sein. Dieses könnte die für *PRP23* angenommene These eines Acyl-Carriers in der Zellmembran unterstützen. Die mit *PRP23* in dieser Arbeit durchgeführten *GFP*-Studien zeigen leider kein einheitliches Bild, so dass zur Membranständigkeit dieses Proteins keine eindeutige Aussage gemacht werden kann (siehe Kpt. 4.2).

Eine weitere denkbare Alternative für die Aufgabe von *PRP23* könnte die eines Membran-Shuttle Proteins sein. Hierbei könnte *PRP23* die Enzyme der Fettsäureelongation wie *ZmKCS-1* zu ihrem Bestimmungsort in der Membran führen, damit sich hier der Komplex formieren kann.

Eine definitive Aussage zur Funktion von *PRP23* in der Fettsäureelongation lässt sich mit den bisher erhaltenen Daten nicht machen. Hierzu werden weitere Arbeiten nötig sein (siehe auch Kpt. 4.4). Das ein prolinreiches Protein in irgendeiner Weise an der Fettsäureelongation beteiligt ist, wird jedoch unterstützt durch die Isolierung eines weiteren cDNA-Klons mit Hilfe des *Gal4*-Hefe-Twohybrid-Systems durch Pohl (2003). In diesem Screen wurde jedoch nicht *ZmKCS-1* als Köder eingesetzt, sondern ein von Frenzel (2000) isolierter Klon, welcher starke Homologie zu *ZmKCS-1* aufweist und daher *ZmKCS-2* genannt wurde.

ZmKCS-1
 1 MPTGGVFSGSVNLKHVKLGYRYLLDHLITLLLVPMVAATALELARLGP GELLSSLWRSLEL
 1 MPSSGSAFSGSVNLKHVKLGYQYLVNHFLITLLLVPMVAATALELARLGP GELLSSLWRSLEL
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 61 DLVHILCSAFVAVFAGTVYAMSRPRPVYLVYACYKPPGSCRVPFATFMEHTRLISDDDR
 61 DLVHILCSAFLVVFGTVYVMSRPRPVYLVYACYKPPASCRVPFATFMEHTRLISDDDK
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 121 SVRFQTRILERSGLGEDTCLPPANHFIPPNPSMEASRAEAQLVVFSAIDDLRRTGTPKPK
 121 SVRFQTRILERSGLGEDTCLPPANHYIPPNPSMEASRAEAQLVIFSAIDDLVRRTGTPKPK
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 181 DVLDILVVNCSLFSPTPSLSAMVVNRYKLRSNVRSFNLSGMGCSAGLISIDLARDMLQVHP
 181 DIDILVVNCSLFSPTPSLSAMIINKYKLRSNIRSFNLSGMGCSAGLISIDLARDMLQVHP
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 241 NSNALVVSTEIITPNFYRGSRRDMLLPNCLFRMGAAAILLSNRRREAPRAKYRLVHVVRT
 241 NSNALVVSTEIITPNFYQGSRRDMLLPNCLFRMGAAAILLSNRRREARRAKYRLVHVVRT
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 301 HKGADDRAYRCVYQEEDQOGFSGISLSKELMAIAGDALKSNITTIGPLVLPMSQQLLFFF
 301 HKGADDRAYRCVYEEEDQOGFSGISLSKELMAIAGDALKSNITTIGPLVLPMSQQLLFFF
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 361 RLVGRKLLNGGWKPYIPDFKLAFFHFCIHAGGRAVIDELQKNLQLSPRHVEASRMTLHRE
 361 RLVGRKLVNKGWRPYIPDFKLAFFHFCIHAGGRAVIDELQKNLQLSPRHVEASRMTLHRE
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 421 GNTSSSSLWYELAYIEAKGRMRRGDRVWQIGFGSGFKNSAVWKCLRSVNTPTISGPWDDC
 421 GNTSSSSLWYELAYIEAKGRMRRGDRVWQIGFGSGFKNSAVWKCLRSIKTPTINGPWDDC
ZmKCS-2

ZmKCS-1
 481 IHRYPVDVPEVVS
 481 IHRYPVDVPEVVKL
ZmKCS-2

Abb. 29: Homologievergleich zwischen *ZmKCS-1* und *ZmKCS-2*
 (übereinstimmende AS sind mit grün unterlegt)

Der durch *ZmKCS-2* isolierte cDNA-Klon (Klon 149) weist eine starke Sequenzhomologie zu prolinreichen Proteinen in verschiedenen Pflanzen, u.a. in Reis, Tabak und Mais auf. Der Homologievergleich zwischen einem prolinreichen Protein aus Mais (Wulff und Feix, 1998, nicht publiziert) und Klon 149 ist untenstehend dargestellt. Bis auf einen deletierten Bereich von 12 AS ist die Übereinstimmung für die dargestellte Bereich 100% homolog.

Klon 149
 1 VVVGLAKCADCTRKNLKAEEAFKGLEVAIKCKNSKGEYESKAMGKLDGFGAFSIEPLSTDL 60
 33 VVVGLAKCADCTRKNLKAEEAFKGLEVAIKCKNSKGEYESKAMGKLDGFGAFSIEPLSTDL 92
 PRP aus *Zea mays*

Klon 149
 61 HGADCVAQLHSAAGNPCVAQLHSAAGNPCPGQEPSSRIVPQSSKGNFVVVPGKTDYPSKEC 120
 9 HGADCVAQLHS-----AAGNPCPGQEPSSRIVPQSSKGNFVVVPGKTDYPSKEC 140
 PRP aus *Zea mays*

Klon 149
 121 ASATLCGSIKKHLLDHFH 138
 141 ASATLCGSIKKHLLDHFH 158
 PRP aus *Zea mays*

Abb. 30: Homologievergleich zwischen Klon 149 und einem prolinreichen Protein aus *Zea mays*
 Die Proline wurden jeweils rot unterlegt
 (PRP aus *Zea mays* von Wulf und Geix, 1998, nicht publiziert)

Das in dieser Arbeit isolierte *PRP23* weist jedoch keine Sequenzähnlichkeit mit Klon 149 auf. Dennoch scheint ein funktioneller Zusammenhang zwischen prolinreichen Proteinen und den Enzymen der Fettsäureelongation, zumindest aber den Ketoacyl-CoA-Synthasen zu bestehen. Eine endgültige Bestätigung dieser These steht jedoch noch aus (siehe auch Kpt. 4.4).

Im folgenden Bild sind noch einmal die möglichen Funktionen von *PRP23* dargestellt:

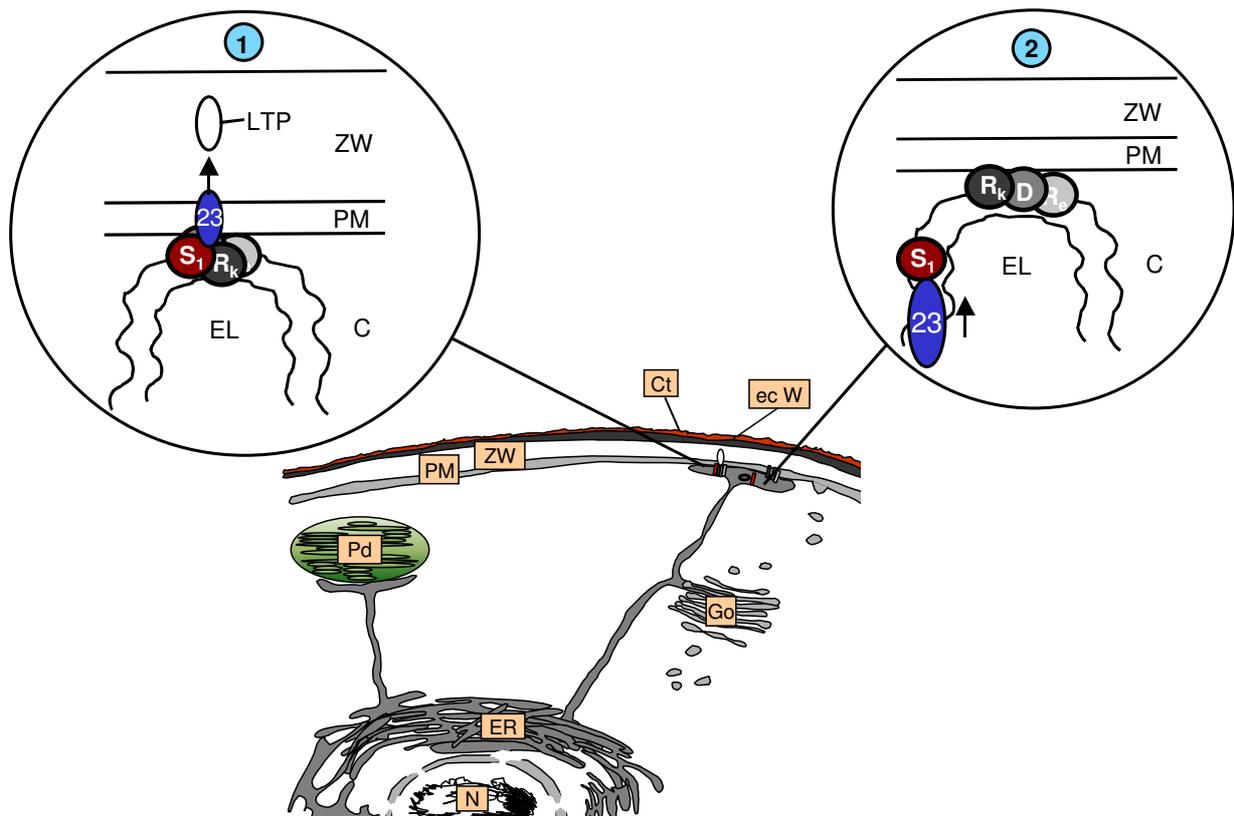


Abb. 31: Schemazeichnung der möglichen Funktionen von *PRP23* im FAE-Komplex

Ausschnitt 1) *PRP23* könnte als Fettsäureacetyl-Carrier an den PAM-Stellen dienen. Es verbindet dabei die Plasmamembran mit der Zellwand. Der FAE-Komplex kann so die Fettsäuren direkt von der ER-Membran in die Plasmamembran abgeben. Der Weitertransport durch die Zellwand könnte durch ein LTP erfolgen.

Ausschnitt 2) *PRP23* könnte als Membran-Shuttleprotein fungieren. Die Enzyme des FAE-Komplexes werden so zu ihrem Zielort (z.B. die PAM) transportiert, wo sich der FAE-Komplex formieren kann. Dabei könnte jedes Enzym des Komplexes ein eigenes Membran-Shuttle besitzen oder ein Shuttle kann mehrere verschiedene Proteine transportieren.

(23 = *PRP23*; C = Cytosol; Ct = Cuticula; D = Hydroxyacetyl-CoA Dehydratase; ec W = epicuticuläre Wachsschicht; EL = ER-Lumen; ER = Endoplasmatisches Retikulum; Go = Golgi-Apparat; LTP = Lipid Transfer Protein; N = Nucleus; Pd = Plastid; PM = Plasmamembran; R_e = Enoyl-CoA-Reduktase; R_k = β -Ketoacyl-CoA-Reduktase; S₁ = β -Ketoacyl-CoA-Synthase; ZW = Zellwand)

Zusammenfassend lassen sich für *PRP23* also folgende Aussagen machen:

- *PRP23* konnte in verschiedenen Twohybrid-Versuchen als Interaktionspartner von *ZmKCS-1* bestätigt werden
- *PRP23* und *ZmKCS-1* zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, starke Expression in sich entwickelndem Gewebe
- *PRP23* scheint membranständig zu sein und besitzt eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen (wahrscheinlich eine oder drei)

- ***PRP23* könnte möglicherweise eine Funktion als Transporter von Lipiden durch die Plasmamembran (und Zellwand ?) haben, besonders an den PAM-Stellen**
- ***PRP23* könnte als Shuttle-Protein z.B. von *ZmKCS-1* dienen, um dieses Protein zum Ort seiner Verwendung (vielleicht die PAM-Stellen) zu transportieren**
- ***PRP23* könnte am Aufbau der Cuticula in sich entwickelndem Gewebe beteiligt sein**

4.1.2.2 *ZmKCS-1*: Die β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 aus Mais scheint eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen zu besitzen und bildet möglicherweise Homodimere

Anzahl der Transmembrandomänen von *ZmKCS-1*

Für die FAE-Komplexe wurde in vielen Organismen eine Membranständigkeit vorhergesagt (siehe Kpt. 1.2.2.2). Auch für einige der bisher bekannten β -Ketoacyl-CoA-Synthasen werden Transmembrandomänen vorhergesagt (Blacklock und Jaworski, 2002). Die in dieser Arbeit untersuchte β -Ketoacyl-CoA-Synthase *ZmKCS-1* wurde mit Hilfe verschiedener Algorithmen analysiert. Basierend auf den Algorithmen

PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>),

SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.al.jp>)

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

werden für *ZmKCS-1* zwei Transmembrandomänen vorhergesagt.

Andere Programme wie

PHD (<http://cubic.bioc.columbia.edu>)

HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/server/hmmtop.cgi>)

TMpred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

geben drei bzw. fünf Transmembrandomänen für dieses Protein an.

Da durch diese Analysen in Bezug auf die Membran-Topologie für *ZmKCS-1* keine einheitliche Aussage getroffen werden kann, sollte das membranbasierte Twohybrid-System neben der Verifizierung von Interaktionsereignissen zur Aufklärung dieser Frage dienen (Abb. 16, S. 60). Es wurden wie auch bei der Aufklärung der Membrantopologie von *PRP23* oNPG-Assays durchgeführt, bei denen die NubG-UE von Ubiquitin am N-terminalen Ende statt am C-terminalen Ende des Proteins exprimiert wurde. Damit es zu einer Rekonstitution des Ubiquitins kommen kann,

müssen beide UE (Cub und NubG) auf der C-terminalen Seite exprimiert werden (siehe auch Abb. 14, S. 57).

Es konnten keine Hefen in Selektionsmedium zum Wachsen gebracht werden, bei denen die NubG-UE N-terminal an *ZmKCS-1* exprimiert wurde. Dieses ist für die Konstrukt-Kombination *ZmKCS-1-Cub/NubG-ZmKCS-1* gegeben. Die Kombinationen jedoch, bei denen NubG an das C-terminale Ende des Proteins gehängt worden ist (*ZmKCS-1-Cub/ZmKCS-1-NubG*), zeigte eine relativ starke Interaktion und die Hefeklone ein normales Wachstum. Es gelten die gleichen Voraussetzungen wie in den Tests zur Membrantopologie von *PRP23* (Cub und NubG müssen für die Aktivierung des Reportergens (*His3* für Wachstum in –His-Selektionsmedium, bzw. *Gal4* für Umsetzung oNPG) C-terminal exprimiert werden).

In Abb. 32 sind die möglichen Strukturen von *ZmKCS-1* in der Membran abgebildet. Alle durchgeführten oNPG-Assays wurden mit einer C-terminal exprimierten Cub-UE an *ZmKCS-1* durchgeführt.

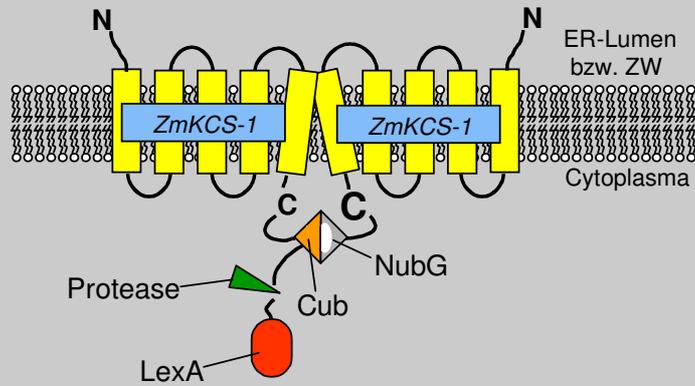
Die verschiedenen Algorithmen schlagen für *ZmKCS-1* teilweise eine ungerade Anzahl (drei oder fünf) von Transmembrandomänen vor. Dieses würde bedeuten, dass Ubiquitin im Falle einer C-terminalen Expression von NubG rekonstituiert werden sollte, da auch die Cub-UE auf der cytoplasmatischen Seite exprimiert wird. Die Expression von NubG am N-terminalen dürfte zu keiner Rekonstitution führen, bzw. kein Wachstum in Selektionsmedium, da die NubG Untereinheit nicht in das Cytoplasma hineinragt. Beide Ergebnisse konnten in der Praxis bestätigt werden.

Würde *ZmKCS-1* jedoch eine gerade Anzahl Transmembrandomänen besitzen, müsste sowohl bei der C-terminalen als auch bei der N-terminalen Expression von NubG eine Rekonstitution von Ubiquitin stattfinden. Dieses konnte in der Praxis jedoch nicht bestätigt werden.

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass *ZmKCS-1* eine ungerade Anzahl (vermutlich drei oder fünf) Transmembrandomänen besitzt und mit dem C-terminalen Ende in die cytoplasmatische Seite hineinragen muss.

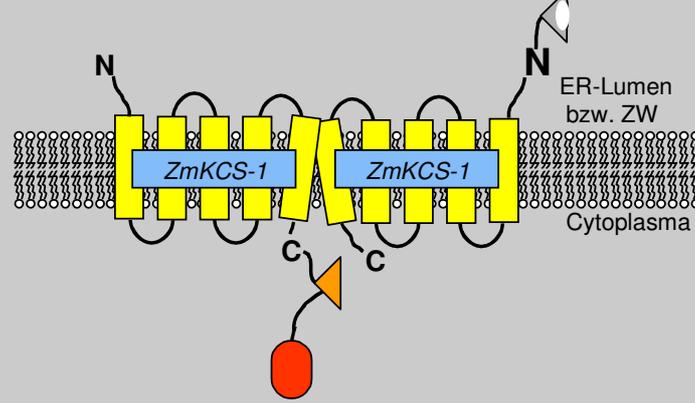
1) Ungerade Anzahl Transmembrandomänen (5 oder 3)

a) NubG am C-Terminus



Theorie: Rekonstitution Ubiquitin
Praxis: ja

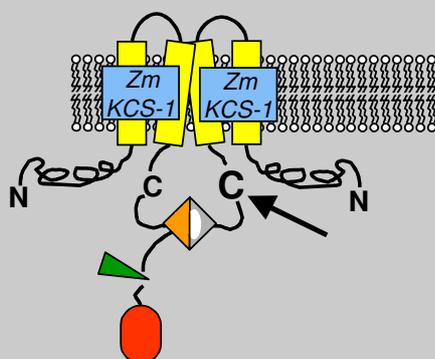
b) NubG am N-Terminus



Theorie: keine Rekonstitution Ubiquitin
Praxis: ja

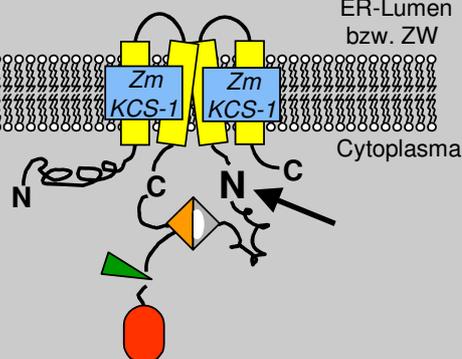
2) Gerade Anzahl Transmembrandomänen (2)

a) NubG C-Term.



Theorie: Rekonstitution Ubiquitin
Praxis: ja

b) NubG N-Term.



Theorie: Rekonstitution Ubiquitin
Praxis: nein

Abb. 32: Struktur und Orientierung von *ZmKCS-1* in der Membran

Homodimerisierung von *ZmKCS-1*

Neben der Anzahl der Transmembrandomänen von *ZmKCS-1* sollte mit Hilfe des membranbasierten Twohybrid-Systems auch eine mögliche Homodimerisierung dieses Proteins getestet werden. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, bilden die löslichen Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS) Homodimere. Die an der Fettsäureelongation beteiligten Enzyme, zu denen auch *ZmKCS-1* zählt, sind den FAS-Enzymen in ihrer Funktion und daher möglicherweise ihrer Struktur sehr ähnlich (Kpt. 1.2.1).

Eine Ausbildung von Homodimeren scheint sich auch für *ZmKCS-1* zu bestätigen (Kpt. 3.1.2.2 und Abb. 16, S. 60). Interessant für den Aufbau des FAE-Komplexes ist natürlich, ob alle Enzyme der Fettsäureelongation Dimere bilden. Mit *PRP23* wurden entsprechende Tests im *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System durchgeführt. Es konnte hier jedoch kein Hinweis auf eine solche Struktur gefunden werden (siehe auch Kpt. 4.1.2.1).

Mit *glossy8* (codiert für eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase und damit für das zweite Enzym der FAE) sind bisher noch keine Tests zur Dimerbildung durchgeführt worden (siehe auch Kpt. 4.4). Eine solche Untersuchung wäre jedoch besonders im membranbasierten Twohybrid-System interessant, da die Proteine sich möglicherweise erst in der Membran zu Homodimeren zusammenschließen.

4.1.2.3 *Glossy8*: Das Produkt des *glossy8*-Gens, eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, scheint nicht mit *ZmKCS-1* zu interagieren

Sowohl in einem durchgeführten Dot Blot-Assay (*Gal4*-Hefe-Twohybrid-System) als auch in einem oNPG-Assay (membranbasiertes Twohybrid-System) konnte keine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *glossy8* (codiert für eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, das zweite Enzym in jedem FAE-Komplex) festgestellt werden (Kpt. 3.1.2.2 B)). Eine solche Interaktion wurde jedoch vermutet, da bisher angenommen wird, dass die Enzyme der Fettsäureelongation als Komplex organisiert sind. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich nun verschiedene Möglichkeiten:

1.) Die Enzyme der Fettsäureelongation sind nicht in einem Komplex organisiert

Dieses hätte zur Folge, dass die Acyl-CoAs von einem zum anderen Enzyme transportiert werden müssten. Dieses könnte im Cytoplasma ein den FABPs (fatty acid binding proteins) ähnliches Protein übernehmen, welche in Säugetieren den

Transport von Fettsäuren von Membran zu Membran oder von der Membran zu den Enzymen übernehmen (Stremmel *et al.*, 2001). Diese Aufgabe wird in Pflanzen vermutlich durch die ACBP (Acyl-CoA bindende Proteine) übernommen, welche schon aus *Arabidopsis* oder *Brassica napus* isoliert werden konnten (Engeseth *et al.*, 1996). Sowohl die Überexpression von *ACBP-1* als auch die Expression eines antisense *ACBP-4* konnte die Lipid-Struktur in *Arabidopsis*-Blättern signifikant beeinflussen (Branen *et al.*, 2001 und 2003). *ACBP-1* konnte außerdem durch Immunogoldlabeling in Vesikeln, Plasmamembran und Zellwand nachgewiesen werden (Chye *et al.*, 1999). Alle diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass die ACBP tatsächlich am Transport der Acyl-CoAs in Pflanzen beteiligt sind.

2.) Die Enzyme der Fettsäureelongation sind zwar in einem Komplex organisiert, das Produkt des *glossy8*-Gens ist aber nicht die richtige β -Ketoacyl-CoA-Reduktase für *ZmKCS-1*

Bisher wird allgemein angenommen, dass jede Ketoacyl-CoA-Synthase nur bestimmte Verlängerungsschritte der FAE katalysiert, während die anderen putativen drei Enzyme eines jeden Komplexes für alle Elongationsschritte identisch sein sollen. Im Gegensatz zu den Ketoacyl-CoA-Synthasen sollen sie also unabhängig von Gewebe und Verlängerungsschritt exprimiert werden. Möglicherweise gibt es jedoch mehrere Ketoacyl-CoA-Reduktasen, welche nur mit bestimmten KCS interagieren und damit auch eine gewisse Spezifität aufweisen.

3.) Um den FAE-Komplex zusammenzuhalten, sind neben den bisher vermuteten vier Enzymen weitere Proteine beteiligt.

Diese könnten dazu dienen, die Struktur des Komplexes aufrechtzuerhalten. Ohne die Expression dieser Proteine könnte sich natürlich kein funktionsfähiger Komplex bilden. *ZmKCS-1* und *glossy8* könnten sich daher nicht in den durchgeführten Twohybrid-Assays zusammenlagern.

Homodimerisierung von *glossy8*

Eine Homodimerisierung von *glossy8* ist in dieser Arbeit nicht getestet worden. In Bezug auf die Struktur eines möglichen membranständigen Komplexes sollte diese Untersuchung jedoch in einem membranständigen Twohybrid-System durchgeführt werden (siehe Kpt. 4.4)

4.2 Der FAE-Komplex ist möglicherweise ER-assoziiert

Um einen Hinweis auf die Lokalisation von *ZmKCS-1* und *PRP23* innerhalb der Zelle zu erhalten, wurden mit diesen beiden Proteinen *GFP*-Studien durchgeführt (Kpt. 3.2, Abb. 22 und 23, S. 67 und 68).

ZmKCS-1 zeigte in diesen Experimenten eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum. Durch die Ergebnisse des membranbasierten Twohybrid-Systems (Abb. 16) und dem durchgeführten Hydrophobizitäts-Plot nach Kyte-Doolittle (Abb. 19) konnte eine Membranständigkeit der β -Ketoacyl-CoA-Synthase vorhergesagt werden. Eine Zuordnung zur ER-Membran oder dem Plasmalemma konnte hieraus jedoch nicht abgeleitet werden. Durch die *GFP*-Studien kann *ZmKCS-1* nun jedoch eindeutig der Membran des ER's zugewiesen werden. Dieses Ergebnis ist konform mit der Annahme, dass der gesamte FAE-Komplex ER-membranständig ist. Demgegenüber steht die Analyse durch das Programm PSORT, welches die Lokalisation der *ZmKCS-1* in der Plasmamembran gegenüber einer Lokalisation in der ER-Membran favorisiert. Die hier durchgeführten *GFP*-Studien ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine Plasmalemma-Lokalisation.

Interessant wäre es zu erfahren, ob die FAE-Komplexe tatsächlich im Bereich der PAM-Stellen sitzen. Dieses kann jedoch durch Fluoreszenz-Mikroskopie nicht visualisiert werden. Hierfür müssten andere Techniken Verwendung finden (siehe Kpt. 4.4) Auch das zweite Enzym des FAE-Komplexes, die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase (von *glossy8* codiert), konnte bereits durch subzelluläre Fraktionierung in der Mikrosomen-Fraktion nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 1997 und 2002). Wie in Kpt. 1.2.2 beschrieben, handelt es sich bei der mikrosomalen Fraktion um einen technischen Begriff, der die Membransysteme verschiedener Kompartimente wie ER- oder Zellmembran umfasst.

Für *PRP23*, den putativen Interaktionspartner von *ZmKCS-1*, konnte kein eindeutiges Ergebnis zur Lokalisierung festgestellt werden. Das Protein konnte sowohl im ER des Kernbereiches als auch in der gesamten Vakuole detektiert werden. Problematisch in Hinblick des Versuchsaufbaus könnte sein, dass für die *GFP*-Studien Frühlingszwiebelzellen verwendet worden sind. Möglicherweise konnten die Mechanismen für die Zuordnung der Proteine zu einzelnen Zellkompartimenten das ER-Signal von *PRP23* nicht richtig deuten. Daher wurde das Protein in die Vakuole geschoben und somit fälschlicherweise als Abbau- oder Speicherprodukt erkannt. Teilweise wurde das Protein jedoch auch im ER in Kernnähe exprimiert.

Auch eine Co-Transformation von *ZmKCS-1* und *PRP23* gab keinen klaren Hinweis zur Lokalisation von *PRP23*. Das Bild C) in Abb. 23 zeigt eher die Situation der Single-Transformation von *PRP23* in der Zelle, also Lokalisation in Vakuole und nukleärem ER. Bild D) derselben Abbildung scheint die ER-Lokalisierung von *ZmKCS-1* wiederzugeben.

Um bessere Ergebnisse zu erzielen, müsste Gewebe aus Mais mit *PRP23* transformiert werden. Hierdurch sollte sich ein klareres Bild zur Lokalisation dieses Proteins ergeben, da die Maiszelle mögliche Signale zur Lokalisierung von *PRP23* besser erkennen sollte.

Außerdem könnte man eine Co-Transformation von *ZmKCS-1* und *PRP23* durchführen, bei der an beide Proteine unterschiedliche Fluoreszenzmarker gehängt werden. So ließe sich eine mögliche Co-Lokalisation direkt erkennen (siehe auch Kpt. 4.4).

4.3 Expressionsstudien von *ZmKCS-1* und *PRP23* in "glossy"-Mutanten von *Zea mays* L.

In den sogenannten "glossy"-Maismutanten (siehe Kpt. 1.2.3 für Begriffserklärung glossy) ist die Menge und/oder die Zusammensetzung der cuticulären Wachse auf der Oberfläche von Keimlings-Blättern beeinflusst (Schnable et al., 1994). Aus diesem Grund sollte eine mögliche Beeinflussung der "glossy"-Gene auf die Expression von *ZmKCS-1* und *PRP23* untersucht werden. Dieses sollte einen Hinweis auf eine in der Stärke veränderte Expression der Proteine im Vergleich zur WT-Pflanze geben.

Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus unreifen männlichen Blüten sowie Maiskeimlingen verschiedener "glossy"-Mutanten und *A188*-WT-Pflanzen isoliert und mit dem ORF von *ZmKCS-1* hybridisiert (Abb. 24 und 25, S. 71 und 72).

Deutlich ist zu erkennen, dass die Expression von *ZmKCS-1* in einigen "glossy"-Pflanzen beeinflusst ist. Besonders in den Maiskeimlingen ist eine verminderte Expression von *ZmKCS-1* in den meisten Mutantepflanzen zu beobachten (Abb. 25). Einzig in *glossy4* und *glossy15 wx,v* ist die Expression gegenüber der WT-Pflanze erhöht.

Diese Erkenntnis führt zu folgenden Schlussfolgerungen:

1.) Da die Wachssynthese durch einen Ausfall der jeweiligen "glossy"-Gene gestört ist, könnten sich Acyl-CoAs einer bestimmten Kettenlänge in der Zelle anlagern, was eine verminderte Expression von *ZmKCS-1* zur Folge haben könnte, da dieses Protein nicht mehr zur Verlängerung der Acyl-CoAs benötigt wird (⇒Produkthemmung).

2.) Das Produkt des betroffenen "glossy"-Gens könnte selbst ein regulatorisches Protein sein (⇒z.B. Transkriptionsfaktor) und direkt auf die Expression von *ZmKCS-1* einwirken.

In unreifen männlichen Blüten verschiedener "glossy"-Mutanten wurde auch das Expressionsmuster von *PRP23* untersucht. Auch hier konnte eine Beeinflussung der Expression dieses Proteins durch die "glossy"-Mutanten festgestellt werden. Interessant ist die Beobachtung, dass eine Expression von *PRP23* in *glossy8 Robertson* komplett fehlt. Dieses Bild zeigt sich außerdem noch in reifen männlichen Blüten aus WT-Pflanzen. Vergleicht man die Expression von *PRP23* und *ZmKCS-1* in unreifen männlichen Blüten miteinander, ergibt sich ein ähnliches Muster. In *glossy8 Robertson* und reifen männlichen Blüten aus WT-Pflanzen konnte jedoch eine Expression von *ZmKCS-1* detektiert werden.

Dieses ähnliche Expressionsmuster von *PRP23* und *ZmKCS-1* könnte auf ein tatsächliches Zusammenwirken dieser beiden Proteine in der Pflanze hinweisen. In *glossy8 Robertson*, wo die Expression von *PRP23* komplett fehlt und *ZmKCS-1* stark exprimiert ist, könnte ein *PRP23* in seiner Funktion homologes Protein dessen Aufgabe übernehmen. Gleiches gilt für reife männliche Blüten aus WT-Pflanzen.

Um noch genauere Aussagen über die Expressionsmuster der einzelnen FAE-Komplex Enzyme machen zu können, sollten auch Analysen mit *glossy8* oder dem *ZmKCS-1* homologen Protein *ZmKCS-2* durchgeführt werden. Um eine Detektion der Expression von mehreren homologen Proteinen gleichzeitig zu verhindern, könnten für diese Analysen jeweils die 3'-untranslatierten Bereiche des jeweiligen Proteins als Sonde eingesetzt werden. Typischerweise unterscheiden sich homologe Proteine, welche einen sehr ähnlichen Leserahmen aufweisen, stark in ihren 3'-untranslatierten Bereichen (siehe auch Kpt. 4.4).

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit standen die Gene des Fettsäurestoffwechsels aus *Zea mays* im Mittelpunkt der Forschung, insbesondere *ZmKCS-1* (Kpt. 1.2.2), *glossy8* (Kpt. 1.2.3) und weitere Komplexpartner (Kpt. 1.3.1). Sie sind Bestandteile der Fettsäureelongation von Acyl-CoAs zu sehr langkettigen Fettsäuren. Diese Enzyme sind möglicherweise als Komplex organisiert. Sowohl die Organisation als auch die Lokalisation des FAE-Komplexes in der Zelle sind bisher jedoch noch unbekannt (siehe auch Kpt. 1.2.2.2). Ebenso ist bisher noch nicht geklärt, ob an einem vollständigen Elongationsschritt (Verlängerung der Fettsäure jeweils um zwei Kohlenstoffeinheiten) die bisher vermuteten vier Enzyme beteiligt sind oder zum Aufbau eines funktionsfähigen Komplexes mehr Proteine involviert sind (Abb. 4, S. 13). Eine Aufklärung dieser für das Verständnis der Lipidsynthese in Mais interessanten Gebiete ist daher von großer Bedeutung.

Die cDNAs der Gene *ZmKCS-1* und des homologen Proteins *ZmKCS-2* konnten aus cDNA-Banken keimender Körner und Sämlingen isoliert werden. Sequenz- und Northernanalysen konnten zeigen, dass es sich bei diesen beiden Genen um β -Ketoacyl-CoA-Synthasen handelt, welche entwicklungspezifisch exprimiert werden (Frenzel, 2000). Die β -Ketoacyl-CoA-Synthasen sollen die Hauptenzyme der FAE-Komplexe sein und sind für dessen Umsatzrate verantwortlich (James *et al.*, 1995; Millar und Kunst, 1997).

Aus diesem Grund sollte die β -Ketoacyl-CoA-Synthase 1 aus *Zea mays* (*ZmKCS-1*) in dieser Arbeit im Mittelpunkt der Betrachtung stehen. Besonders die Regulation und die Lokalisation dieses Proteins in der Zelle wurden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersucht.

Um die Regulation von *ZmKCS-1* auf der Proteinebene näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Twohybrid-Systeme angewendet. Hierdurch sollten mögliche Interaktionspartner für dieses Protein isoliert und in ihrer Interaktionsstärke bestimmt werden.

Mögliche Experimente zur Funktionsanalyse und der Verifizierung von Interaktion, Lokalisation und Expression von *PRP23* im Zusammenhang mit FAE-Komplexenzymen

Durch den Einsatz eines *Gal4*-Hefe-Twohybrid Systems konnte der putative Interaktionspartner *PRP23* (für prolinreiches Protein 23) isoliert (Kpt. 3.1.2.1). und in zusätzlichen Twohybrid-Analysen eine Interaktion zwischen *PRP23* und *ZmKCS-1*

bestätigt werden (Kpt. 3.1.2.2). Die Analyse von *PRP23* zeigte, dass es sich um ein relativ kleines Protein von ~ 20 kDa handelt, welches am N-Terminus eine stark hydrophobe Region und im C-terminalen Bereich einen auffälligen prolinreichen Abschnitt aufweist. Außerdem konnte durch Versuche mit einem membranbasierten Twohybrid-System gezeigt werden, dass *PRP23* vermutlich eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen besitzt (wahrscheinlich eine oder drei) und mit dem C-Terminus in das Cytoplasma ragt (Kpt. 3.1.2.2 B) und 4.1.2.1). *PRP23* zeigt Homologie zu dem putativen membranständigen Protein *LEM1* aus Gerste (*Hordeum vulgare*), welches mit der Organentwicklung der Ähren in Verbindung gebracht wird (Skadsen *et al.*, 2002) (Kpt. 3.1.3). Durch die in dieser Arbeit erfolgten *GFP*-Studien konnte keine eindeutige Aussage über die Lokalisation von *PRP23* in der Zelle gemacht werden (Kpt. 3.2). Es könnte jedoch membranständig sein, worauf seine hydrophobe Domäne im N-terminalen Bereich, seine Homologie zum putativen Membranprotein *LEM1* als auch die Interaktionsereignisse zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* im membranbasierten Twohybrid-System hinweisen. *PRP23* könnte möglicherweise eine Rolle beim Lipidtransport von der ER-Membran zur Plasmamembran bis zur Zellwand wahrnehmen.

Eine Expressionsanalyse von *PRP23* in "glossy"-Mutanten aus Mais konnte zeigen, dass die Expression im Vergleich zur WT-Pflanze beeinflusst ist (Kpt. 3.3).

Um *PRP23* tatsächlich als Interaktionspartner zu bestätigen, könnten weitere Twohybrid-Experimente durchgeführt werden. So könnten in den verschiedenen Twohybrid-Ansätzen (*Gal4*-Twohybrid-System und membranbasiertes Twohybrid-System) *ZmKCS-1* und *PRP23* umklontiert werden. Hierbei könnte *PRP23* im bait-Vektor und *ZmKCS-1* im prey-Vektor eingesetzt werden. Es sollte sich genauso wie in der bisher eingesetzten Kombination (*ZmKCS-1* im bait-Vektor, *PRP23* im prey-Vektor) eine Interaktion zeigen.

Für einen erneuten Screen der cDNA-Bank aus unreifen männlichen Blüten könnte *PRP23* als Köderprotein eingesetzt werden. Würde man dadurch *ZmKCS-1* aus der Bank isolieren, wäre dieses ein weiterer deutlicher Hinweis auf eine tatsächliche Interaktion der beiden Proteine. Möglicherweise könnte man auch weitere Bindungspartner des FAE-Komplexes mit *PRP23* als Köder isolieren.

In dem in dieser Arbeit eingesetzten membranbasierten Twohybrid-System könnte *PRP23* auf seine Fähigkeit hin, Homodimere auszubilden, überprüft werden. In einem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *Gal4*-Hefe-Twohybrid Versuch (mit

Dot Blot-Assay) konnte eine solche Dimerisierung nicht festgestellt werden (Kpt. 3.1.2.2 A)). Da es sich bei *PRP23* aber vermutlich um eine membranständiges Protein handelt, könnte das Membran-Twohybrid System andere Ergebnisse liefern. Sehr interessant im Hinblick auf eine Verifizierung der Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* sind die Untersuchungen von Walter *et al.* (2004), welche die in Säugetierzellen angewendete Methode der "bimolecular fluorescence complementation" (BIFC) (Hu *et al.*, 2002) auf Pflanzen übertragen konnten. Diese modifizierte Methode basiert auf der Rekonstitution zweier nicht fluoreszierender Fragmente des "yellow fluorescent proteins" (*YFP*) zu einem funktionsfähigen Protein durch zwei interagierende Proteine. Walter *et al.* konnten hierdurch u.a. eine Homodimerisierung des bZIP-Transkriptionsfaktors *bZIP63* und des Zinkfinger-Proteins lesion simulating disease 1 (*LSD1*) in *Arabidopsis* zeigen. Mit dieser Methode können also *in vivo* Interaktionen in der Pflanzenzelle nachgewiesen werden, was einen großen Vorteil gegenüber den "herkömmlichen" Methoden zur Bestimmung von Interaktionen in pflanzlichen Zellen bietet, bei denen auf artfremde Organismen wie z.B. Hefen ausgewichen werden muss.

Um eine endgültige Bestätigung der Interaktion von *ZmKCS-1* und *PRP23* zu erzielen, könnte man Co-Immunopräzipitationen durchführen. Diese biochemische Methode bietet eine sichere Aussage über eine Ligandenbindung.

Um über die Lokalisation von *PRP23* in der Zelle eine eindeutigere Aussage zu erhalten, könnten statt Frühlingszwiebelzellen Maiszellen transformiert werden, um eine korrekte Sortierung dieses Proteins in der Zelle zu erhalten. Für die Analyse einer möglichen Co-Lokalisation von *ZmKCS-1* und *PRP23* in der ER-Membran könnte man ein Protein mit *GFP*, das andere mit einem weiteren Fluoreszenzmarker versehen und über transiente Transformation z.B. in Maisgewebe transformieren. Treten beide Proteine im gleichen Zellkompartiment auf, sollte dieses hier sichtbar werden.

Für eine Funktionsanalyse von *PRP23* könnte die Überexpression oder die Repression mittels RNAi-Konstrukten (Fire *et al.*, 1998) von *PRP23* in WT-Maislinien zur Aufklärung dieser Fragestellung beitragen. Diese Analysen sollten auch in transgenen Pflanzen durchgeführt werden, in welchen *ZmKCS-1* überexprimiert bzw. reprimiert wird. Eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine könnte hiermit untersucht werden. Möglicherweise entstehen hier neue Phänotypen, welche bei den mit *ZmKCS-1* transgenen Pflanzen nicht zu beobachten sind.

Da auch postuliert wurde, dass *PRP23* möglicherweise am Aufbau der Zellwand bzw. Cuticula in sich entwickelnden Geweben beteiligt ist (Kpt. 4.1.2.1), sollten Lokalisationsstudien mit diesem Protein speziell in diesen Geweben durchgeführt werden.

Um das in dieser Arbeit festgestellte Expressionsmuster von *PRP23* in "glossy"-Maismutanten zu verifizieren bzw. einer kritischen Prüfung zu unterziehen, könnten die bisher getesteten Gewebe statt eines vollständigen Klons mit dem 3'untranslatierten Bereich dieses Gens hybridisiert werden. Mögliche Kreuzhybridisierungen mit homologen Genen oder alternativ gespleißten mRNAs könnten so verhindert werden. Zusätzlich könnten die gleichen Gewebe auch mit 3'untranslatierten Bereichen von *ZmKCS-1*, *ZmKCS-2* und *glossy8* hybridisiert werden, um ein vergleichendes Expressionsmuster dieser möglichen Interaktionspartner zu erhalten.

Die Expression von *PRP23* sollte auch in "glossy"-Keimlingen untersucht werden, da hiermit ein Vergleich mit dem Expressionsmuster von *ZmKCS-1* möglich wäre (siehe Abb. 25).

Mögliche Experimente zur Verifizierung der Interaktion, der Lokalisation und der Expression von *ZmKCS-1* im Zusammenhang mit FAE-Komplexenzymen

Neben der Verwendung von *ZmKCS-1* als Köderprotein in einem Twohybrid-System für die Isolierung von möglichen Interaktionspartnern aus einer cDNA-Bank wurde in dieser Arbeit versucht, die Regulation (auf Proteinebene) und Lokalisation dieses Proteins weiter zu charakterisieren.

Sowohl in einem *Gal4*-Hefe-Twohybrid-System (mit Dot Blot-Assay) als auch in einem membranbasierten Twohybrid-System konnte keine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *glossy8* (codiert für eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, das zweite Enzym in jedem FAE-Komplex) festgestellt werden (Kpt. 3.1.2.2). Dieses könnte bedeuten, dass die Enzyme der Fettsäureelongation nicht direkt miteinander agieren. Hier könnten weitere Proteine eine Rolle spielen, die bisher noch nicht bekannt sind. Mittels eines membranbasierten Twohybrid-Systems konnte gezeigt werden, dass *ZmKCS-1* eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen besitzt (vermutlich drei oder fünf) und mit dem C-terminalen Ende in das Cytoplasma hineinragt (Kpt. 3.1.2.2 B) und 4.1.2.2). Dieses ist eine wichtige Erkenntnis, da in der Literatur meist zwei Transmembrandomänen für Ketoacyl-CoA-Synthasen diskutiert werden. Daneben konnte durch diesen Versuch auch die Erkenntnis gewonnen werden, dass dieses

Protein vermutlich Homodimere bildet (Kpt. 4.1.2.2). Eine solche Proteinkonstellation ist nicht überraschend, da die in ihrer Funktion und Struktur ähnlichen Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS) ebenfalls Homodimere ausbilden (Kpt. 1.2.1).

ZmKCS-1 konnte durch in dieser Arbeit erfolgte Lokalisations-Experimente eindeutig dem Endoplasmatischen Retikulum zugeordnet werden (Kpt. 3.2). Hier ist es vermutlich in der Membran lokalisiert.

Eine Expressionsanalyse von *ZmKCS-1* in "glossy"-Mutanten von Maispflanzen konnte zeigen, dass die Expression im Vergleich zur WT-Pflanze beeinflusst ist. Besonders in unreifen männlichen Blüten dieser Mutanten scheint es ein ähnliches Expressionsmuster von *ZmKCS-1* und *PRP23* zu geben (Kpt. 3.3).

Um sicherzugehen, dass keine Interaktion zwischen *ZmKCS-1* und *glossy8* besteht, könnte noch einmal ein membranbasierter Twohybrid-Assay durchgeführt werden. Außerdem könnte hier auch eine mögliche Interaktion zwischen *PRP23* und *glossy8* getestet werden. Zeigt sich hier eine Interaktion, könnte dieses Protein *glossy8* und *ZmKCS-1* verbinden. Ebenso könnte in diesem Test eine mögliche Interaktion zwischen (dem zu *ZmKCS-1* homologen Protein) *ZmKCS-2* und *glossy8* getestet werden. Würde es hier zu einer Interaktion kommen, wäre dieses ein Hinweis darauf, dass mehrere β -Ketoacyl-CoA-Reduktasen existieren, welche nur bestimmte Ketoacyl-CoA-Synthasen als Komplexpartner akzeptieren.

Da *ZmKCS-1* durch die GFP-Analysen dieser Arbeit dem ER zugeordnet werden konnte, könnten hier weitere Lokalisationsstudien mit den anderen bisher vermuteten bzw. isolierten Enzymen durchgeführt werden. Dazu gehört das Produkt des *glossy8*-Gens (die β -Ketoacyl-CoA-Reduktase) ebenso wie *ZmKCS-2*. Um eine möglichst korrekte Sortierung dieser Proteine in der Zelle zu erreichen, könnten diese Proteine statt in Zwiebelzellen in Maiszellen exprimiert werden.

Die Zuordnung von *ZmKCS-1* zum ER wirft die Frage auf, ob dieses Protein tatsächlich in der Membran sitzt (wie auch die Ergebnisse des membranbasierten Twohybrid-Systems vermuten lassen), und wenn ja, ob es tatsächlich an den PAM-Stellen (Plasmamembran-assoziierten Membranen) lokalisiert ist, wie in dieser Arbeit postuliert wurde. Zur Klärung dieser Fragestellung könnten Immunogoldlabeling-Versuche dienen.

Um das in dieser Arbeit festgestellte Expressionsmuster von *ZmKCS-1* in "glossy"-Mutanten aus Mais zu verifizieren bzw. einer kritischen Prüfung zu unterziehen, könnten die bisher getesteten Gewebe statt des ORFs mit dem 3'untranslatierten

Bereich dieses Gens hybridisiert werden. Mögliche Kreuzhybridisierungen mit homologen Genen oder alternativ gespleißten mRNAs könnten so verhindert werden. Zusätzlich könnten die gleichen Gewebe auch mit 3`untranslatierten Bereichen von *ZmKCS-2*, *PRP23* und *glossy8* hybridisiert werden, um ein vergleichendes Expressionsmuster dieser möglichen Interaktionspartner zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Die Oberfläche von Pflanzen ist mit einer Cuticula bedeckt, welche aus in einem Cutin-Polymer eingelagerten amorphen intracuticulären Wachsen gebildet wird. Der Cuticula aufgelagert ist eine epicuticuläre Wachsschicht, welche zusammen mit der Cuticula eine wichtige Schutzbarriere vor übermäßiger Transpiration und UV-Strahlung bildet sowie eine Rolle bei der Pathogenabwehr und der Signalerkennung einnimmt. In Maispflanzen sind Mutanten bekannt, die nach ihrem gemeinsamen Phänotyp als "glossy" bezeichnet werden, da Wasser durch eine veränderte bzw. fehlende Wachsschicht auf ihnen haftet und daher ein glänzendes Aussehen zeigen. Die "glossy"-Mutationen unterscheiden sich jedoch in ihren molekularen Mechanismen, von denen einige molekular charakterisiert werden konnten.

Cuticuläre Wachse bestehen hauptsächlich aus langkettigen aliphatischen Komponenten, die aus sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs = very long chain fatty acids) und ihren Derivaten synthetisiert werden. In den Plastiden werden zunächst in der Fettsäuresynthese ("fatty acid synthase" = FAS) C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren hergestellt. Die Elongation zu sehr langkettigen Fettsäuren (C₂₄-C₃₄) erfolgt im Cytoplasma vermutlich an der ER- oder der Zellmembran durch Enzyme der Fettsäureelongation ("fatty acid elongation" = FAE). Eine genaue Lokalisation der FAE in der Zelle ist jedoch noch nicht geklärt.

Jeder Verlängerungsschritt der Acyl-CoAs umfasst sowohl bei der Fettsäuresynthese als auch der Fettsäureelongation vier Enzymreaktionen (Kondensation, Reduktion, Dehydratation und erneute Reduktion), welche bei der FAE durch eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase, eine β -Ketoacyl-CoA-Reduktase, eine Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase und eine Enoyl-CoA-Reduktase katalysiert werden. Für die Enzyme der FAE wird im Gegensatz zu den Enzymen der FAS, welche separat als lösliche homodimere Proteine im Stroma der Plastiden vorkommen, eine membranständige Komplexstruktur vermutet. Der strukturelle Aufbau dieser Enzyme ist jedoch fast noch gänzlich unbekannt.

In verschiedenen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Simmondsia chinensis* konnte man Gene identifizieren, die für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) codieren. Dieses Enzym gilt als das Hauptenzym der FAE und ist für die Substratspezifität sowie Umsatzrate verantwortlich. Es wird gewebe- sowie samenspezifisch exprimiert. Im Gegensatz zu den β -Ketoacyl-CoA-Synthasen,

welche jede für sich nur bestimmte Verlängerungsschritte katalysieren, sind die drei anderen Enzyme vermutlich für jeden Elongationsschritt identisch. Die KCS-Gene stehen daher meist im Mittelpunkt der Forschung und werden auch in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig bearbeitet.

In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, mehr über die Regulation des FAE-Komplexes aus *Zea mays* herauszufinden. Um einen Beitrag zur Aufklärung der Regulation des FAE-Komplexes auf der Protein-Ebene zu leisten, wurden Twohybrid-Assays mit der β -Ketoacyl-CoA-Synthase-1 aus *Zea mays* (*ZmKCS-1*) durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner für das Protein zu isolieren bzw. schon bekannte Proteine der FAE als Bindungspartner von *ZmKCS-1* zu testen. Hierzu gehört *glossy8*, dessen Genprodukt als β -Ketoacyl-CoA-Reduktase identifiziert werden konnte und damit einen potentiellen Interaktionspartner von *ZmKCS-1* darstellt. In den Twohybrid-Versuchen sollte außerdem eine mögliche Membranständigkeit von *ZmKCS-1* und putativen Komplexpartnern untersucht werden.

Eine genauere Analyse zur Lokalisation von *ZmKCS-1* und möglichen Komplexpartnern sollte durch *GFP*-Studien erfolgen.

In einem weiteren Abschnitt sollten Northernanalysen in Geweben von "glossy"-Mutanten und WT-Maispflanzen durchgeführt werden, um mehr über die Regulation der FAE-Enzyme auf der RNA-Ebene herauszufinden. Hier sollte insbesondere der Fragestellung nachgegangen werden, ob die jeweiligen "glossy"-Mutationen regulativ auf die Expression der untersuchten Proteine einwirken können.

Für die Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen wurde mit Hilfe eines *Gal4*-Hefe-Twohybrid-Systems und *ZmKCS-1* als Köderprotein eine cDNA-Bank aus unreifen männlichen Blüten nach potentiellen Interaktionspartnern durchmustert. Durch einen solchen Screen konnte der putative Bindungspartner *PRP23* (PRP = prolinreiches Protein) isoliert werden. Durch weitere Twohybrid-Versuche konnte dieser als Bindungspartner von *ZmKCS-1* bestätigt werden. Die Analyse von *PRP23* zeigte, dass es sich um ein relativ kleines Protein von ~ 20 kDa handelt, welches am N-Terminus eine stark hydrophobe Region und im C-terminalen Bereich einen auffälligen prolinreichen Abschnitt aufweist. Außerdem konnte durch Versuche mit einem membranbasierten Twohybrid-System gezeigt werden, dass *PRP23* vermutlich eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen besitzt (wahrscheinlich eine oder drei) und mit dem C-Terminus in das Cytoplasma ragt. *PRP23* zeigt Homologie zu dem putativen membranständigen Protein *LEM1* aus

Gerste (*Hordeum vulgare*), welches mit der Organentwicklung der Ähren in Verbindung gebracht wird. *PRP23* könnte möglicherweise eine Rolle beim Lipidtransport von der ER-Membran zur Plasmamembran bis zur Zellwand oder beim Aufbau des FAE-Komplexes wahrnehmen.

Mit Hilfe des membranbasierten Twohybrid-Systems konnte auch für *ZmKCS-1* eine ungerade Anzahl von Transmembrandomänen nachgewiesen werden (vermutlich drei oder fünf), wobei das Protein mit dem C-terminalen Ende in das Cytoplasma hineinragt. Außerdem konnte in diesen Tests eine Homodimerisierung von *ZmKCS-1* festgestellt werden. Eine solche Proteinkonstellation ist interessant, da die in ihrer Funktion und Struktur ähnlichen Enzyme der Fettsäuresynthese (FAS) ebenfalls Homodimere ausbilden.

Glossy8 konnte in den Twohybrid-Assays nicht als Interaktionspartner von *ZmKCS-1* bestätigt werden. Möglicherweise sind mehr Proteine für das strukturelle Zusammenwirken dieser Enzyme nötig.

In dieser Arbeit durchgeführte *GFP*-Analysen mit *PRP23* konnten keine eindeutige Aussage über die Lokalisation dieses Proteins erbringen. Es könnte jedoch membranständig sein, worauf seine hydrophobe Domäne im N-terminalen Bereich, seine Homologie zum putativen Membranprotein *LEM1* als auch die Interaktionsereignisse zwischen *ZmKCS-1* und *PRP23* im membranbasierten Twohybrid-System hinweisen.

ZmKCS-1 konnte durch Lokalisations-Experimente eindeutig dem Endoplasmatischen Retikulum zugeordnet werden, wo es vermutlich in der Membran lokalisiert ist.

In Northernexperimenten an "glossy"-Mutanten von *Zea mays* L. wurde festgestellt, dass sowohl *ZmKCS-1* als auch *PRP23* in ihrer Expression beeinflusst werden. Ein basierend auf einer möglichen Interaktion zwischen *PRP23* und *ZmKCS-1* postuliertes ähnliches Expressionsmuster dieser beiden Proteine konnte ebenfalls in Northernexperimenten bestätigt werden.

Um die Regulation, Lokalisation und Funktion von *ZmKCS-1* und *PRP23* weiter zu charakterisieren, sollten die hier begonnenen Experimente fortgeführt werden.

6. Literatur

Agrawal, V.P., Lessire, R., Stumpf, P.K. (1984) Biosynthesis of very long chain fatty acids in microsomes from epidermal cells of *Allium porrum* L. Arch Biochem Biophys **230**:580-589

Agrawal, V.P., Stumpf, P.K. (1985) Characterization and solubilization of an acyl chain elongation system in microsomes of leek epidermal cells. Arch Biochem Biophys **240**: 154-165

Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldschlag, P., Gokhman, I., Zamir, A. (2002) Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant Phys. **129**: 1320-1329

Bagnat, M., Simons, K. (2002) Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biol. Chem. **383** (10): 1475-1480

Bar-Peled, M., Bassham, D.C., Raikhel, N.V. (1996) Transport of proteins in eukaryotic cells: more questions ahead. Plant Mol. Biol. **32**: 223-249

Bernhard, W.R., Thoma, S., Botella, J., Somerville, C.R. (1991) Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. Plant physiol. **95**: 164-170

Bertho P., Moreau, P., Morre, D.J., Cassagne, C. (1991) Monensin blocks the transfer of very long chain fatty acid containing lipids to the plasma membrane of leek seedlings. Evidence for lipid sorting based on fatty acyl chain length. Biochim Biophys Acta **1070**: 127- 134

Bianchi, G., Avato, P., Salamini, F. (1979) Glossy mutants of maize, IX. Chemistry of *glossy4*, *glossy8*, *glossy15* and *glossy18* surface waxes. Heredity **42**: 391-395

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**(6):1513-1523

Blacklock, B.J., Jaworski, J.G. (2002) Studies into factors contributing to substrate specificity of membrane-bound 3-ketoacyl-CoA synthases. Eur. J. Biochem. **269**: 4789-4798

Branen, J.K., Chiou, T.J., Engeseth, N.J. (2001) Overexpression of acyl carrier protein-1 alters fatty acid composition of leaf tissue in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **127** (1) 222-229

Branen, J.K., Shintani, D.K., Engeseth, N.J. (2003) Expression of antisense acyl carrier protein-4 reduces lipid content in *Arabidopsis* leaf tissue. Plant Physiol. **132**: 748-756

Breitbart, R.E., Andreadis, A., Nadal-Ginard, B. (1987) Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Annu. Rev. Biochem. **56**: 467-495

- Brown, D.A., London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-136
- Brylka, H. (2002) Molekulare Charakterisierung eines kornspezifisch exprimierten Gens aus *Zea mays* L. Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Cassab, G.I. (1998) Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 281-309
- Cassagne, C., Lessire, R. (1978) Biosynthesis of saturated very long chain fatty acids by purified membrane fractions from leek epidermal cells. *Arch Biochem Biophys* **191**: 146-152
- Castro, M.S., Gerhardt, I.R., Orru, S., Pucci, P., Bloch, C. Jr. (2003) Purification and characterization of a small (7,3 kD) putative lipid transfer protein from maize seeds. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **794** (1) 109-114
- Caughey, I., Kekwick, R.G.O. (1982) The characteristics of some components of the fatty-acid synthetase system in the plastids from the mesocarp of avocado (*Persea americana*) fruit. *Eur. J. Biochem.* **123**: 553-561
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805
- Chye, M.L., Huang, B.Q., Zee, S.Y. (1999) Isolation of a gene encoding *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA binding protein and immunolocalization of its gene product. *Plant J.* **18** (2) 205-214
- Cohen-Gonsaud, M., Ducasse, S., Hoh, F., Zerbib, D., Labesse, G., Quemard, A. (2002) Crystal structure of MabA from *Mycobacterium tuberculosis*, a reductase involved in long-chain fatty acid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **320**: 249-261
- Condit, C.M., Meager, R.B. (1986) A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* **323**: 178-181
- Coupe, S.A., Taylor, J.E., Issac, P.G., Roberts, J.A. (1993) Identification and characterization of a proline-rich mRNA that accumulates during pod development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Mol. Biol.* **23**: 1223-1232
- Dellaporta, G.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., Elledge, S. J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Devel.* **7**: 555-569
- Eckardt, N.A. (2002) Alternative splicing and the control of flowering time. *The Plant Cell* **14**: 743-747

- Engeseth, N.J., Pacovsky, R.S., Newman, T., Ohlrogge, J.B. (1996) Characterization of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. Arch. Biochem. Biophys. **331** (1): 55-62
- Evans, M.M.S., Passas, H.J., Poethig, R.S. (1994) Heterochronic effects of *glossy15* mutations on epidermal cell identity in maize. Development **120**: 1971-1981
- Fields, S. (1993) The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. METHODS: A Companion to Meth. Enzymol. **5**: 116–124
- Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature **340**: 245-246
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature **391**(6669): 806-811
- Fowler, T.J., Bernhardt, C., Tierney, M.L. (1999) Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. Plant Phys. **121**: 1081-1091
- Frenzel, K. (2000) Charakterisierung von *ZmKCS-1* und *ZmKCS-2*: Zwei mögliche β -Ketoacyl-CoA-Synthasegene aus dem Wachsstoffwechsel von Mais (*Zea mays* L.). Dissertation, Universität Hamburg
- Gaigg, B., Neergaard, T.B.F., Schneiter, R., Krogh Hansen, J., Færgeman, N.J., Jensen, N.A., Andersen, J.R., Friis, J., Sandhoff, R., Daa Schrøder, H., Knudsen, J. (2001) Depletion of acyl-CoA binding protein affects Sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. of the Cell **12**: 1147-1160
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J., Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins. J.Mol. Biol. **120**:97-120
- Gómez, J., Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomènech, P., Pagès, M. (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. Nature **334**: 262-264
- Govers, F., Harmsen, H., Heidstra, R., Michielsen, P., Prins, M., van Kammen, A., Bisseling, T. (1991) Characterization of the pea *ENOD12B* gene and expression analysis of the two ENOD12 genes in nodule, stem and flower. Mol. Gen. Genet. **228**: 160-166
- Guilford, W.J. *et al.* (1988) High resolution solid state ^{13}C NMR spectroscopy of sporopollenis from different plant taxa. Plant Physiol. **86**: 134-136
- Han, G., Gable, K., Kohlwein, S.D., Beaudoin, F., Napier, J.A., Dunn, T.M. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* *YBR159w* gene encodes the 3-Ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. Journal of Biological Chemistry **277**: 35440-35449

- Hansen, J.D., Pyee, J., Yiji, X., Tsui-Jung, W., Robertson, D.S., Kolattukudy, P.E., Nikolau, B.J., Schnable, P.S. (1997) The *glossy1* locus of maize and an epidermis-specific cDNA from *Kleinia odora* define a class of receptor-like proteins required for the normal accumulation of cuticular waxes. *Plant Physiol.* **113**: 1091-1100
- Harwood, J.L. (1988) Fatty acid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 101-138
- Herrmann, M.M. (2004) Identifizierung und funktionelle Charakterisierung einer pollenspezifisch exprimierten Pti1-homologen Kinase aus *Zea mays* (L.). Dissertation, Universität Hamburg
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 761-807
- Hu, C.-D., Kerppola, T.K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolour fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* **21**: 539-545
- Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., Lindqvist, Y. (1998) Crystal structure of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *The EMBO journal* **17**: 1183-1191
- James, D.W., Lim, E., Keller, J., Plooy, I., Ralston, E., Dooner, H.K. (1995) Direct tagging of the *Arabidopsis* Fatty Acid Elongation 1 (FAE1) gene with the maize Transposon *Activator*. *Plant Cell* **7**: 309-319
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907
- Jentsch, S. (1992) Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell Biol.* **2**: 98-103
- Johnsson, N., Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10340-10344
- Josè-Estanyol, M., Puigdomènech, P. (1998) Rapid changes induced in developmental programmes of the maize embryo detected by analysis of the expression of genes encoding proline-rich proteins. *FEBS letters* **422**: 400-402
- Josè-Estanyol, M., Ruiz-Avila, L., Puigdomènech, P. (1992) A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. *Plant Cell* **4**: 413-423
- Kader, J.-C. (1997) Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science* **2** (2): 66-70
- Kaether, C., Gerdes, H.H. (1995) Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescence protein. *FEBS Lett.* **369**: 267-271

- Kajikawa, M., Yamaoka, S., Yamato, K.T., Kanamaru, H., Sakuradani, E., Shimizu, S., Fukuzawa, H., Ohyama, K. (2003) Functional analysis of a β -ketoacyl-CoA synthase gene, *MpFAE2*, by gene silencing in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (3): 605-612
- Kajikawa, M., Yamato, K.T., Kanamaru, H., Sakuradani, E., Shimizu, S., Fukuzawa, Sakai, Y., H., Ohyama, K. (2003) *MpFAE3*, a β -ketoacyl-CoA synthase gene in the liverwort *Marchantia polymorpha* L., is preferentially involved in elongation of palmitic acid to stearic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67** (8): 1667-1674
- Kermode, A.R. (1996) Mechanisms of intracellular protein transport and targeting in plant cells. *Critical reviews in Plant Sciences* **15** (4) 285-423
- Kluth, J. (2004) Molekulare Untersuchungen zum Einfluss der *ZmPti1*-Kinase auf die Pollenentwicklung bei *Zea mays* (L.). Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Kohlwein, S.D., Eder, S., Oh, C.-S., Martin, C.E., Gable, K. Bacikova, D., Dunn, T. (2001) Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the Nuclear-Vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol and Cell Biol* **21**: 109-125
- Koo, A.J.K., Ohlrogge, J.B., Pollard, M. (2003) On the export of fatty acids from the chloroplast. *Journal of Biol. Chem.* **279** (16): 16101-16110
- Kunst, L., Samuels, A.L. (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. in Lipid Research* **42**: 51-80
- Kutay, U., Hartmann, E., Rapoport, D.A. (1993) A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Biochem. Sci.* **3**: 72-75
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982) A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132
- Lessire, R., Bessoule, J.J., Cassagne, C. (1985a) Solubilization of C18-CoA and C20-CoA elongases from *Allium porrum* L. epidermal cell microsomes. *FEBS Lett* **187**: 314-320
- Lessire, R., Bessoule, J.J., Cassagne, C. (1989) Involvement of a β -ketoacyl-CoA intermediate in acyl-CoA elongation by an acyl-CoA elongase purified from leek epidermal cells. *Biochem Biophys Acta* **1006**: 35-40
- Lessire, R., Juquelin, H., Moreau, P., Cassagne, C. (1985b) Elongation of acyl-CoA by microsomes from etiolated leek seedlings. *Phytochemistry* **24**: 1187-1192
- Lessire, R., Juquelin, H., Moreau, P., Cassagne, C. (1985c) Nature of the reaction product of [1-¹⁴C] stearoyl-CoA elongation by etiolated leek seedlings microsomes. *Arch Biochem Biophys* **239**: 260-269
- Ma, J., Ptashne, M. (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**: 113-119

- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Cameron, R.K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**: 399-403
- Matchmaker Gal4 Twohybrid-System User Manual, Clontech (Aufl. Juni 1999)
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., Kunst, L. (1999) *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* **11**: 825-838
- Millar, A.A., Kunst, L. (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* **12**: 121-131
- Molina, A., Segura, A., Garcia-Olmedo, F. (1993) Lipid transfer proteins (nsLTP`s) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* **316** (2): 119-122
- Moose, S.P., Sisco, P.H. (1994) *Glossy15* controls the epidermal juvenile-to-adult phase transition in maize. *The Plant Cell* **6**: 1343-1355
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995) Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957-970
- Ow, D.W., Wood, K.V., Deluca, M., de Wet, J.R., Helinski, D.R., Howell, S.H. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**: 856-859
- Palade, G.E. (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **187**: 347-358
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S.D., Zellnig, G., Perktold, A., Daum, G. (2001) A subfraction of the yeast endoplasmatic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2351-2361
- Plattner, H., Hentschel, J. (1997) Taschenlehrbuch Zellbiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 262
- Pohl, J., Ring, A., Eehalt, R., Schulze-Bergkamen, H., Schad, A., Verkade, P., Stremmel, W. (2004) Long-chain fatty acid uptake into Adipocytes depends on lipid raft functions. *Biochemistry* **43**: 4179-4187
- Pohl, S. (2003) Untersuchung potentieller Proteininteraktionen der β -Ketoacyl-CoA-Synthasen *ZmKCS-1* und *ZmKCS-2* aus *Zea mays* L. mit dem „Yeast-Two-Hybrid“-System. Diplomarbeit, Universität Hamburg
- Post-Beittenmiller, D. (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annu Rev Plant Physiol and Mol Biol* **47**: 405-430

- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., Davis, R.W. (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* **7**: 974-985
- Pyee, J. Yu, H., Kolattukudy, P.E. (1994) Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **11** (2): 460-468
- Rossak, M., Smith, M., Kunst, L. (2001) Expression of the *FAE1* gene and *FAE1* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **46**: 717-725
- Rössler, H., Rieck, C., DeLong, T., Hoja, U. (2003) Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very long chain fatty acid synthesis. *Mol. Gen. Genomics* **269**: 290-298
- 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., Ptashne, M. (1991) Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**:250-251
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467
- Schnable, P.S., Stinard, P.S., Wen, T.H., Heinen, S., Weber, D., Schneerman, M., Zhang, L., Hansen, J.D. (1994) The genetics of cuticular wax biosynthesis. *Maydica* **39**: 279-287
- Sheldon, P.S., Keckwick, R.G., Smith, C.G., Sidebottom, C., Slabas, A.R. (1992) 3-Oxoacyl-ACP-reductase from oilseed rape (*Brassica napus*). *Biochem. Biophys. Acta* **1120** (2): 151-159
- Sheng, J., D`Ovidio, R., Mehdy, M.C. (1991) Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *Plant J.* **1**: 345-354
- Shin, D.H., Lee, J.Y., Hwang, K.Y., Kim, K.K., Suh, S.W. (1995) High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* **3** (2) 189-199
- Skadsen, R.W., Sathish, P., Federico, M.L., Abebe, T., Fu, J., Kaeppler, H.F. (2002) Cloning of the promoter for a novel barley gene, *Lem1*, and its organ-specific promotion of *Gfp* expression in lemma and palea. *Plant Mol. Biol.* **49**: 545-555
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., van Kammen, A., de Vries, S.C. (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**: 907-921

- Stremmel, W., Pohl, L., Ring, A., Herrmann, T. (2001) A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* **36** (9): 981-989
- Tacke, E., Korfhage, C., Michel, D., Maddaloni, M., Salamini, F., Döring, H.-P. (1995) Transposon tagging of the *glossy2* locus with the transposable element *En/Spm*. *Plant Journal* **8**: 907-917
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J.G. (1999) *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* **17**: 119-130
- van de Wiel, C., Scheres, B., Franssen, H., van Lierop, M.-J., van Lammeren, A. (1990) The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* **9**: 1-7
- Velasco, R., Korfhage, C., Salamini, A., Tacke, E., Schmitz, J., Motto, M., Salamini, F., Döring, H. P. (2002) Expression of the *glossy2* gene of maize during plant development. *Maydica* **47** (2): 71-81
- Vignols, F., Josè-Estanyol, M., Caparrós-Ruiz, D., Rigau, J., Puigdomènech, P. (1999) Involvement of a maize proline-rich protein in secondary cell wall formation as deduced from its specific mRNA localization. *Plant Mol. Biol.* **39**: 945-952
- Vignols, F., Lund, G., Pammi, S., Tremousaygue, D., Grellet, F., Kader, J.C., Puigdomènech, P., Delseny, M. (1994) Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein. *Gene* **142** (2): 265-270
- Vitale, A., Ceriotti, A., Denecke, J. (1993) The role of endoplasmatic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J. Exp. Bot.* **44**: 1417-1444
- von Heijne, G. (1994) Membrane protein assembly:rules of the game. *Bio Essays* **17**: 25-30
- von Wettstein-Knowles, P.M. (1993) Waxes, Cutin and Suberin. In: Moore, T.S. (ed): *Lipid metabolism in plants*, 127-166. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudler, J. (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**: 428-438
- Walter, P., Johnson, A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmatic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 87-119
- Werneke, J.M., Chatfield, J.M., Ogren, W.L. (1989) Alternative mRNA splicing generates the two Ribulosebisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase polypeptides in Spinach and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **1**: 815-825

Xu, X., Dietrich, C.R., Delledonne, M., Xia, Y., Wen, T., Robertson, D.S., Nikolau, B.J., Schnable, P.S. (1997) Sequence analysis of the cloned *glossy8* gene of maize suggests that it may code for a β -Ketoacyl-CoA-Reductase required for the biosynthesis of cuticular waxes. *Plant Physiol.* **115**: 501-510

Xu, X., Dietrich, C.R., Lessire, R., Nikolau, B.J., Schnable, P.S. (2002) The endoplasmic reticulum-associated maize Gl8 protein is a component of the acyl-Coenzyme A elongase involved in the production of cuticular waxes. *Plant Physiol.* **128**: 924-934

Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., Saedler, H. (1999) Characterization of the *Fiddlehead* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* **11** (11): 2187-2201

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Wienand bedanken, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, unter seiner Anleitung an einem wirklich "fetten" Thema arbeiten zu dürfen.

Mein Dank gilt auch meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Horst Lörz, der von mir ein wenig überrumpelt wurde und dennoch zur Verfügung stand.

Danken möchte ich vor allem auch Dr. Karsten Frenzel, der mir in den drei Jahren mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Und obwohl wir einige Startschwierigkeiten hatten, haben wir uns dennoch gut aufeinander eingespielt. Danke auch noch einmal für das fleißige Korrekturlesen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. René Lorbiecke bedanken, den ich immer mit meinen Fragen löchern konnte und trotz Stress jedesmal bereitwillig Auskunft gab. Ohne seine Hilfe würde ich wohl heute noch versuchen, die Tabulatoren richtig einzustellen.

Ich danke Herrn Pr. Dr. Hartmut Quader für die Hilfe bei der Deutung der *GFP*-Bilder.

Mein Dank richtet sich auch an die gesamte Arbeitsgruppe AMPI, in der eigentlich immer ein gutes Klima herrscht, so dass man auch gerne zur Arbeit geht. An dieser Stelle sei auch noch einmal unsere Kochgruppe erwähnt, die uns vor einem schlimmen Kantinenessen bewahren konnte.

Besonders danken möchte ich Jantje, die mich immer von meinen Alltagsproblemen (und auch von meiner Arbeit 😊) abgelenkt hat und die zusammen mit Katja (Danke) einen wunderbaren „Hello Kitty“-Kuchen für mich gebacken hat.

Ich danke natürlich auch meiner Familie, die mich immer unterstützt hat. Grüße auch an die kleine Melina-Valeria.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Freundin Bettina, ohne die vieles, was ich realisieren konnte, nicht möglich gewesen wäre. Auch wenn ich umzukippen drohte, hat sie es geschafft, meine Füße wieder auf den Boden zu stellen. Ich danke dir von ganzem Herzen.