

**Charakterisierung eines neuartigen
Zuckertransporters aus *Arabidopsis thaliana***

**Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)**

vorgelegt von

**Diplom Biologin
Claudia Stamme**

Kaiserslautern 2003

Berichterstatter:

**Vorsitzender: Prof. Dr. Burkhard Büdel
Betreuer: Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus
Koreferent: Prof. Dr. Matthias Hahn**

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 1.10.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien und Enzyme	11
2.2	Pflanzenanzucht	12
2.2.1	Pflanzenmaterial	12
2.2.2	Pflanzenanzucht	12
2.3	Molekularbiologische Methoden	13
2.3.1	Bakterienstämme	13
2.3.2	Vektoren und Plasmide	13
2.3.3	Oligonukleotide	15
2.3.4	Anzucht der Mikroorganismen	16
2.3.5	Rekombinante DNA-Techniken	17
2.3.5.1	Herstellung kompetenter Zellen sowie deren Transformation	17
2.3.5.2	Agarose-Gelelektrophorese	17
2.3.5.3	<i>In-vitro</i> -Manipulation von DNA	17
2.3.5.4	Plasmidpräparationen	18
2.3.5.5	DNA-Amplifikationen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.3.6	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	18
2.3.7	DNA-Sequenzanalysen	18
2.3.8	Klonierungen	18
2.3.9	Isolierung von Gesamt-RNA	20
2.3.10	Northern-Blot-Analyse	20
2.3.11	Poly-(A ⁺)-mRNA-Isolierung	20
2.3.12	Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)	20
2.3.13	Isolierung von genomischer DNA	20
2.3.14	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	21
2.3.15	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	21
2.3.16	DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung	21
2.3.17	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.3.18	Untersuchungen zu den „knock out“-Mutanten	22
2.4	Biochemische Methoden	22
2.4.1	Proteinquantifizierung	22
2.4.2	Protein-Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)	22
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.4.4	„Western-Blotting“ und „Immunoprinting“	23

2.4.5	<i>In-vitro</i> -Translation	23
2.4.6	Isolierung von Chloroplasten	24
2.4.7	Bestimmung des Chloropyllgehaltes in Chloroplasten	24
2.4.8	Isolierung von Envelopemembranen aus Chloroplasten	24
2.4.9	Proteinimport in Chloroplasten	24
2.4.10	Isolierung und Transformation von Tabakprotoplasten	25
2.4.11	Inkubationsversuche mit <i>Arabidopsis</i> -Blattscheibchen	25
2.4.12	Metabolitenbestimmung	25
2.4.13	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	26
2.4.14	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>S. cerevisiae</i>	26
2.4.15	Anreicherung von Proteinen mit Histidin-Tag mit Hilfe der Metallchelat-Affinitätschromatografie	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Sequenzanalysen mit dem <i>AtMSBP1</i>	27
3.1.1	Sequenzanalysen zur Ermittlung weiterer Homologe zum <i>AtMSBP1</i>	31
3.1.2	Suche nach homologen Proteinen zum MSBP in eukaryotischen Algen	35
3.1.3	Stammbaumanalysen	35
3.2	Heterologe Expression des <i>AtMSBP1</i> im Hefe- und <i>Synechocystis</i> -system	37
3.3	Gewebespezifität der Expression der <i>AtMSBP1-3</i> -Proteine	39
3.3.1	Spezifität der <i>AtMSBP</i> -cDNA-Sonden	39
3.3.2	Analysen der <i>AtMSBP</i> -mRNA-Akkumulation	40
3.4	Lokalisation des <i>AtMSBP1</i> in der Zelle	41
3.4.1	<i>AtMSBP1</i> -GFP-Fusionen	42
3.4.2	<i>In-vitro</i> -Translation und Importstudien mit dem <i>AtMSBP1</i> -Preprotein in Chloroplasten	44
3.4.3	Immunodetektion des <i>AtMSBP1</i> in <i>Arabidopsis</i> -Envelope-membranen	46
3.5	Mutanten für die <i>AtMSBP</i> -Proteine	48
3.5.1	Identifikation von „knock out“-Mutanten für <i>AtMSBP1</i> und <i>AtMSBP2</i>	48
3.5.2	Herstellung von RNAi-Mutanten für <i>AtMSBP3</i>	51
3.6	Analyse der <i>AtMSBP1</i> - und <i>AtMSBP2</i> -„knock out“-Mutanten	52
3.6.1	Wachstum der <i>AtMSBP1</i> - und <i>AtMSBP2</i> -„knock out“-Mutanten auf Erde	52
3.6.2	Metabolitenbestimmung	53
3.6.3	¹⁴ C-Glukose-Aufnahmeversuche an isolierten Chloroplasten	56
3.6.4	Wachstum der „knock out“-Mutanten und Wildtyppflanzen auf zuckerhaltigen Medien	57

3.6.5	Molekulare Analysen der Effekte verschiedener Zucker auf den Transkriptionsgehalt ausgewählter zuckerbeeinflusster Gene bei den <i>AtMSBP1::T-DNA</i> - und <i>AtMSBP2::T-DNA</i> -Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen	65
3.7	Untersuchungen zur möglichen Funktion des zentralen Loops der MSPB-Proteine	70
3.7.1	<i>AtMSBP1</i> -Loop-„Sense“-Pflanzen	71
3.7.2	Lokalisation von <i>AtMSBP1</i> -Loop-GFP-Fusionsproteinen in Pflanzenzellen	72
3.7.3	Analyse der aspartatreichen Domäne im zentralen Loop der <i>AtMSBP</i> -Proteine	73
4	Diskussion	75
4.1	Charakteristika der MSBP-Proteine	75
4.2	Einordnung der MSBP-Proteine in die Familie der Zuckertransporter	76
4.3	Heterologe Expression des <i>AtMSBP1</i>	77
4.4	Untersuchungen zur Expression der MSBP-Proteine auf mRNA-Ebene	78
4.5	Untersuchungen zur Lokalisation des <i>AtMSBP1</i> -Proteins in der Pflanzenzelle	79
4.6	Untersuchungen an „knock out“-Mutanten zur Analyse der Funktion der MSBP-Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
4.6.1	Phänotypische Auswirkungen bei der Anzucht der <i>AtMSBP::T-DNA</i> -„knock out“-Mutanten auf Erde	81
4.6.2	Untersuchungen zur Beteiligung der MSBP-Proteine am Transport von Glukose in Plastiden	82
4.6.3	Phänotypische Auswirkungen bei der Anzucht der <i>AtMSBP::T-DNA</i> -„knock out“-Mutanten auf erhöhten Zuckerkonzentrationen	83
4.6.4	Phänotypische Auswirkungen bei der Anzucht der <i>AtMSBP::T-DNA</i> -„knock out“-Mutanten auf erhöhten Konzentrationen des Zuckeranalogons 3-O-Methylglukose	84
4.6.5	Untersuchungen zuckersensitiver Gene in „Source“-Blättern	85
4.6.6	Untersuchungen zuckersensitiver Gene bei erhöhten Zuckerkonzentrationen in „Source“-Blättern aus „knock out“-Pflanzen	86
4.6.7	Einfluss der gewebespezifischen Expression der MSBP-Proteine auf die Stärke der zuckerbeeinflussten Reaktionen	87
4.7	Strukturelle Besonderheiten der MSBP-Proteine im Vergleich mit anderen Zuckertransportern und sich daraus ableitende mögliche Funktionen	88

4.7.1	Analysen zur Funktion des zentralen MSBP-Loops	89
4.7.2	Analysen der aspartatreichen Domäne im zentralen Loop der MSBPs	89
4.8	Modell für die Funktion der MSBPs	90
4.8.1	Lokalisation der MSBP-Proteine in der Plastidenmembran	90
4.8.2	Interaktion der MSBP-Proteine mit anderen Zuckersensoren	91
4.8.3	Modell zum Mechanismus der Signalweiterleitung	91
4.8.4	Identität des postulierten proteinogenen Faktors	93
	Ausblick	95
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	98
7	Anhang	114
7.1	Abkürzungen	114
7.2	Symbole für Aminosäuren	117
7.3	„Accesion“-Nummern der verwendeten Gene bzw. Proteine	118
7.4	Hydrophathie-Analyse	119
7.5	Alignment der MSBPs	120
7.6	Stammbaum der MSBPs	123
7.7	Klonierungen	124

1 Einleitung

Zucker spielen in Pro- und Eukaryoten eine universelle Rolle. Sie dienen der Energieversorgung, als Substrat für anabolische und katabolische Reaktionen und sind Substrate für die Synthese von Polymeren, Aminosäuren und Fettsäuren. Zucker haben aber auch vielfältige regulatorische Funktionen bei der Expression vieler Gene des Katabolismus und des Anabolismus.

Pflanzen können durch die Photosynthese in den Chloroplasten Energie und Reduktionsäquivalente in Form von ATP und NADP gewinnen, die im Calvinzyklus zur Reduktion von CO₂ und letztlich zur Erzeugung von Kohlenhydraten genutzt werden. In mehrzelligen Pflanzen ist, durch die Aufteilung in „Source“- und „Sink“-Gewebe, eine genaue Erfassung und Regulation des Zuckerstatus nötig. Zu den autotrophen „Source“-Geweben gehören die grünen Blätter, die einen Überschuss an Kohlenhydraten produzieren, der gespeichert oder in die „Sink“-Gewebe transportiert werden kann (Nettozuckerexport). „Sink“-Gewebe sind heterotroph und somit auf die Zufuhr der Zucker angewiesen, wie die Wurzeln, oder benötigen mehr Zucker als sie selber produzieren können, wie dies z. B. in jungen wachsenden Geweben, Blüten oder Speicherorganen wie Knollen oder Samen der Fall ist (Nettozuckerimport).

Der Zuckerstatus und insbesondere der Zuckerfluss beeinflussen nicht nur den Energiegehalt (ATP-Status) der Zellen, sie modulieren und koordinieren auch verschiedene interne Regulatoren. In Folge dessen reagieren zuckersensitive pflanzliche Gene als Teil eines konservierten Systems zur zellulären Anpassung an die Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit und zur Kontrolle der Ressourcenverteilung zwischen Geweben und Organen. So werden durch Veränderungen der Kohlenhydratgehalte einige Gene induziert, andere gehemmt und wieder andere nur minimal beeinflusst (KOCH, 1996). Die Sensitivität der kohlenhydratbeeinflussten Gene verbessert durch die Kombination von Hemmung und Induzierung das Potential zur Anpassung der Pflanzen an umweltbedingte und entwicklungsabhängige Signale (BERNIER et al., 1993; JANG & SHEEN, 1994; KOCH, 1996; CORBESIER et al., 1998).

Die Abnahme des Zuckergehaltes aktiviert zum Beispiel die Gene für die Photosynthese, für die Mobilisierung von Reserven und für Exportprozesse („famine genes“ = „Hunger“-Gene). Dagegen nimmt bei der Zunahme des Zuckergehaltes die mRNA der Gene für die Speicherung von Kohlenstoff und Proteinen und für verschiedene Neusynthesen zu („feast genes“ = „Fest“-Gene) (MONROY & SCHWARZBACH, 1984; ROCHA-SOSA et al., 1989; MÜLLER-RÖBER et al., 1990; SHEEN, 1990, 1994; CHENG et

al., 1992; CRIQUI et al., 1992; KRAPP et al., 1993; GRAHAM et al., 1994; JANG & SHEEN, 1994; THOMAS & RODRIGUES, 1994; KOCH, 1996). Die zuckerregulierten Gene reagieren auch auf Phytohormone und verschiedene Umweltbedingungen wie z. B. Stress und Pathogenbefall und beeinflussen und koordinieren so die Entwicklung, das Wachstum und die Vermehrung der Pflanzen (KOCH, 1996; HERBERS et al., 1996; EHNESS, et al., 1997; SHEEN et al., 1999; SMEEKENS, 2000; ROLLAND et al., 2002). Viele Untersuchungen deuten auf enge Verknüpfungen zwischen den Signaltransduktionswegen für Licht, Zucker und Phytohormonen hin und sogar zu gemeinsamen regulatorischen Elementen (VREUGDENHIL, 1983; ALONI et al., 1986; VAN OOSTEN et al., 1997; FINKELSTEIN et al., 1998; HUA & MEYEROWITZ, 1998; NÉMETH et al., 1998; ZHOU et al., 1998, 1999; HUIJSER et al., 2000; GIBSON, 2000).

Die wichtige Funktion der Zucker in der Pflanze weist neben der Photosynthese auf zwei besonders wichtige physiologische Vorgänge im Rahmen des Zuckerstoffwechsels hin: zum einen auf die Messung („Sensing“) und Verarbeitung („Signalling“) des Zuckergehaltes der Zellen und Organe und zum anderen auf den Transport der Zucker.

Der Transport von Kohlenhydraten in Pflanzen

Der Transport der Kohlenhydrate in der Pflanze läuft in unterschiedlichen Dimensionen ab. So werden Zucker innerhalb der Zelle über die Membranen der Organelle transportiert, aus und in die Zellen durch den Transport über die Plasmamembran und die zellverbindenden Plasmodesmata. Der Zuckertransport über weitere Strecken von Organ zu Organ und von Gewebe zu Gewebe erfolgt über das Phloem.

Das Phloem in den Angiospermen, das eng mit dem Wasser leitenden Xylem im vaskulären Bündel assoziiert ist, wird von ontogenetisch zusammenhängenden hochmodifizierten Zelltypen, den Geleitzellen und Siebzellen gebildet. Siebzellen verlieren ihre Kerne, Vakuolen, und viele andere Organellen während ihrer Entwicklung und formen langgestreckte lebende Zellen, die durch Siebplatten miteinander verbunden sind. Geleitzellen enthalten einen Kern und viele Mitochondrien und übernehmen wichtige Funktionen für die Siebzellen, mit denen sie durch Plasmodesmata verbunden sind (LUCAS et al., 1993; SJÖLUND, 1997; WARD et al., 1998; OPARKA & TURGEON, 1999). Die Geleitzellen beladen die Siebzellen mit Saccharose, weiteren Assimilaten, Proteinen, Nucleinsäuren und anderen Molekülen durch die Plasmodesmata (LUKAS et al., 1995; XOCONOSTLE-CÁZARES et al., 1999, KRAGLER et al., 1998; LAZOROWITZ & BEACHY, 1999). In den meisten Pflanzenspezies

ist die Hauptkomponente des Phloemsafte das Disaccharid Saccharose (ZIMMERMANN & ZIEGLER, 1975). In einigen Pflanzenfamilien werden auch Zuckeralkohole in Form von Mannitol und Sorbitol oder Raffinoseverbindungen transportiert (CSÉKE & BUCHANAN, 1986; ZAMSKI & SCHAFFER, 1996). Der Transport erfolgt innerhalb der Siebzellen auf symplastischem Weg ohne die Zelle zu verlassen. Drei verschiedene in den Plasmamembranen lokalisierte Proteine bilden eine osmotische „Pumpe“ innerhalb des Phloems. Saccharose/H⁺-Symporter akkumulieren die osmotisch aktive Saccharose im Phloem, H⁺-ATPasen liefern die für diesen aktiven Transport nötige Energie (HUMPHREYS, 1988; BOUCHÉ-PILLON et al., 1994; SZE et al., 1999) und Wassertransporter, überwiegend Aquaporine, nehmen korrespondierend Wasser aus dem Xylem auf (CHRISPEELS et al., 1999).

Für den Kurzstecktransport der Zucker innerhalb der „Source“- und „Sink“-Gewebe werden zwei unterschiedliche Wege postuliert: zum einen der symplastische Weg von Zelle zu Zelle durch die Diffusion über Plasmodesmata und zum anderen der apoplastische Weg mit zunächst aktivem Transport über die Plasmamembranen und dann durch den Zellwandraum. Es scheint, dass Pflanzen in der Lage sind beide Wege in Abhängigkeit von den Erfordernissen zu nutzen. Die Beladung des Phloems kann auf symplastischem Weg erfolgen. In den Blättern einiger Pflanzenspezies konnte das Vorhandensein vieler Plasmodesmata zwischen Mesophyllzellen und Geleitzellen gezeigt werden (GAMALEI, 1985, 1989; MADORE & WEBB, 1981; SCHMITZ et al., 1987; VAN BEL & GAMALEI, 1992). Für die apoplastische Beladung des Phloems ist der Transport von Saccharose und anderen Assimilaten über die Plasmamembran an verschiedenen Stellen notwendig. In solchen Pflanzen sind entweder keine oder nur wenige Plasmabrücken zwischen Mesophyll- und Geleitzellen vorhanden (HAYES et al., 1985; VAN BEL & KEMPERS, 1990; VAN DER SCHOT & VAN BEL, 1990; GAMALEI, 1989; VAN BEL et al., 1994). In den „Source“-Blättern wird die Saccharose aus den Mesophyllzellen durch Transport in die Zellwand exportiert und am Phloem wieder aktiv importiert. Ein weiterer Transport von Zuckern in die Zellen zurück kann entlang des Transportweges erfolgen, z. B. im Stengel (MINCHIN & THORPE, 1987). Im „Sink“-Gewebe kann die Entladung durch symplastische Verbindungen (IMALU et al., 1999; OPARKA et al., 1999) oder durch den transmembranen Export der Saccharose erfolgen (WALKER et al., 1995). Die Saccharose kann aus dem Apoplasten direkt durch Saccharosetransporter aufgenommen werden (GARHTZ et al., 1996; WEBER et al., 1997; LEMOINE et al., 1999; STADLER et al., 1999) oder sie wird durch

zellwandgebundene Invertasen hydrolysiert und die entstehenden Monosaccharide Glukose und Fruktose werden durch Monosaccharidtransporter aufgenommen (STURM & CHRISPEELS, 1990; ESCHRICH, 1989; SAUER & STADLER, 1993; ROITSCH et al., 1995; WEBER et al., 1995; TRUERNIT et al., 1996). Der apoplastische Weg bietet sich vor allem in heterotrophen Speichergeweben an, da hier ein Transport entgegen dem Konzentrationsgefälle nötig ist (HO & BACKER, 1982; DELROT & BONNEMAIN, 1985; ORLICH & KOMOR, 1989; WRIGHT & OPARKA, 1989).

Zuckertransporter

Aufgrund ihrer relativ großen Hydrathülle werden Zucker mittels Transportproteinen über die Zell- und Organellenmembranen transportiert. Fast alle bisher funktionell charakterisierten pflanzlichen Mono- und Disaccharidtransporter sind Protonensymporter, also sekundär aktive Transporter (SAUER et al., 1990; SAUER, 1992; SAUER & STOLZ, 1994; BOORER et al., 1994, 1996; STOLZ et al., 1994; ZHOU et al., 1997). Sequenzvergleiche zeigen, dass die Mono- und Disaccharidtransporter jeweils eigene Gruppen bilden, die untereinander sehr konserviert sind. Während die Saccharosetransporter bisher nur in Pflanzen identifiziert wurden, sind die Monosaccharidtransporter in Pro- und Eukaryoten weit verbreitet.

Die Aktivität von Monosaccharidtransportern konnte in einer Vielzahl von Pflanzen dargestellt werden (MAYNARD & LUKAS, 1982; GETZ et al., 1987; GOGARTEN & BENTRUP, 1989; TUBBE & BUCKHOUT, 1992). Zu den Substraten der Transporter gehören β -D-Glukose, 3-O-Methyl- β -D-Glukose, 2-Desoxy- β -D-Glukose, α -D-Mannose und β -D-Fruktose, während β -L-Glukose und β -D-Ribose kaum transportiert werden (GOGARTEN & BENTRUPP, 1989). Der erste auf molekularer Ebene charakterisierte pflanzliche Hexosetransporter HUP1 aus der Grünalge *Chlorella kessleri* (Hexose Uptake Protein, SAUER & TANNER, 1989) hat hohe Ähnlichkeiten zu Monosaccharidtransportern aus Säugetieren (BALDWIN, 1993; WALMSLEYM et al., 1998), Hefen (BISSON et al., 1993; KRUCKEBERG, 1996) und zu H^+ -Symportern aus Bakterien (HENDERSON, 1993; HENDERSON et al., 1993). Aus *Arabidopsis* und anderen Pflanzenspezies konnten viele weitere Transporter identifiziert und isoliert werden (SAUER et al., 1990b; SAUER & STADLER, 1993; BUGOS & THOM, 1993; ROITSCH & TANNER, 1994; WEIG et al., 1994; TRUERNIT et al., 1996, 1999; HARRISON, 1996; YLSTRA et al., 1998; BÜTTNER et al., 1999, 2000). Sie alle können aufgrund ihrer Struktur und konservierten Motive in die Familie der Zuckertransporter eingeordnet werden (PAO et al., 1998), die wiederum zur großen Gruppe der MFS (Major Facilitator Superfamily)

gehören (MARGER & SAIER, 1993). Auch Saccharosetransporter wurden in vielen Pflanzenspezies identifiziert (RIESMEIER et al., 1992; GAHRTZ et al., 1994, 1996; SAUER & STOLZ, 1994; KÜHN et al., 1996, 1997, 2003; HARRINGTON et al., 1997; HIROSE et al., 1997; BÜRKLE et al., 1998; SHAKYA & STURM, 1998; TEGEDER et al., 1999; STADLER et al., 1999; MATSUKURA et al., 2000; WEISE et al., 2000; MEYER et al., 2000; WESCHKE et al., 2000; KNOP et al., 2001; REINDERS et al., 2002; JUERGENSEN et al., 2003).

Die pflanzlichen Monosaccharidtransporter bestehen aus 12 transmembranen Helices, die wahrscheinlich aufgrund der Ähnlichkeit zwischen der amino- und der carboxyterminalen Hälfte aus einer Duplikation eines Transporters aus 6 transmembranen Helices hervorgegangen sind (MARGER & SAIER, 1993; HEDIGER, 1994; GRIFFITH et al., 1992; SAUER & TANNER, 1993). Auch Saccharosetransporter haben 12 transmembrane Helices und ähneln den Monosaccharidtransportern (WARD et al., 1998; RENTSCH et al., 1998).

Die Transportproteine konnten durch heterologe Expression oder Rekonstitution im Proteoliposomen charakterisiert werden, ihre Genexpression wurde anhand von *In situ* Hybridisierungen und immunhistologischen Techniken untersucht (BUSH, 1993; TANNER & CASPARI, 1996). Alle bisher charakterisierten pflanzlichen Monosaccharidtransporter sind energieabhängige H⁺-Symporter mit K_M-Werten von 10 - 100 µM, die Monosaccharide in Form von Hexosen und Pentosen akzeptieren (BUSH, 1993; TANNER & CASPARI, 1996; BÜTTNER & SAUER, 2000). Beispiele hierfür sind der gut untersuchte CkHUP1 (SAUER et al., 1990a; AOSHIMA et al., 1993) und der AtSTP1 (AOSHIMA et al., 1993; BOORER et al., 1994). Alle bisher charakterisierten Saccharosetransporter erwiesen sich ebenfalls als energieabhängige Protonensymporter, die Saccharose sehr spezifisch mit K_M-Werten von 0,3 - 12 mM transportieren (RIESMEIER et al., 1992; LEMOINE et al., 1996; LEMOINE, 2000; WEISE et al., 2000). Aber auch der Transport von Maltose konnte nachgewiesen werden (LEMOINE, 2000), ebenso überraschenderweise der Transport von Vitamin H (Biotin) (AtSUC5; LUDWIG et al., 2000). Die Stöchiometrie des Transportes für Protonen und Saccharose ist 1:1 (BOORER et al., 1996; ZHOU et al., 1997; BUSH, 1990; SLONE et al., 1991).

Die Expression der oft mit mehreren Isoformen in einer Spezies vertretenen Zuckertransporter ist stark reguliert und unterliegt einer spezifischen gewebe-, zeit- und umweltabhängigen Expression um flexibel Kohlenhydrate verteilen zu können (BÜTTNER & SAUER, 2000; WILLIAMS et al., 2000). Die Regulation erfolgt z. B. beim Übergang in Blättern von „Sink“ zu „Source“ (TRUERNIT & SAUER, 1995; RIESMEIER et

al., 1993), während der Samenentwicklung (WEBER et al., 1997), der Pollenreifung und Keimung (TRUERNIT et al., 1999; YLSTRA et al., 1998). Aber auch wechselnde biotische Faktoren wie mechanische Beeinträchtigungen, Licht, Wasser, Salzstress, Phytohormone oder Pathogenbefall wirken sich ebenfalls auf die Expression aus (TRUERNIT et al., 1996; DELROT et al.; 2000, NOIRAUD et al., 2000). So wird z. B. der AtSTP4 in typisch heterotrophen Geweben (Wurzelspitzen und Antheren) exprimiert und nimmt am apoplastischen Zuckertransport bei der Phloementladung teil. Er kann aber auch in autotrophen Zellen infolge von Umwelt- oder biotischem Stress, z. B. durch mechanische Verletzung oder Pilzinfektion verstärkt exprimiert werden (TRUERNIT et al., 1996).

Die meisten bisher identifizierten und charakterisierten Monosaccharidtransporter sind in der Plasmamembran lokalisiert. Aber auch für die internen Membranen wurden Zuckertransporter postuliert. In der Envelopemembran der Plastiden konnte ein Glukosetransporter identifiziert und charakterisiert werden (pGlcT, WEBER et al., 2000). Er trägt eine entsprechende Plastiden-Zielsteuerungssequenz, der C- und N-Terminus ragen vermutlich in den intermembranen Raum. Dem pGlcT wird eine Rolle beim amylolytischen Stärkeabbau zugeschrieben. In der Vakuole, die einen Speicher für Zucker und andere Metabolite darstellt, wurde ebenfalls ein Zuckertransporter postuliert (CHIOU & BUSH, 1996; MARTY, 1999; LALONDE, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit dem MSBP (Monosaccharid Binding Protein) ein neuartiges Mitglied der Monosaccharidtransporterfamilie aus *Arabidopsis thaliana* charakterisiert werden. Der AtMSBP1 wurde unter dem Namen AZT (Arabidopsis Zucker Transporter) erstmals von TJADEN (1996) und TRENTMANN (1998) beschrieben. Verschiedene Sequenzanalysen zeigen eine nähere Verwandtschaft zu bakteriellen als zu eukaryotischen Monosaccharidtransportern. Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *Arabidopsis* drei Isoformen und auch in anderen Pflanzenspezies weitere Homologe des MSBP-Types identifiziert werden. Das Protein besteht wie andere bekannte Monosaccharidtransporter aus insgesamt 12 potentiellen transmembranen Helices, die zwischen Helix 6 und 7 durch eine ungewöhnlich lange hydrophile Region getrennt werden („Loop“). Dieser Loop ist 4 bis 5 mal so lang wie der Loop bei anderen bisher bekannten Mitgliedern der Monosaccharidtransporterfamilie (HENDERSON, 1991; MUECKLER, 1993; WEBER et al., 2000). Diese Sequenzerweiterung ähnelt im Umfang den C-terminalen Sequenzerweiterungen der Zuckersensoren SNF3 und RGT2 aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Zuckertransporter als Sensoren

Durch den intrazellulären Metabolismus muss eine Unterscheidung zwischen Biosynthese und Transport, sowie zwischen intra- und extrazellulären Zuckerkonzentrationen möglich sein. Membrangebundene Sensoren können externe Zuckerkonzentrationen perzipieren („sensen“) und Signalkaskaden auslösen. Es gibt zwei Möglichkeiten für die Wahrnehmung eines Signals durch ein sensorisches Protein: zum einen kann der Sensor als Rezeptor fungieren, der das wahrzunehmende Molekül bindet und das Signal durch andere Proteine weitergibt. Zum anderen können membrangebundene Sensoren strukturähnlich zu Transportern sein und direkt durch strukturelle Änderungen die Anwesenheit des zu perzipierenden Moleküls erfassen (LALONDE et al., 1999). Das gut untersuchte Zuckersensing-System der Hefe dient als Modell um membrangebundenes Zuckersensing zu studieren:

Glukose hat zwei Effekte auf die Genexpression in Hefen: sie unterdrückt auf der einen Seite die Expression vieler Gene, so die des respiratorischen Stoffwechselweges (z.B. Cytochrom), der Glukoneogenese und die für die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen (z. B. für Galaktose, Saccharose und Maltose). Auf der anderen Seite induziert Glukose aber auch die Genexpression für die Verstoffwechslung von Glukose, einschließlich der Gene für die Glykolyse (MULLER et al., 1995) und für die Glukosetransporter (ÖZCAN & JOHNSTON, 1995).

Mikroorganismen nutzen verschiedene Mechanismen als Anpassung an die bevorzugte Aufnahme von Glukose, so auf Ebene der Gentranskription („Glukose-Katabolismus-Hemmung“, MAGASANIK, 1961; RONNE, 1995; ULLMANN, 1996; GANCEDO, 1998), der RNA-Prozessierung, der mRNA-Stabilität (CEREHINO & SCHEFFLER, 1996), der mRNA-Translation (VALLARI et al., 1992), posttranslational (THEVELEIN & HOHMANN, 1995; CEREHINO & SCHEFFLER, 1996; CHEN & TYE, 1995; TUNG et al., 1992) und auf der Ebene der Proteinstabilität (JIANG et al., 1997). In *E. coli* wird das Sensing durch die Phosphorylierung von Glukose während des Importes mittels des Phosphotransferase-Systems (PTS) gewährleistet (POSTMA et al., 1993; SAIER & REIZER, 1994; STÜLKE & HILLEN, 1998). Alternativ wird Glukose-6-Phosphat durch den UhpC perzipiert, der auf energiereiches Glukose-6-Phosphat außerhalb der Zelle reagiert (ISLAND & KADNER, 1993).

In den Plasmamembranen eukaryotischer Zellen konnten jedoch keine homologen Systeme gefunden werden. In der Hefe wird das Glukosesignal, dass die Induktion der Hexosetransporter (HXT) auslöst, durch die Sensoren SNF3 und RGT2 erzeugt

(ÖZCAN & JOHNSTON, 1995; ÖZCAN et al., 1996a; WENDELL & BISSON, 1994). Diese Glukosesensoren sind in der Plasmamembran lokalisiert, ähneln mit ihren 12 transmembranen Helices den Glukosetransportern und werden wie diese in die HXT-Superfamilie eingeordnet. Sie besitzen jedoch eine verlängerte zytoplasmatische Domäne (ÖZCAN et al., 1996a; Marshall-Carlson et al., 1990) und können Glukose nicht in signifikanten Mengen transportieren (LIANG & GABER, 1996; ÖZCAN et al., 1996a, 1998). SNF3 ist ein hoch affiner Glukoserezeptor, der für die Induktion der Expression von hoch affinen Glukosetransportern (HXT2, HXT4, HXT6 und HXT7; K_M -Werte von 1-10 mM) bei niedrigen Glukosekonzentrationen verantwortlich ist (ÖZCAN & JOHNSTON, 1995; BOLES & HOLLENBERG, 1997). RGT2 ist der Rezeptor für hohe Glukosekonzentrationen mit einer geringen Affinität für Glukose und reguliert die Expression niedrig affiner Glukosetransporter mit einer hohen Transportkapazität (HXT1 und HXT3; K_M -Werte von 50-100 mM).

Die 4 bis 6 mal so lange zytoplasmatisch lokalisierte C-terminale Verlängerung von 218 bzw. 303 Aminosäuren, durch die sich RGT2 und SNF3 von allen anderen Glukosetransportern unterscheiden, ist notwendig für die Generation des Glukose-signals (WENDELL & BISSON, 1994; MARSHALL-CARLSON et al., 1990; ÖZCAN et al., 1998; COONS et al., 1997; VAGNOLI et al., 1998). Austauschmutationen einzelner Aminosäuren zeigten, dass auch ohne Glukose im Medium ein Signal für die Expression der *HXT*-Gene möglich ist (ÖZCAN et al., 1996a). Somit ist nicht der Metabolismus der Glukose für die Generation des Glukosesignals verantwortlich, sondern durch die Bindung von Glukose außerhalb der Zelle an die Glukoserezeptoren scheint es zu einer Konformationsänderung zu kommen, die im Zellinneren Effekte hat. Anhand dieser Ergebnisse wurde spekuliert, dass die Glukosesensoren Glukosetransporter mit einer nicht zu messenden Glukosetransportkapazität sind, die das Signal durch eine Konformationsänderung während des Glukosetransportes generieren (LALONDE et al., 1999).

Im Menschen wurde der Zuckertransporter GLUT2 als Sensor identifiziert (THORENS et al., 1989), der nicht nur Zucker transportiert, sondern auch externe Zucker der Zelle signalisiert (GUILLAM et al., 1997; THORENS, 2001). Bei dem GLUT2 liegt die Sensorfunktion jedoch im verlängerten zentralen Loop (GUILLEMAIN et al., 2000).

Dem Saccharosetransporter *LeSUT2* aus Tomate wurde als erstem pflanzlichen Transporter eine Rolle als Zuckersensor zugesprochen. Er hat wie die Hefe-Sensoren SNF3 und RGT2 eine verlängerte C-terminale zytoplasmatische Domäne und es

konnte keine Transportaktivität bei der heterologen Expression in Hefen nachgewiesen werden (BARKER et al., 2000). Bezüglich der Funktion als Sensor bestehen aber Zweifel, da das Homolog *AtSUC3* aus *Arabidopsis* zum Transport von Zuckern in der Lage ist (MEYER et al., 2000).

Komponenten des Zuckersignalling und -sensing

In vielen Systemen konnte gezeigt werden, dass der Eintritt von Zuckern in den intermediären Metabolismus durch die Aktion von Hexokinasen signalisiert wird (ROSE et al., 1991; EPSTEIN et al., 1992; JOHNSTON, 1999) und diese als Sensoren dienen (JANG & SHEEN, 1994; JANG et al., 1997; DAI et al., 1999; XIAO et al., 2000; ROLLAND et al., 2002). In Hefen spielt die Hexokinase HXK2 eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des Glukosesignals in der Zelle (MA et al., 1989). Mutationen der HXK2 unterbinden die Repression der Invertase und anderer glukosegehemmter Gene durch Glukose (ENTAIN et al., 1980). HXK2 liegt in einem dimeren-monomeren Gleichgewicht vor, das durch Phosphorylierung beeinflusst wird (FERNÁNDEZ et al., 1988; RANDEZ-GIL et al., 1998). HXK2 ist auch bei „Feedbackreaktionen“ bezüglich des intrazellulären Glukosegehaltes beteiligt, so ist sie zusätzlich zur Kohlenstoff-Kataboliten-Hemmung auch in die glukoseinduzierte Expression der *HXT*-Gene involviert (RANDEZ-GIL et al., 1998).

In Pflanzen spielt eine Hexokinase eine wichtige Rolle als interner Sensor beim Sensing von Hexosen bezüglich der Hemmung typischer „Famine“-Gene (SHEEN, 1990; GRAHAM et al., 1994; JANG & SHEEN, 1994). Nur Substrate der Hexokinase, die aufgenommen und phosphoryliert werden, zeigen die glukosespezifische Hemmung (GRAHAM et al., 1994; JANG & SHEEN, 1994). Nicht bzw. nur schwach metabolisierbare Zuckeranaloga wie 6-Deoxyglukose und 3-O-Methylglukose, die zwar in die Zelle aufgenommen werden, aber nicht bzw. nur schwach durch die Hexokinase phosphoryliert werden, hemmen nicht die Expression der Gene der Photosynthese. Deshalb scheint die Phosphorylierung durch die Hexokinasen zur Initiation einer Signalkaskade zu führen. Die Produkte der Hexokinase Glucose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat und ATP haben nicht den gleichen inhibitorischen Effekt wie Glukose. Die Veränderung des ATP:ADP-Verhältnisses scheint ebenfalls keinen Einfluß auf das Signalling zu haben (GRAHAM et al., 1994; JANG & SHEEN, 1994; VAN OOSTEN et al., 1997; KLEIN & STITT, 1998). Durch den Fluss der Hexosen in die Glykolyse durch die duale Funktion der Hexokinasen kann der metabolische Status verändert werden. Dieses kann mit den Zuckeranaloga 2-Deoxy-Glukose und

Mannose umgangen werden, die zwar Substrate für die Hexokinase sind, aber nicht bzw. nur langsam in den Metabolismus einfließen. Die Effekte dieser Zuckeranaloga konnten in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen werden (GRAHAM et al., 1994a, 1994b; JANG & SHEEN, 1994; SHEEN, 1990, 1994; STITT et al., 1995). So konnte gezeigt werden, dass der weitere Metabolismus nicht wichtig für das Signalling ist. Pflanzen mit erhöhten Hexokinase-Gehalten sind sensibler gegenüber erhöhten Glukose- und 2-Deoxy-Glukose-Gehalten, während Pflanzen mit verminderten Hexokinase-Gehalten unempfindlicher gegenüber Zuckern sind (JANG et al., 1997). Das endogene Hexokinase-Signaling kann durch Überexpression einer heterologen, nicht „sensenden“ Hexokinase umgangen werden. Allerdings bleibt nicht auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der Zuckeranaloga und der transgenen Pflanzen und Hefemutanten unter anderem auf eine massive Störung des ATP-Haushaltes zurückzuführen sind (HALFORD et al., 1999).

Eine Verbindung zwischen dem Transport der Zucker in die Zelle und dem Zuckersensing unabhängig von Hexokinasen konnte mit Hexoseanaloga wie 6-Deoxy-Glucose und 3-O-Methylglukose nachgewiesen werden. Diese Analoga können in die Zelle gelangen und lösen dort Zuckersensing aus, obwohl sie keine oder nur schwache Substrate für Hexokinasen sind und nicht in den Metabolismus der Zellen eingehen (XIAO et al., 2000; SMEEKENS & ROOK, 1997; CORTÉS et al., 2003). Allerdings fehlt bisher der direkte Nachweis für die Beteiligung von Zuckertransportern am Zuckersensing in Pflanzen. Auch der Transport von Zuckern über den symplastischen Weg via Plasmodesmata löst ein Signal aus (KOCH, 1996), das sich wahrscheinlich von dem durch Transport über die Plasmamembran vermittelten Signal unterscheidet. Die MSBP-Typ-Proteine könnten diese am Zuckersensing beteiligten Zuckertransporter sein.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung des neuartigen Zuckertransporters MSBP aus *Arabidopsis thaliana*. Besonderes Gewicht lag auf folgenden Fragestellungen:

Wie ist die Lokalisierung der MSBP-Proteine in der Pflanze und in der Zelle?

Welche Rolle spielt dieses neuartige Protein im Zuckerstoffwechsel der Pflanze?

Kann für den MSBP eine Funktion als Zuckersensor nachgewiesen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Vertreiber	Produkte
Amersham-Buchler, Braunschweig	Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP), Hybond N Nylonmembran, β -max-Film
AppliChem, Darmstadt	Glycerin, Glycin, Natriumcitrat, D(+)-Glukose, EDTA, Acrylamid 4K-Lösung (40 %),
Biometra, Göttingen	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), DTTred, Phenol, Tricin, Natriumdodecyl-Phosphat, Tris, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
Biomol, Göttingen	Ethidiumbromid, SDS
Biozym, Oldendorf	Aerosol-resistente Filter-Pipettenspitzen
Boehringer, Mannheim	Nukleosidphosphate, Glukose-6-Phosphat, Hexokinase
Duchefa, Haarlem, NL	Tetrazyklin, Chloramphenicol, Ampicillin, Rifampicin, Gamborg B5 Medium, Murashige & Skoog Medium
Fluka, Neu-Ulm	Bromphenolblau
Gerbu, Gaiberg	NADH, NAD, NADP
Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe	SUPERSCRIPT TM II RNaseI ⁻ Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase, Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer, T4 DNA Ligase, Agarose, Bacto-Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, Bacto-Trypton, „Casamino Acids“
Macherey-Nagel, Düren	Whatman-Papier
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	T4-DNA-Ligase, DNA-Polymerase, IPTG, X-Gal, Restriktionsnukleasen, Klenow-Fragment, alkalische Phosphatase, Lambda DNA/ <i>Pst</i> I Marker, 1kb Marker
Merck, Darmstadt	Methanol, Magnesiumchlorid, Isopropanol, Kaliumchlorid
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	μ MACS mRNA Isolation Kit
MWG Biotech, Ebersberg	Oligonukleotide
NEB, Frankfurt/Main	Restriktionsnukleasen, Prestained Protein Marker Broad Range
NEN DuPont, Bad Homburg	[α - ³² P]-dCTP, [³⁵ S]-Methionin
Novex, Frankfurt a.M.	Dry Ease Mini-Gel Drying System
PALL Life Science, Dreieich	Nitrozellulose-Membranen
Promega, Mannheim	<i>Pfu</i> -Polymerase, pGEM _T -Easy Vector System I, TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System“, „TNT [®] Coupled Wheat Germ Extrakt System“, RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor, Canine Pancreatic Microsomal Membranes

Pharmacia, Freiburg	Chelatierende Sepharose, NAP-Säulen, DNA-Spin-Prep-Kit, Ficoll, Percoll
Qiagen, Hilden	„QIAprep Spin Plasmid Kit“, „QIAEX II Extraction from Agarose Gels“, „QIAquick Gel Extraction Kit“, Ni-NTA Agarose, „QIAquick PCR Purification Kit“, Penta-His™- Antikörper (Maus)
Riedel-de-Haen, Seelze	Aceton, Essigsäure, Ethanol, HCl, Methanol, Tris, Wasserstoffperoxid
Roche, Mannheim	BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)
Roth, Karlsruhe	Eisessig, NaCl, HEPES
Schleicher & Schuell, Dassel	Protran Nitrocellulosemembranen, ELU-Quick DNA Purification Kit, Nytran-Plus Membran
Schuchard, München	Tween-20
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blue G-250, Macerozyme R-10, Cellulase ‘Onozuka’ R-10
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Dodecylmaltosid, DNase, RNase, Temed, Kodak X- OMAT/XAR-5, Bicinchoninsäure-Kupfersulfat-Lösung, Natriumdihydrogenphosphat, Ammoniumpersulfat, Kalium- dihydrogenphosphat, Bromphenolblau
Stratagene, Heidelberg	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
Takara (Cambrex Bio Science Verviers), Apen	DNA-Polymerase

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Enzyme wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Pflanzenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit *Arabidopsis thaliana* L. (Varietät *Columbia*) Wildtyppflanzen und Mutanten gearbeitet. Die „knock out“-Mutanten *AtMSBP1::T-DNA* (Garlic_296_E01.b.1a.Lb3Fb) und *AtMSBP2::T-DNA* (Garlic_124_H03.b.1a.Lb3Fa) aus dem SAIL Projekt (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library, SESSIONS et al., 2002) wurden uns zur Verfügung gestellt vom Torrey Mesa Research Institute (TMRI, San Diego, CA, USA). Des weiteren wurde mit *Oryza sativa* (Varietät *Nipponbare*) gearbeitet. Für die GFP-Versuche wurde *Nicotianum tabakum* der Varietät *W38* verwendet. Aus Spinat (*Spinacia oleacea*) und Erbsen (*Pisum sativum*) wurden Chloroplasten isoliert.

2.2.2 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana*, Reis (*Oryza sativa*) und Erbsen (*Pisum sativum*)

erfolgte auf ED-73 Einheitserde in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen (10 h Licht pro Tag, 150 μ E, 20°C). Spinat (*Spinacia oleacea*) wurde im Freiland angezogen.

Arabidopsis-Pflanzen wurden des weiteren in Sterilkultur angezogen. Dies erfolgte auf MS-8-Medium (0,5 x MS Salze; 0,8 % Agar; 0,05 % MES (pH 5.7) (MURASHIGE & SKOOG, 1962; WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002)) in sterilen Magenta-Boxen oder auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen Zuckern, Zuckeralkoholen und Zuckeranaloga. Vor der Aussaat wurden die Samen sterilisiert und die Platten mit den Samen für 2 Tage bei 4°C im Dunkeln inkubiert (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002). Das Wachstum fand unter Langtagbedingungen in einer Klimakammer (16 h Licht, 8 h Dunkel, 19°C, 150 μ E) statt. Auch die Anzucht der Tabakpflanzen erfolgte in Sterilkultur unter Langtagbedingungen in einer Klimakammer auf 2MS-Medium (1 x MS Salze; 2 % Saccharose; 0,05 % MES (pH 5.6) und 0,8 % Agar) (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Bakterien- und Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Bakterien- und Hefestämmen gearbeitet.

Der *E. coli*-Stamm XL1 blue (Stratagene, Heidelberg) wurde zur Vermehrung von Plasmidvektoren und der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS (Novagen, Heidelberg) wurde zur heterologen Expression im bakteriellen System genutzt. Die verschiedenen Hefestämme wurden für die Expression des AtMSBP1 verwendet. Für Studien zwischen verschiedenen Fusionsproteinen aus AtMSBP1 und SsGTR1 wurden die uns freundlicherweise von Prof. Georg Schmetterer (Wien) zur Verfügung gestellten *Synechocystis*-Stämme 6803 Wildtyp und ALG1 benutzt. Zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde der *Agrobakterien*-Stamm GV 3101 verwendet.

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme.

Stamm	Organismus	Relevante Merkmale	Referenz
XL1 blue	<i>E. coli</i>	Tet ^r	BULLOCK et al., 1987
BL21(DE3) pLysS	<i>E. coli</i>	Clm ^r	STUDIER et al., 1990
6803-WT	<i>Synechocystis 6803</i>		SCHMETTERER, Wien
6803-ALG 1	<i>Synechocystis 6803</i>		SCHMETTERER, Wien
GV 3101	<i>A. tumefaciens</i>	Rif ^r	KONCZ & SCHELL, 1986
INVSc1	<i>S. cerevisiae</i>	Ura ^r	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.2 Vektoren und Plasmide

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidvektoren aufgeführt, die zur Klonierung und Expression in Bakterien, Hefen oder Pflanzen eingesetzt wurden.

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Vektoren und Plasmide.

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
GFP2	Amp ^r , GFP-Expressionsvektor	KOST et al., 1998
NEV-E	Amp ^r , Hefe-Klonierungsvektor	SAUER & STOLZ, 1994
pART27	Spec ^r , binärer Pflanzenvektor für „RNAi“	GLEAVE et al., 1992
pA35S	Amp ^r , Klonierungsvektor für transgene Pflanzen	
pBSK	Amp ^r , Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pDE1001	Amp ^r , Spec ^r , binärer Pflanzenvektor	Plant Genetics Systems
pET16b	Amp ^r , Expressionssvektor mit Histidin-Tag	Novagen, Heidelberg
pGEM _{T-Easy}	Amp ^r , Klonierungsvektor	Promega, Mannheim
pGPTV	Kan ^r , binärer Pflanzenvektor für GUS-Fusion	BECKER et al., 1992
pHannibal	Amp ^r , Klonierungsvektor für „RNAi“	GLEAVE et al., 1992
pUC18	Amp ^r , Klonierungsvektor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pYES2	Hefevektor	Invitrogen, Karlsruhe
λ Zip Lox	Amp ^r , Klonierungsvektor	GibcoBRL, Eggenheim
ID 8B8T74	EST-Klon, AtMSBP1 in λ Zip Lox	
pET 7	AtNTT1 in pET16b ohne His-Tag	THOM (1996)
pOT 5	AtMSBP1-Loop in pET16b mit His-Tag	TRENTMANN (1998)
pOT 17	AtMSBP1 in pGEM _{T-Easy}	TRENTMANN (1998)
H ₃	plastidäre G6P-DH-Leadersequenz in GFP2 LeSUT in GFP2	WENDT et al. (2000) MÖHLMANN, Kaiserslautern
K1 und K2a	Kontrollkonstrukt für <i>Synechocystis</i> -Transformation	SÜLTEMEYER, Kaiserslautern
pEM 114	SsGTR in pBSK	diese Arbeit
pEM 146	AtMSBP1 in pYES2	diese Arbeit
pEM 148	NtMSBP1 in pBSK	diese Arbeit
pEM 152	AtMSBP1 in GFP2	diese Arbeit
pEM 175	AtMSBP1 in pET16b ohne His-Tag	diese Arbeit
pEM 232	AtMSBP2 in pBSK	diese Arbeit
pEM 246	AtMSBP3 in pBSK	diese Arbeit
pEM 292	AtMSBP1 in pBSK	diese Arbeit
pEM 395	AtMSBP1 in NEV-E	diese Arbeit
pEM 433	OsMSBP1 in pET16b ohne His-Tag	diese Arbeit
pEM 468	SsGTR und AtMSBP1 Fusionskonstrukt X in pBSK mit Amp ^r	diese Arbeit
pEM 499	SsGTR und AtMSBP1 Fusionskonstrukt XVI in pBSK mit Amp ^r	diese Arbeit
pEM 575	AtMSBP1-Loop in GFP2	diese Arbeit
pEM 580	SsGTR und AtMSBP1 Fusionskonstrukt XVI in pBSK mit Kan ^r	diese Arbeit
pEM 587	SsGTR und AtMSBP1 Fusionskonstrukt X in pBSK mit Kan ^r	diese Arbeit
pEM 592	SsGTR und AtMSBP1 Fusionskonstrukt V in pBSK mit Amp ^r	diese Arbeit
pEM 598	AtMSBP1-Loop in PDE1001	diese Arbeit
pEM 596	AtpSSU-Leadersequenz & AtMSBP1-Loop in PDE1001	diese Arbeit
pEM 600	AtMSBP3-Loop(vorne) in pART27	diese Arbeit
pEM 612	SsGTR und AtMSBP1 Fusionskonstrukt XVI in pUC18 mit Kan ^r	diese Arbeit
pEM 624	AtPlastocyanin in pBSK	diese Arbeit
pEM 627	AtMSBP3-Promotor in pGPTV	diese Arbeit

Um auf die Anwesenheit eines Plasmides zu selektionieren sowie Kontaminationen zu vermeiden wurden den Medien Antibiotika zugesetzt (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika und deren Konzentrationen.

Antibiotikum	Endkonzentration (in µg/ml)
Ampicillin (Amp)	200 (<i>E. coli</i>)
Cefotaxin (Cef)	125 (<i>A. thaliana</i>)
Kanamycin (Kan)	25 (<i>E. coli</i>)
	25 (<i>A. tumefaciens</i>)
	50 (<i>Synechocystis</i>)
	50 (<i>A. thaliana</i>)
Rifampicin (Rif)	100 (<i>E. coli</i>)
	100 (<i>A. tumefaciens</i>)
Spectomycin (Spec)	100 (<i>A. tumefaciens</i>)
Tetrazyklin (Tet)	10 (<i>E. coli</i>)

2.3.3 Oligonukleotide

Zur DNA-Sequenzanalyse und zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kamen die in Tabelle 2.4 dargestellten Oligonukleotidprimer zum Einsatz.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotidprimer.

Bezeichnung	Primersequenz
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
T7-Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
Loop 1	5'-GARGADTAYATVATTGG-3'
Loop 2	5'-CTNTTGGRIAGYVITYCAYG-3'
Loop 3	5'-TMYAWBCYAHITGCCAHCC-3'
Loop 4	5'-GCTIACMARDGCRGHHGC-3'
ML 31	5'-ATGAATCCCTCCTCTTCT-3'
ML 32	5'-TCACATTTGCTCCAGAGT-3'
ML 34	5'-AATGCCGACACCTGCAGCCTAGGCACGCTTAAC-3'
ML 44	5'-CCACGCGTCTGAGTCTACTAAAGAG-3'
ML 45	5'-AGTTACAAGCTCGAGATCCTTAGAAGG-3'
ML 49	5'-TTTGTTGAGCCATGGAGGGAGCG-3'
ML 50	5'-CACAGAGCAATTGACGAAGAAG-3'
ML 50-A	5'-CACAGAGCAATTCTCGAGGAAGAAAGTTAC-3'
ML 54	5'-ATTGGTAACCATGGTGTGTTTG-3'
ML 55	5'-GAAAAATCACTCGAGTTTAGATG-3'
ML 56	5'-CAGTTTCTCACTCGTTTTTAGC-3'
ML 57	5'-AGAAGACGGAATTATGAGTGG-3'
ML 58	5'-AAAGATGAGGAGTGTAGTGC-3'
ML 59	5'-TAGAAAGTCATCCATCAGAG-3'
Syn 1	5'-GCAGGTCTAGACCCAGTTG-3'

Tab. 2.4: Fortsetzung

Bezeichnung	Primersequenz
Syn 2	5'-GCTGCAAATTGGTACCGACTCAGG-3'
Syn 3	5'-TAACCAGCCAGCTGGGAGACTCGG-3'
Syn 4	5'-GTCGGCACTGCAGCAGTTTGTG-3'
Syn 5	5'-CGAACTTCCTACGTATTTAGTCGC-3'
Syn 6	5'-CCTGAAAACCTGCTGCAGTATTTG-3'
Syn 7-A	5'-GAGGAGGGATTTCATATGAAGCTG-3'
Syn 8-A	5'-GGGTAAAACCTCTCGAGCAAATG-3'
Syn 9	5'-GTTTGTGACATATGAAGGGAGCG-3'
Syn 11	5'-GAGTCTCCCAGCTGGCTGGTTAG-3'
Syn 12	5'-AACAAACTGCTGCAGTGCCGAC-3'
Syn 13	5'-GCGACTAACAGCTGGGAGATTC-3'
Syn 14	5'-CAAATACTGCAGCAGTTTTTCAGG-3'
Kan Resi T3 (Nco)	5'-TTCGTACGCGTCCATGGGGGG-3'
Kan Resi T7 (Nco)	5'-TGTCTCCATGGGTCCGACCTG-3'
pSSU 1	5'-GAAGAAGATCTAGAAGTAATGGCTTCC-3'
pSSU 2	5'-GACAGTTTCTAGAAATGACATTTACC-3'
GFP L1	5'-CTTTATTTGTCTAGAATGGTGTGTTTTATTTGCCCG-3'
GPF L2	5'-GCAGTATTTGAATCTCGAGACCAACAACC-3'
LB3	5'-TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC-3'
RNAi3As1	5'-TGTGATTGGTCTAGACAACGAG-3'
RNAi3As2	5'-ATGGTACCATCGATCCGCTGGTG-3'
RNAi3Aas1	5'-CGATAGAAGAATTCGTGATTGGAC-3'
RNAiBas2	5'-CATCATCGAATTCTGGCTCACAAG-3'
LhbB1-1	5'-ATGGCCGCCTCGACAATG-3'
LhbB1-2	5'-TCACTTTCCGGGGACGAAG-3'
NR1-1	5'-ATGGCGACCTCCGTCGATAAC-3'
NR1-2	5'-GAAGATTAAGAGATCCTCC-3'
Plast 1	5'-ATGGCCGCAATTACATCAG-3'
Plast 2	5'-TACTTGACGGTGAGTTTC-3'
MSBP3_GUS_for	5'-CTCTGCTCAAAGGTCGACAAAATTAAC-3'
MSBP3_GUS_rev	5'-CTATCGCAGCTGCTAAAGCAAC-3'

2.3.4 Anzucht der Mikroorganismen

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37°C in YT-Vollmedium (0,8 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 0,25 % (w/v) NaCl; pH 7,0; [+ 1,5 % (w/v) Agar für Agarplatten]) (SAMBROOK et al., 2001).

Die Agrobakterien wurden unter aeroben Bedingungen bei 30°C in YEB-Medium angezogen (0,5 % (w/v) Beef-Extrakt; 0,1 % (w/v) Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 2 mM MgSO₄; [+ 1,5 % (w/v) Agar für Agarplatten], VERVLiet et al., 1975)).

Synechocystis 6803-Zellen wurden im Licht bei 30°C mit BG11-Minimalmedium (0,0036 % (w/v) CaCl₂; 6x10⁻⁴ % (w/v) Zitronensäure; 1x10⁻⁴ % (w/v) EDTA; 6x10⁻⁴ % (w/v) Eisen Ammonium Citrat; 0,004 % (w/v) K₂HPO₄; 0,0075 % (w/v) MgSO₄; 0,002 % (w/v) NaCO₃; 0,15 % (w/v) NaNO₃; 6,1x10⁻⁵ % (w/v) H₃BO₃; 1,69x10⁻⁴ % (w/v) MnSO₄; 2,87x10⁻⁴ % (w/v)

ZnSO₄; 2,5x10⁻⁷ % (w/v) CuSO₄; 1,25x10⁻⁶ % (w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄; [+ 0,8 % (w/v) Agar für Agarplatten], RIPPKA & HERDMAN, 1992) angezogen.

Die Anzucht von Hefezellen erfolgte bei 30°C in Voll- oder Minimal-Medium. Das YPD-(Voll)-Medium bestand aus 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton; 2 % (w/v) Glukose; [+ 2 % (w/v) Agar für Agarplatten]. Das YNB-(Minimal)-Medium setzte sich aus 0,67 % (w/v) „Yeast Nitrogen Base“ ohne Aminosäuren mit NH₃SO₄, Drop Out Medium (10x: 0,1 % (w/v) Adenin; 0,1 % (w/v) Arginin; 0,1 % (w/v) Cystein; 0,1 % (w/v) Leucin; 0,1 % (w/v) Lysin; 0,1 % (w/v) Threonin; 0,1 % (w/v) Tryptophan; 0,05 % (w/v) Asparagin; 0,05 % (w/v) Histidin; 0,05 % (w/v) Isoleucin; 0,05 % (w/v) Methionin; 0,05 % (w/v) Phenylalanin; 0,05 % (w/v) Prolin; 0,05 % (w/v) Serin; 0,05 % (w/v) Tyrosin; 0,05 % (w/v) Valin) und den entsprechenden Zuckerlösungen (Zuckerstocklösung I: 20 % (w/v) Raffinose oder Zuckerstocklösung II: 20 % (w/v) Raffinose; 40 % (w/v) Galaktose) zusammen.

Die Medien wurden sterilfiltriert oder 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Tab. 2.3) oder Zucker zu den abgekühlten Medien wurden geeignete Selektionsbedingungen hergestellt.

2.3.5 Rekombinante DNA-Techniken

2.3.5.1 Herstellung kompetenter Zellen sowie deren Transformation

E. coli-Zellen wurden nach HANAHAN (1983) mit rubidiumchloridhaltigen Lösungen kompetent gemacht und durch Hitzeschock transformiert. Als alternative Transformationsmethode wurde die Elektroporation genutzt, die auch für *Synechocystis*-Zellen angewendet wurde (WEAVER, 1995). Agrobakterien wurden durch Hitzeschock nach HÖFGEN & WILLMITZER (1988) transformiert. Zur Herstellung von kompetenten Hefezellen wurde die Lithiumacetat-Methode von DOHMEN et al. (1991) angewendet.

2.3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach SAMBROOK et al. (2001) im horizontalen Gelapparaturen aufgetrennt. Als Größenstandard diente der Lambda DNA/*Pst*I Marker oder der 1kb Marker (MBI Fermentas, St.Leon-Rot).

2.3.5.3 *In-vitro*-Manipulation von DNA

Das Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen, die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase sowie Auffüllreaktionen mit DNA-Polymerase I erfolgten nach Angaben der Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot bzw. NEB, Frankfurt/Main und Invitrogen, Karlsruhe) oder nach SAMBROOK et al. (2001). Bei Insertion von DNA-Fragmenten wurde der Plasmidvektor mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (SAP = Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern (ULRICH et al., 1977).

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde nach den Methoden der „QIAEX II Extraction from Agarose Gels“ und „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.5.4 Plasmidpräparationen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde aus Übernachtskulturen mit Hilfe des „QIAprep Spin Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.5.5 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem T3-Thermocycler sowie in einem T-Gradient-Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten DNA-Polymerasen *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe), *Pfu*-Polymerase (Promega, Mannheim) und *Ex-Taq*-Polymerase (Takara, Apem) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in die PCR-Reaktion eingesetzt.

2.3.6 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen konnte bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer bestimmt werden.

2.3.7 DNA-Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierungen wurden entweder von der Firma SeqLab (Göttingen) oder in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

2.3.8 Klonierungen

Der *AtMSBP1* wurde als EST-Klon (ID 8B8T74, Gen ID TO4824, EMBL Acc. Nr. Z50752) erhalten. Für weitere Klonierungen wurde der *AtMSBP1* mit den Primern Syn 9 und ML 50-A (Tab. 2.4) in den Vektor pBSK (Stratagene, Heidelberg) umklont (pEM 292). Um die cDNAs von *AtMSBP2*, *AtMSBP3* und *OsMSBP1* zu amplifizieren wurden Primer entsprechend der durch die jeweiligen Genomprojekte zu Verfügung stehenden Sequenzen ausgewählt. Die PCR-Reaktionen wurden mit *Pfu*-DNA-Polymerase, die sich durch „proof-reading“-Aktivität auszeichnet, auf dem ersten Strang cDNA der jeweiligen Organismen durchgeführt. *AtMSBP2* wurde mit den Primern ML 56 und ML 57 und *AtMSBP3* mit den Primern ML 58 und ML 59 mittels PCR auf dem ersten Strang cDNA aus *A. thaliana* amplifiziert und über *EcoRV* in pBSK kloniert (Tab. 2.2, pEM 232 und pEM 246; Tab. 2.4).

Ebenfalls wurden die cDNAs für *AtCAB*, *AtNR* und *AtPlastocyanin* über genspezifische Primer amplifiziert (LhbB1-1 und LhbB1-2, NR1-1 und NR1-2, sowie Plast-1 und Plast-2) und in *EcoRV* geschnittenen pBSK kloniert (Tab. 2.2, pEM 624, Tab. 2.4).

Die cDNA für den *SsGTR* wurde mit den homologen Primern ML 31 und ML 32 auf genomischer DNA aus *Synechocystis 6803* amplifiziert und in *EcoRV* geschnittenen pBSK kloniert (pEM 114).

Die DNA für *AtMSBP1* wurde in die entsprechend geschnittenen Hefevektoren NEV-E (SAUER & STOLZ, 1994) und pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und für Expressionsstudien verwendet (Tab. 2.2, pEM 395, pEM 146; Kap. 2.3.15).

Aus *AtMSBP1* und *SsGTR* wurden durch PCR verschiedene Bereiche amplifiziert und wieder zu verschiedenen Fusionskonstrukten zusammengefügt (Tab. 2.2, V (pEM 592), X (pEM 468, pEM 587) und XVI (pEM 499; pEM 580, pEM 612) (Abb. 7.7.1-4). Für die Rekombination der Fusionsproteine zwischen *SsGTR* und *AtMSBP1* ins *Synechocystis*-Genom wurden jeweils 400 bp vor dem Startcodon und hinter dem Stopcodon des *SsGTR* mit den Primern Syn 1 und Syn 7A bzw. Syn 8A und Syn 2 amplifiziert (Tab. 2.4).

AtMSBP1 und *OSMSBP1* wurden über *NcoI* und *XhoI* in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor pET16b kloniert (Tab. 2.2, pEM 175 und pEM 433). Die erforderlichen Schnittstellen wurden mit spezifischen Primern mittels PCR-Reaktionen eingeführt (ML 49 und ML 50, ML 54 und ML 55, Tab. 2.4). Diese Konstrukte wurden für eine *In-vitro*-Translation mit ³⁵S-Methionin im Reticulocyten-Lysat-System genutzt (Promega, Mannheim, Kap. 2.4.5) und dann für Importversuche mit isolierten Chloroplasten eingesetzt (Kap. 2.4.9).

Um den ganzen *AtMSBP1* in den GFP2-Vektor (KOST et al., 1998) zu klonieren, wurden bei der Amplifizierung eine *XbaI* Schnittstelle vor dem Startcodon mit dem Primer ML 44 und eine *XhoI* Schnittstelle unter Beibehaltung des Leserasters bei gleichzeitiger Entfernung des Stopcodons mit dem Primer ML 45 eingefügt (Tab. 2.4) und in den entsprechend geschnittenen GFP2-Vektor ligiert (Tab. 2.2, pEM 152). Ebenfalls wurde durch PCR der zentrale Loop-Bereich des *AtMSBP1* amplifiziert und über *XbaI* und *XhoI* in GFP2 kloniert (GFP L1 und GFP L2, Tab. 2.2; Tab. 2.4, pEM 575). Am N-Terminus des Loops wurde ein Startcodon eingefügt und auch bei diesem Konstrukten das Stopcodon entfernt und das Leseraster beibehalten. Diese Konstrukte wurden für die transiente Expression in Tabakprotoplasten verwendet (Kap. 2.4.10).

Für die Herstellung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen wurde der Loop des *AtMSBP1* mit oder ohne vorgeschaltete Chloroplasten-Leadersequenz der kleinen Untereinheit der RubisCO (*pSSU*) in den Klonierungsvektor pA35S und von dort in den binären Pflanzenvektor PDE1001 kloniert (Tab. 2.4, GFP L1 und ML 34, pSSU1 und pSSU2; Tab. 2.2, pEM 596 und pEM 598, Abb. 7.4), der zur Transformation von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen genutzt wurde.

Zur Herstellung von *AtMSBP3*-„RNAi“-Pflanzen wurde die cDNA der vorderen Hälfte des *AtMSBP3*-Loops in „sense“- und „antisense“-Orientierung erst in den Vektor pHannibal (GLEAVE et al., 1992) und dann von dort in den binären Pflanzenvektor pART (GLEAVE et al., 1992) kloniert (RNAi3Aas1, RNAi3Bas2, RNAi3As1 und RNAi3As2, Tab. 2.4; Tab. 2.2, pEM 600, Abb. 7.5). Dieser wurde in *Arabidopsis*-Pflanzen mittels *Agrobacterium*-Transformation eingebracht zur Herstellung von „RNAi“-Pflanzen für den *AtMSBP3*.

Für GUS-Promotorstudien wurde durch PCR mit entsprechenden Primern die DNA des Promotors des *AtMSBP3* amplifiziert (MSBP3_GUS-for und MSBP3_GUS_rev, Tab. 2.4) und in den Vektor pGEM_{T-Easy} kloniert. Die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *PvuII* ausgeschnitten und in den mit *Sall* und *SmaI* geschnittenen binären Pflanzenvektor pGPTV (BECKER et al., 1992) kloniert (Tab. 2.2, pEM 627, Abb. 7.6). Dieser Vektor wurde in *Arabidopsis*-Pflanzen mittels *Agrobacterium*-Transformation eingebracht.

Die erhaltenen Konstrukte wurden mittels Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft. Die Klonierungen sind im Anhang dargestellt.

2.3.9 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus Pflanzenmaterial nach einem Protokoll des Purescript® RNA Extraction Kit (Gentra Systems, Minnesota, USA) isoliert (US-Patent 5..973.137).

Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurde durch photometrische Messung der Absorption bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt (SAMBROOK et al., 2001).

2.3.10 Northern-Blot-Analyse

Um die vorher hitzedenaturierte RNA elektrophoretisch aufzutrennen, wurden 1,2 % formaldehydhaltige Agarosegele verwendet. Eine Beladungskontrolle fand durch zugefügtes Ethidiumbromid statt. Nach dem Blotting auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Nytran-Plus, Schleicher & Schuell, Germany) mittels Kapillartransfer in 10fach konzentriertem Transferpuffermedium (0,15 M Natriumcitrat; 1,5 M NaCl; pH 7,0) wurde die RNA mit Hilfe eines UV-Ofens (Spectronics Corporation) durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (120 mJ × cm²) kovalent auf der Membran fixiert (SAMBROOK et al., 2001).

2.3.11 Poly-(A⁺)-mRNA-Isolierung

Die Isolierung von Poly-(A⁺)-mRNA (messenger RNA oder mRNA) erfolgte mit dem „µMACS mRNA Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) entsprechend den Angaben der Herstellers.

2.3.12 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)

Aus isolierter mRNA wurde komplementäre DNA (cDNA, complementary oder copy DNA) mit der SUPERSRIPT™II RNaseI⁻ Reverse Transkriptase (Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers hergestellt.

2.3.13 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA wurde nach einer leicht modifizierten Form der Methode von DELLAPORTA et al. (1983) durchgeführt.

Für die Untersuchung der „knock out“-Mutanten wurde genomische DNA mit der „Simple DNA Prep“-Methode isoliert. Die erhaltene genomische DNA wurde als Template für PCR-Reaktionen verwendet.

Um aus der Blaualge *Synechocystis 6803* genomische DNA zu isolieren, wurde das „ELU-Quick DNA Purification Kit“ (Schleicher & Schuell, Dassel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.14 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden mit dem „Ready-To-Go DNA Labelling Beads (dCTP)“-Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol; NEN DuPont, Bad Homburg) als radioaktiv markiertem Nukleotid gemäss den Angaben des Herstellers hergestellt.

2.3.15 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Membranen mit der zu untersuchenden fixierten RNA bzw. DNA wurden zunächst zwei Stunden bei 65°C mit Hybridisierungspuffermedium (CHURCH et al., 1984) vorhybridisiert um unbesetzte Membranbindungsstellen abzusättigen. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden für 10 min bei 95°C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und in 10 ml Hybridisierungspuffer zu dem Blot gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C für mindestens 20 Stunden im Hybridisierungsofen (OV1, Biometra, Göttingen). Nach der Hybridisierung wurden die Membranen um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen 2 mal 15 min bei 65°C mit Waschpuffermedium A (40 mM NaHPO₄; pH 7,2; 1 mM EDTA; 5 % (w/v) SDS) und 15 min bei RT mit Waschpuffermedium B (40 mM NaHPO₄; pH 7,2; 1 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS) gewaschen. Die Blots wurden mit Hilfe eines Phospho-Imagers (Packard, Frankfurt, Germany) visualisiert oder mit Kodak MS X-ray Filmen exponiert.

Die Blots konnten erneut mit Sonden hybridisiert werden, nachdem die gebundenen Sonden eine Stunde mit „Strip“-Puffermedium (0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0; 3 M NaCl; 10 % (w/v) SDS) entfernt wurden.

2.3.16 DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung

Für computergestützte Analysen wurden verschiedene Datenbanken genutzt (European Molecular Biology Laboratory (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/embl>), The Institute of Genomic Research (TIGR; <http://www.tigr.org>) und die National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ebenfalls wurden EST-Datenbanken (*expressed sequence tag*) eukaryotischer Organismen im Internet analysiert. Die Suche nach homologen Proteinen wurde durch die Verwendung des BLAST Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) und der TIGR Datenbank betrieben. Zur Analyse von DNA- und Aminosäure-Sequenzen wurde das Programm Clone Manager 5 (Sci Ed Central) verwendet. Alignments von Protein- und DNA-Sequenzen wurden mit dem ClustalW

Programm (THOMSON et al., 1994; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) durchgeführt. Das Programm GENEDOC konnte zur Bearbeitung der Alignments verwendet werden (NICHOLAS et al., 1997). Wurzellose Stammbäume wurden mit dem Programm PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c (FELSENSTEIN, 1993, 2002) erstellt. Mit dem Programm TREEVIEW konnten diese dargestellt werden (FELSENSTEIN, 1993; PAGE, 1996). Die Hydropathieanalysen wurden mit dem Programm ProtScale nach KYTE & DOOLITTLE (1982) im Internet erstellt (www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl).

2.3.17 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation der *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen erfolgte nach CLOUGH & BENT (1997) mit der „Dip“-Methode.

2.3.18 Untersuchungen zu den „knock out“-Mutanten

Die *Arabidopsis*-„knock out“-Mutanten *AtMSBP1::T-DNA* (Garlic_296_E01.b.1a.Lb3Fb) und *AtMSBP2::T-DNA* (Garlic_124_H03.b.1a.Lb3Fa) aus dem SAIL Projekt (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library, SESSIONS et al., 2002) wurden uns zur Verfügung gestellt durch das Torrey Mesa Research Institute (TMRI, San Diego, CA, USA).

Die Linien wurden durch PCR- und Northern-Blot-Analysen auf ihre Homozygotie untersucht. Durch die Kombination genspezifischer und T-DNA-spezifischer Primer (Tab. 2.4) konnten die entsprechenden PCR-Produkte amplifiziert werden. Mittels Northern-Blot-Analysen wurde der mRNA-Gehalt in den „knock out“-Pflanzen für die *AtMSBP1*- und *AtMSBP2*-Gene überprüft.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinquantifizierung

Der Proteingehalt von wässrigen Lösungen ohne Detergenzien wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer bestimmt. Als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA, 1-10 µg).

Die Konzentration detergenzhaltiger Proteinlösungen konnte durch Bichinonsäure/Kupfer-II-Sulfat-Lösung (Sigma, Deisenhofen) nach Pierce bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt werden.

2.4.2 Protein-Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine können durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt werden. Die TCA-Konzentration der wässrigen Proteinlösung wurde auf 20 % eingestellt, 20 min auf Eis inkubiert, ausgefalltes Protein abzentrifugiert (14.000 g, 10 min, 4°C) und zweimal mit eiskaltem Aceton (p.A.) gewaschen. Der Protein-Niederschlag wurde getrocknet und konnte z.B. in einfach konzentriertem SDS-Gelladepuffermedium aufgenommen werden.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, abgekürzt SDS-PAGE (engl. Natrium: „Sodium“), nach LAEMMLI (1970) wurde zur Auftrennung von Proteinen genutzt. Dazu wurden vertikale Minigele (8 x 8 x 0,1 cm) mit einem 10-15 %igen Trenngel und einem 3 %igen Sammelgel verwendet. Die Proben wurden mit Probenpuffermedium nach JOYARD et al. (1982) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Trennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-120 Volt. Als Molekulargewichtsstandard diente ein vorgefärbter Marker der Firma NEB (Frankfurt/Main). Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1 % (w/v) in 40 % Ethanol und 9 % Essigsäure) angefärbt und das Gel danach in einer Lösung aus 40 % Ethanol und 7 % Essigsäure entfärbt.

2.4.4 „Western-Blotting“ und „Immunoprinting“

Die in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine (Kap. 2.3.3) konnten auf eine Nitrozellulosemembran (PALL Life Science, Dreieich) mit einem Transferpuffermedium (192 mM Glycin, 0,1 % SDS und 20 % Methanol) übertragen werden mit Hilfe des „Tank-Blotting“-Verfahrens der Firma Peqlab (Erlangen).

Die Membran stand nun für Immunodetektionen zur Verfügung. Für diese Methode wurde das „BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)“-Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die anschließende Autoradiografie erfolgte in einer lichtdichten Expositionskassette mit einem X-OMAT-Film (Kodak (Rochester, USA)).

2.4.5 *In-vitro*-Translation

Die *In-vitro*-Translation wurde entweder mit dem *In-vitro*-Translationssystem „TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System“ oder dem „TNT[®] Coupled Wheat Germ Extrakt System“ der Firma Promega (Heidelberg) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das neusynthetisierte Protein wurde durch den Einbau von [³⁵S]-Methionin (NEN DuPont, Bad Homburg) radioaktiv markiert.

In das *In-vitro*-Translationssystem wurde das Plasmid pET16b (Novagen, Heidelberg) mit der cDNA für den *AtMSBP1* (pEM 175) und für den *OsMSBP1* (pEM 433) eingesetzt, als Kontrolle diente die cDNA des *AtNTT1* (pET 7, THOM, 1996) in pET16b ohne His-Tag.

Die Proteine wurden einer SDS-Gelelektrophorese (Kap. 2.4.3) unterzogen, das Gel anschließend Coomassie-Blue gefärbt und in einer Trocknungsapparatur (Biometra, Göttingen) getrocknet. Das Autoradiogramm entstand durch das Auflegen eines β-max-Film (Amersham Buchler, Braunschweig) auf das Gel in einer lichtdichten Expositionskassette für einige Tage und die anschließende Entwicklung des Films.

2.4.6 Isolierung von Chloroplasten

Chloroplasten wurden aus *Arabidopsis*-, Spinat- und Erbsenblättern mit verschiedenen Methoden isoliert (CLINE et al., 1981; FLÜGGE et al., 1989; WAEGEMANN & SOLL, 1991; BÖLTER et al., 1998).

2.4.7 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Chloroplasten

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte in 80 %igem EtOH bei einer Wellenlänge von 652 nm im Photometer. Hierzu wurde 1-10 µl der Plastidensuspension in 80 %iges EtOH eingesetzt und 5 min lang bei 20000 g vor der photometrischen Bestimmung zentrifugiert.

2.4.8 Isolierung von Envelopemembranen aus Chloroplasten

Innere und äußere Chloroplastenvelopemembranen wurden aus reinen *Arabidopsis*-Chloroplasten nach der Methode von KEEGSTRAS & YOUSIF (1986) gewonnen. Sie wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 90.000 g für eine Stunde in der Ultrazentrifuge konzentriert.

Die erhaltenen Membranfraktionen wurden elektrophoretisch mit SDS-Gelen aufgetrennt. Diese Gele wurden mit Silber Nitrat nach BLUM et al. (1987) gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran (PALL Life Science, Dreieich) geblottet. Die Immunodetektionen erfolgte mit einem Antikörper gegen den großen hydrophilen Loop des AtMSBP1 (TRENTMANN, 1998).

2.4.9 Proteinimport in Chloroplasten

Mit Hilfe von Importstudien an isolierten Mesophyll-Chloroplasten sollte untersucht werden, ob die *In-vitro*-translatierten AtMSBP1- und OsMSBP1-Proteine in Plastiden importiert werden. Dazu wurde sowohl die Methode von WEBER et al. (1995) als auch die Methode von WAEGEMANN & SOLL (1995) angewendet.

In die Ansätze wurden Spinat- oder Erbsen-Chloroplasten mit einem Chlorophyllgehalt von 200 µg/ml Importmedium eingesetzt, je 10 µl des *In-vitro*-Translationsansatzes wurde hinzugegeben. Die Versuche wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, unter anderem im Licht mit ATP-Zugabe oder im Dunkeln ohne ATP-Zugabe. Nach einer Inkubation von 20 min wurden zum Abstoppen der Aufnahmereaktion 50 µg/ml Thermolysin und 1 mM CaCl₂ in die Ansätze gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle nicht in die Plastiden aufgenommenen Proteine werden durch das Thermolysin.

Die Chloroplasten wurden nach dem Versuch direkt in SDS-Gelladepuffer aufgenommen oder nach der Methode von FLÜGGE et al. (1989) in Hüllmembranen, Stroma und Thylakoidmembranen fraktioniert. Die erhaltenen Plastidenfraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 2.4.3) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Färben der Proteinbanden wurde das Gel getrocknet und zur Herstellung eines Autoradiogramms mit einem β-max-Film (Amersham Buchler, Braunschweig) exponiert.

2.4.10 Isolierung und Transformation von Tabakprotoplasten

Die Blätter 3-4 Wochen alter Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* Varietät W38) aus Sterilkultur (Kap. 2.2.2) wurden bis zur Mittelrippe vorsichtig eingeschnitten und dann in 12 ml Enzym-Lösung (0.45 M Mannitol, 10 mM CaCl₂, 1 % Zellulase 'Onozuka' R-10 (SERVA, Heidelberg, Germany), und 0.25 % Macerozyme R-10 (SERVA, Heidelberg, Germany) für 4-5 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die freiwerdenden Protoplasten wurden durch zwei sterile Netze (Maschenweite 125 und 63 µm) filtriert, gewaschen und 0.5×10^6 Protoplasten mit bis zu 30 µg Spin-Prep-DNA (Qiagen, Hilden) mit der PEG-Methode (DAMM et al., 1989) transformiert. Die transformierten Protoplasten wurden in „Gamborg-B5“-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande) (pH 5.7, 0.45 M Glukose, 0.1mg l^{-1} 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, 1mg l^{-1} Naphtylessigsäure und 0.2mg l^{-1} Benzylamino Purine (SIGMA, Deisenhofen)) inkubiert.

Nach ein bis zwei Tagen im Dunkeln konnten die Protoplasten auf die grüne GFP-Fluoreszenz im UV-Licht überprüft werden (OLYMPUS IX70 mit einem NIBA Filter (Wellenlänge 470 - 490nm; Filter 515 - 550nm)).

2.4.11 Inkubationsversuche mit *Arabidopsis*-Blattscheibchen

Um den Einfluss verschiedener Zucker auf die Expression unterschiedlicher zuckersensitiver Gene zu untersuchen, wurden Inkubationsversuche durchgeführt mit 3 Stunden nach Beginn der Belichtung ausgestochenen Blattscheiben (Durchmesser 0,7 cm, ohne Mittelrippe) aus den „Source“-Blättern von *Arabidopsis*-Pflanzen (Anzucht auf Erde). Diese wurden mit der Blattunterseite in je 30 ml Wasser oder Zuckerlösungen inkubiert (NEUHAUS & STITT, 1989). Es wurden Konzentrationsreihen mit bis zu 250 mM Glukose, sowie Versuche mit Saccharose, Glukose, Fruktose und Sorbitol in einer Konzentration von 100 mM durchgeführt. Nach 24 Stunden im Dunkeln unter leichtem Schütteln (30 rpm) wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren, ebenso wurden 3 Stunden nach Beginn der Belichtung Proben der Blätter direkt zur Kontrolle geerntet (0-Stunden-Wert). Aus den Proben wurde Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.3.9), Northern-Blots erstellt (Kap. 2.3.10) und mit Sonden gegen die cDNAs der *CAB* (*Chlorophyll_{a/b} Bindeprotein*), der *NR* (*Nitratreduktase*) und des *PC* (*Plastocyanin*) aus *Arabidopsis* hybridisiert.

2.4.12 Metabolitenbestimmung

Für die Bestimmung verschiedener Metabolite wurden die Reaktionen wie bei NEUHAUS (1990) bzw. von PASSONEAU & LOWRY (1993) beschrieben durchgeführt. Es wurden die Glukose-, Fruktose-, Saccharose- und Stärkegehalte aus *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen und Mutanten bestimmt.

2.4.13 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Proteinen wurde das bakterielle Expressionssystem mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS und dem pET16b-Plasmidvektor (Novagen, Heidelberg) genutzt (STUDIER et al., 1990). Die heterologe Expression mit dem pET16b Vektor wurde entsprechend nach dem „pET-Expressions-System“-Protokoll des Herstellers Novagen durchgeführt. Diese Methode wurde zur Überexpression des A α MSBP1-Loops (pOT5, TRENTMANN, 1998) genutzt.

2.4.14 Anreicherung von Proteinen mit Histidin-Tag mit Hilfe der Metallchelataffinitätschromatografie

Durch pET-Plasmidvektoren (Novagen, Heidelberg) kann an das heterolog zu exprimierende Protein durch mehrere Histidin-Reste erweitert werden. Dieser „His-Tag“ kann durch die Bindung an zweiwertige Kationen (z.B. Nickel-Ionen) zur spezifischen Anreicherung mit Hilfe einer Säulenchromatografie genutzt werden. Die Säulenchromatografie-Läufe wurden anhand des „pET-Expression-System“-Protokolls nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Freiburg) mit dem Säulenmaterial Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Waschpuffermedium und das Elutionspuffermedium enthielt unterschiedliche Imidazolkonzentrationen.

2.4.15 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die heterologe Expression des A α MSBP1 in Hefen wurde unter anderem der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der eine Uracil-Auxotrophie aufweist, sowie das Hefepiasmid pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe), auf welchem das Gen für Uracil-Synthese (*ura3*) lokalisiert ist. Die Expression des Plamides pEM 146 (A α MSBP1 in pYES2, Tab. 2.2) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Die Komplementation der Uracilauxotrophie wurde zur Selektion genutzt. Die Expression des heterolog zu exprimierenden Gens erfolgt über die Induktion mittels eines Galaktose-Promotors in pYES2. Nach Induktion der Hefezellen wurden diese geerntet und das heterolog exprimierte Protein nach der Methode von WEBER et al. (1999) mittels Metallchelataffinitätschromatographie angereichert. Parallel wurden die Membranfraktionen aufgereinigt.

Darüber hinaus wurde in Kooperation mit Prof. Norbert Sauer (Universität Erlangen) der von ihm freundlicher Weise zur Verfügung gestellte Hefevektor NEV-E zur Expression des A α MSBP1 verwendet (pEM 395).

3 Ergebnisse

Zuckertransporter spielen in der Pflanze eine wichtige Rolle. Sie übernehmen wichtige Funktionen bei der Verteilung der Zucker, greifen aber auch regulatorisch in den Zuckerhaushalt ein. Die Monosaccharidtransporter sind stark konserviert und sowohl in Plasmamembranen, als auch in den Membranen der Zellorganellen lokalisiert.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung eines neuartigen Mitgliedes der Monosaccharidtransporterfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Das MSBP-Protein (Monosaccharid Binding Protein) weist sowohl strukturelle, als auch funktionelle Besonderheiten im Vergleich zu anderen Zuckertransportern aus *Arabidopsis thaliana* auf. Diese werden im folgenden Ergebnissteil dargestellt.

3.1 Sequenzanalysen mit dem AtMSBP1

Der AtMSBP1 wurde unter dem Namen AZT (Arabidopsis Zuckertransporter) erstmals von TJADEN (1996) und TRENTMANN (1998) beschrieben (Klon ID 8B8T74, EMBL Acc. No. Z50752; *Arabidopsis*-Genom-Projekt, NEWMANN et al., 1994).

Die cDNA des *AtMSBP1* ist 2202 Basenpaare (bp) lang und kodiert 734 Aminosäuren (AS) mit einer errechneten Molekularmasse von 80,7 kDa. Der AtMSBP1 konnte durch Sequenzvergleiche in die große Familie der Monosaccharidtransporter eingeordnet werden. Das Protein besteht wie andere bekannte Monosaccharidtransporter aus insgesamt 12 potentiellen transmembranen Helices, die zwischen Helix 6 und 7 durch eine ca. 330 AS lange hydrophile Region getrennt werden („Loop“, AS 182 – 512). Dieser Loop ist 4 bis 5 mal so lang wie der Loop bei anderen bisher bekannten Mitgliedern der Familie der Monosaccharidtransporter (HENDERSON, 1991; MUECKLER, 1993; WEBER et al., 2000). Dies wird besonders deutlich in dem in Abbildung 3.1 dargestellten Alignment des AtMSBP1 mit typischen Vertretern der prokaryotischen Monosaccharidtransporter (*SsGTR*; SCHMETTERER, 1990), der pflanzlichen Monosaccharidtransporter (*AtSTP1*, *CkHUP1*, *AtpGlcT*; SAUER et al., 1990b; SAUER & TANNER, 1989; WEBER et al., 2000) und der pflanzlichen Disaccharidtransporter (*AtSUC1*; SAUER & STOLZ, 1994). Abbildung 3.2 zeigt ein vereinfachtes Modell des AtMSBP1 im Vergleich mit anderen pflanzlichen Zuckertransportern.

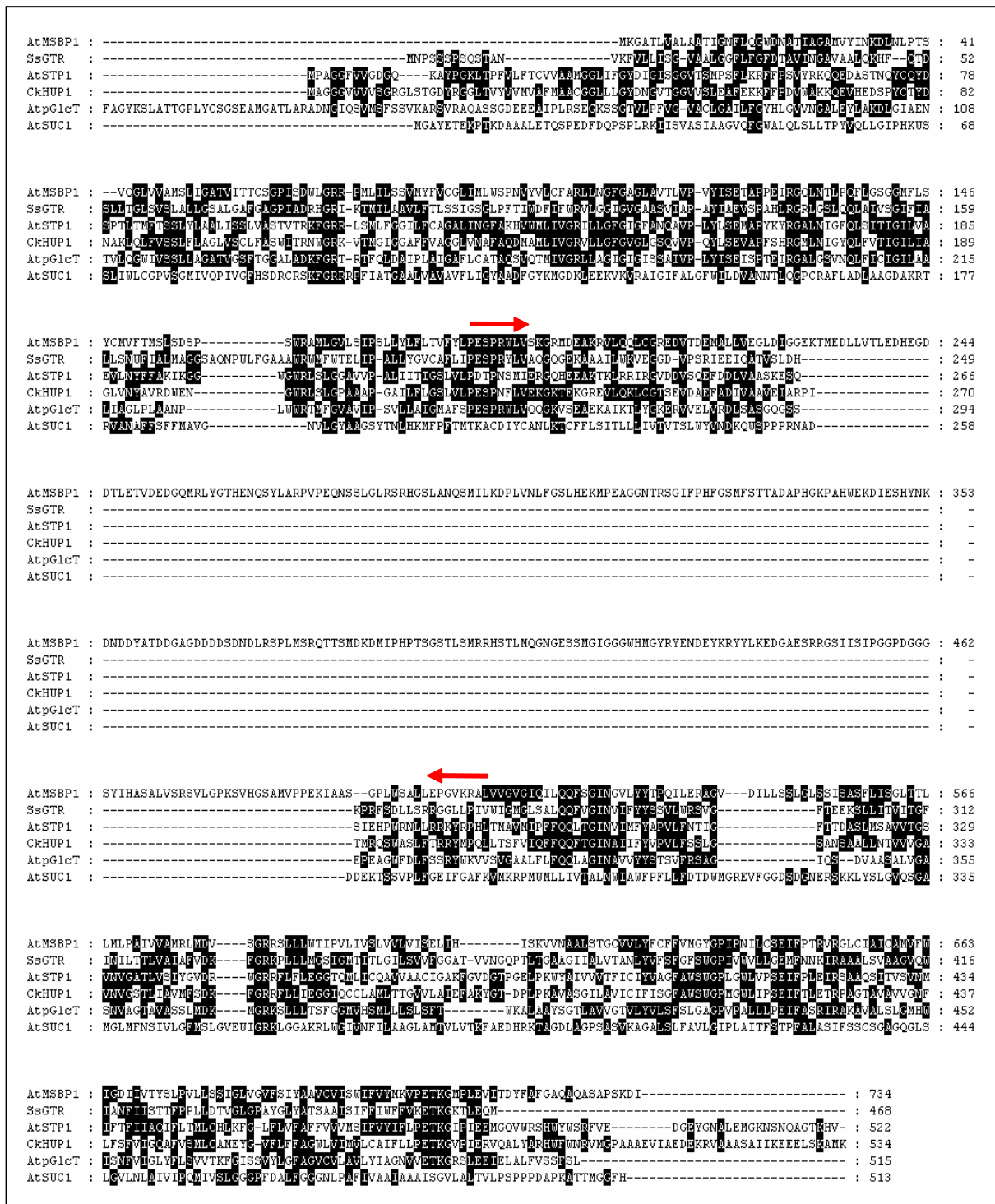


Abbildung 3.1: Alignment des AtMSBP1 mit verschiedenen Zuckertransportern. *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Ss*, *Synechocystis spec. (PCC 6803)*; *Ck*, *Chlorella kessleri*. AtMSBP1, Monosaccharid Binding Protein; SsGTR, AtSTP1, CkHUP1, Monosaccharidtransporter; AtpGlcT, plastidärer Glukosetranslokator; AtSUC1, Saccharosetransporter. Die Nummern geben die Positionen der Aminosäuren an. Zur Verdeutlichung der Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen werden die artifizell entstehenden Lücken durch Striche dargestellt. Die roten Pfeile zeigen den Beginn und das Ende des mittigen hydrophilen Loops.

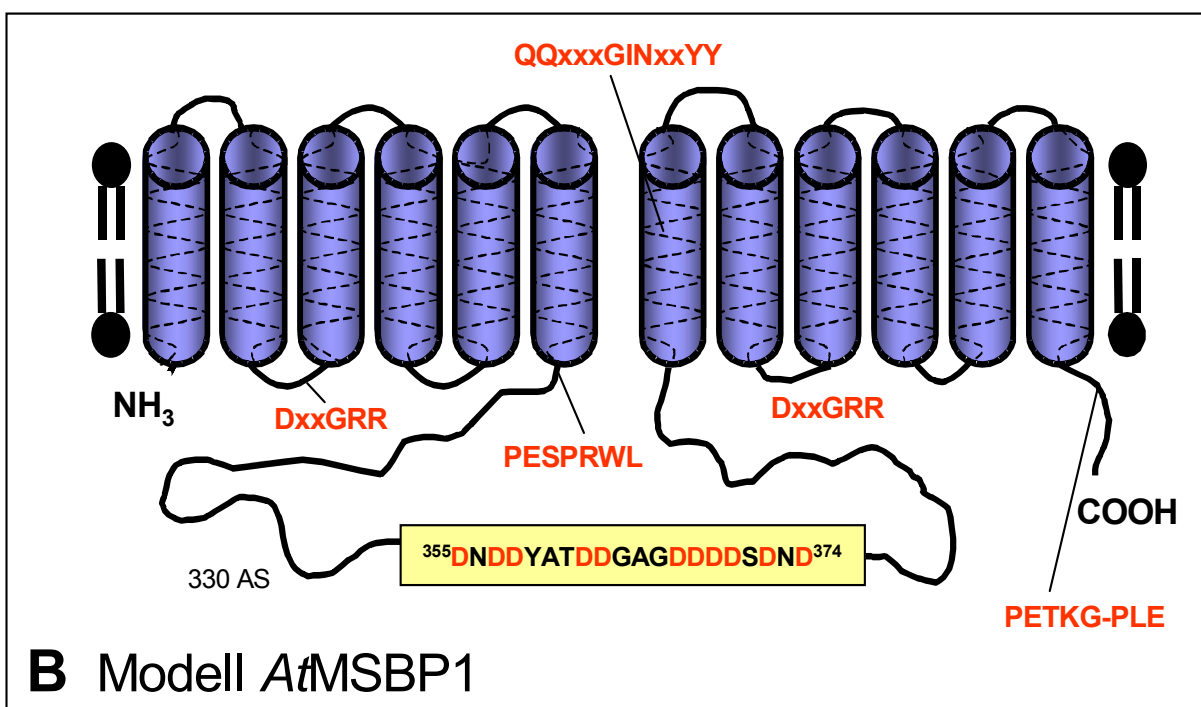
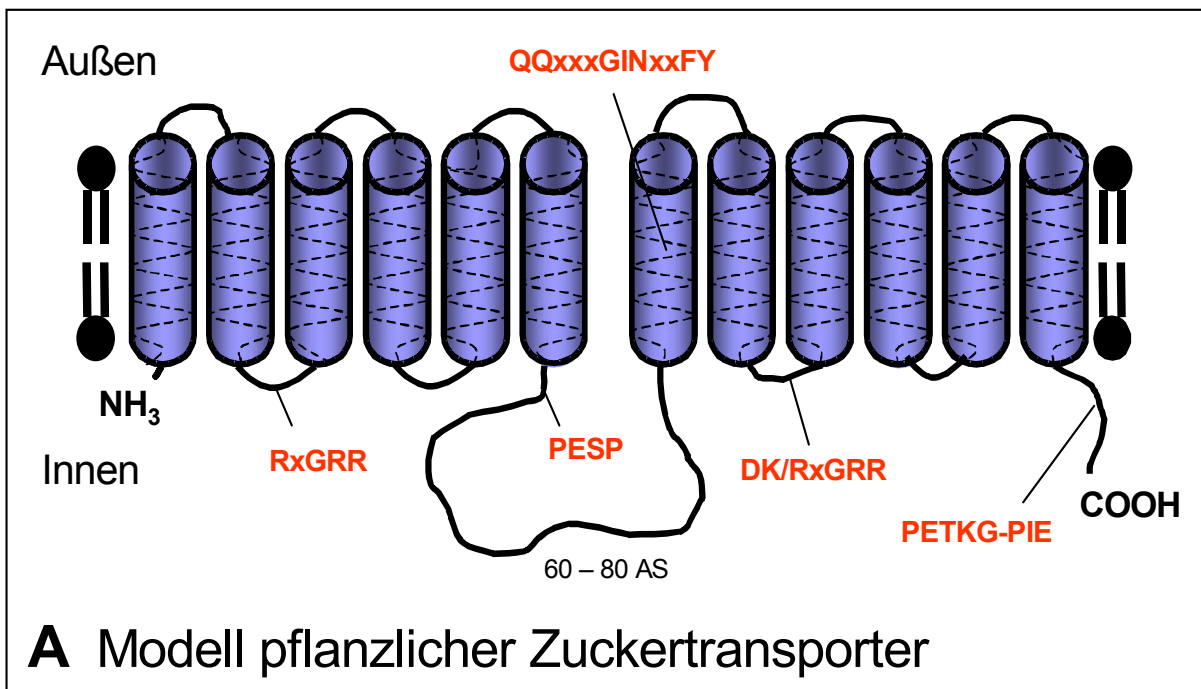


Abbildung 3.2: Modell des AtMSBP1 im Vergleich mit pflanzlichen Zuckertransportern. A, Model eines klassischen pflanzlichen Monosaccharidtransporters; B, Model des AtMSBP1-Proteins. Die hydrophoben Transmembranhelices sind als blaue Tonnen dargestellt. Konservierte Aminosäuremotive der Zuckertransporter sind rot hervorgehoben, gelb unterlegt ist die negativ geladene aspartatreiche Region des AtMSBP1, die Nummern geben die Aminosäureposition an.

Der AtMSBP1 weist eine höhere Ähnlichkeit zu bakteriellen als zu pflanzlichen Zuckertransportern auf. So hat der AtMSBP1 29 % Ähnlichkeit zu dem Glukose/H⁺-Symporter GTR aus *Synechocystis spec. (PCC 6803)*, aber nur 26 % Ähnlichkeit zu dem Monosaccharidtransporter STP1 aus *Arabidopsis thaliana* (Tab. 3.1). Diese höhere Ähnlichkeit zu bakteriellen Zuckertransportern spiegelt sich auch in einigen konservierten Bereichen des AtMSBP1 wieder (Abb. 3.2, rot dargestellt; Tab. 3.2, TJADEN, 1996). So ähnelt das Motiv -PESPRWL- in dem hydrophilen Loop zwischen den transmembranen Helices 6 und 7 des AtMSBP1 (AS 184 – 190) mehr dem bakteriellen Motiv -PESPR^Y_{WL}- als dem eukaryotischen Motiv -PESP- (HENDERSON, 1991; MUECKLER, 1993). Dies kann auch bei anderen konservierten Motiven beobachtet werden (Tab. 3.2). Der AtMSBP1 ist darüber hinaus zum plastidären Glukosetranslokator aus *Arabidopsis* (AtpGlcT) ähnlicher als zu den plasmamembranlokalisierten STPs aus *Arabidopsis* (26 %, Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren der Sequenz des AtMSBP1 im Vergleich mit anderen bekannten Zuckertransportern. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der Programme ClustalW und GENEDOC durchgeführt. AtMSBP1, Monosaccharid Binding Protein; SsGTR, AtSTP1, CkHUP1, Monosaccharidtransporter; AtpGlcT, plastidärer Glukosetranslokator; AtSUC1, Saccharosetransporter; At, *Arabidopsis thaliana*; Ck, *Chlorella kessleri*; Ss, *Synechocystis spec. (PCC 6803)*.

Transporter	Identität in %	Ähnlichkeit in %
	AtMSBP1	AtMSBP1
SsGTR	16	29
AtSTP1	13	26
CkHUP1	13	25
AtpGlcT	16	29
AtSUC1	5	17

Tabelle 3.2: Konservierte Aminosäuresequenzen des AtMSBP1 im Vergleich mit anderen bekannten Zuckertransportern. AtMSBP1, Monosaccharid Binding Protein aus *Arabidopsis*; die Aminosäuren werden in Kurzschreibweise angegeben, x steht für eine beliebige Aminosäure, M gibt die transmembrane Helix an.

Lokalisation der konservierten Motive	AtMSBP1	prokaryotische Monosaccharid-transporter	eukaryotische pflanzliche Monosaccharid-transporter	eukaryotische pflanzliche Disaccharid-transporter
Loop zwischen M2 und M3	DxxGRR	(D)RxGR ^R /K	RxGRR	RxGRR
großer mittlerer Loop	PESPRWL	PESPR ^Y /WL	PESP	–
in M7	QQxxxGINxxYY	QQxxxGINxxYY	QQxxxGINxxFY	–
Loop zwischen M8 und M9	DxxGRR	D ^K /RxGR ^K /R	D ^K /RxGRR	xxGxx
nach M12	PETKG-PLE	PETKG-TLE	PETKG-PIE	–

Der AtMSBP1 hat eine geringere Ähnlichkeit zu dem Saccharosetransporter SUC1 aus *Arabidopsis thaliana* (16 %, Tab. 3.1), als zu den Monosaccharidtransportern (25 – 29 %, Tab. 3.1). Auch das Alignment (Abb. 3.1) und die Analyse der konservierten Motive (Tab. 3.2) zeigen, dass der AtMSBP1 zur Familie der Monosaccharidtransporter und nicht zur Saccharosetransporterfamilie gehört.

3.1.1 Sequenzanalysen zur Ermittlung weiterer Homologe zum AtMSBP1

Im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojektes konnten zwei weitere Isoformen des Monosaccharid Binding Proteins in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (AtMSBP2 und AtMSBP3). Bei AtMSBP2 und AtMSBP3 ist das offene Leseraster jeweils 2190 bp lang und kodiert 730 AS. Beide Transporter sind somit 4 AS kürzer als AtMSBP1. Des weiteren haben beide Transporter, wie der AtMSBP1, einen im Vergleich zu anderen Zuckercarriern extrem verlängerten zentralen hydrophilen Loop. Die Isoformen aus *Arabidopsis* haben eine Ähnlichkeit von 69 – 76 % (Tab. 3.3) zueinander.

In *Nicotiana tabaccum* wurde ebenfalls ein MSBP-Protein identifiziert. NtMSBP1 hat mit 83 % die höchste Ähnlichkeit zum AtMSBP2. Das uns bekannte Leseraster ist

2190 bp lang, allerdings fehlt bisher das Startcodon. Bei einem Vergleich mit den anderen MSBP-Proteinen zeigt sich, dass wahrscheinlich 8 AS fehlen, somit ergibt sich eine Länge von 738 AS (2214 bp) für *NtMSBP1* (Abb. 3.3).

In der monokotyledonen Pflanze *Oryza sativa* wurden zwei weitere Mitglieder der MSBP-Familie identifiziert (*OsMSBP1* und *OsMSBP2*). Das Leseraster für *OsMSBP1* ist 2172 bp lang und kodiert 723 AS, während das Leseraster mit 2223 bp und 740 AS bei *OsMSBP2* länger ist. Der *OsMSBP1* hat eine strukturelle Besonderheit durch eine N-terminale Verlängerung, die einer Transitsequenz für das plastidäre bzw. mitochondriale Targeting ähnelt. Diese ist 56 AS lang und zeigt sich auch in der in Abbildung 7.1 dargestellten Hydropathieanalyse. Der N-Terminus beim *AtMSBP1* ist hingegen deutlich hydrophober als bei anderen Zuckertransportern und kann als erste transmembrane Helix angesehen werden (Abb. 7.1). Dem *OsMSBP1* fehlen allerdings im Bereich des zentralen Loops Sequenzabschnitte, so dass der Loop nur 264 AS lang ist (AS 238 – 502), er ist damit aber immer noch 3 – 4 mal länger als der Loop klassischer Zuckertransporter.

Ein in der Hirse (*Shorghum bicolor*) identifiziertes MSBP-Protein (*SbMSBP1*) ist 2238 bp lang und kodiert 746 AS. Auch der *SbMSBP1* hat eine N-terminale Verlängerung, die sogar noch länger als beim *OsMSBP1* ist (Abb. 3.3), und einen entsprechend kürzeren Loop mit 248 AS (AS 284 – 582).

Aus Gerste (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) wurden zwei weitere Mitglieder der MSBP-Familie identifiziert. Diese wurden im Rahmen einer Expressionsstudie an sich entwickelnden Gerstenkörnern unter dem Namen *HvSTP1* und *HvSTP2* veröffentlicht (WESCHKE et al., 2003). Das offene Leseraster von *HvSTP1* ist 2175 bp lang und kodiert 744 AS, während das Leseraster für *HvSTP2* mit 2234 bp etwas länger ist und 755 AS kodiert.

Abbildung 3.3 zeigt ein Alignment der identifizierten MSBP-Proteine. In Tabelle 3.3 sind die Ähnlichkeiten und Identitäten der Mitglieder der MSBP-Familie zueinander dargestellt.

```

AtMSBP1 : -----MKGAVLVAL : 9
AtMSBP2 : -----MSGAVLVAL : 9
AtMSBP3 : -----MRSVVLVAL : 9
NtMSBP1 : -----Y : 1
OsMSBP1 : -----MLCLIRFYLRGYAAADLGAWKNTROQYSPSSPISLGSSVFSSSLELSTTTADGSTANAVLAA : 64
OsMSBP2 : -----MAGAVLVAL : 9
SbMSBP1 : MSMIHCKLVNQAEEDLGGATGAGQDVQVQNGGKLEEVAVLGCACHRIMAAEVSTVHQEVCKMYFFAGAAIASRLINCEAYLRTEFGFIIVKRAIIVLDEMKSTVFSAV : 109
HvSTP1 : -----MSSGAVLVAL : 10
HvSTP2 : ----- : -

```

```

AtMSBP1 : AAATGNFLOGWDNATIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 115
AtMSBP2 : AAAVGNLLOGWDNATIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 117
AtMSBP3 : AAATGNLLOGWDNATIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 117
NtMSBP1 : RIRGFRFLOGWDNATIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 107
OsMSBP1 : VASIGNLLQGDWNAIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 172
OsMSBP2 : AASIGNLLQGDWNAIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 117
SbMSBP1 : VASIGYAMLQGDWNAIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 217
HvSTP1 : AASIGNLLQGDWNAIAGAVLYIKKEFNLESMPSVEGLIVAMSLIGATITTTCSGGVADLGRPRMLILSSVYVFCGLIHLUSPNVYVLFARLNGFGAGLAVT-LV : 118
HvSTP2 : -----MRRGGWRSWRGCRGWRARRSSRLRRGWRRRRAGAGARKDLAALQAEVKSLEEELVMAAAALVFLASNVMVLPANPNVYVLLARLIDFGFGIAGLAVT-LV : 100

```



```

AtMSBP1 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVTDPMALLVEGL : 223
AtMSBP2 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 225
AtMSBP3 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 225
NtMSBP1 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 215
OsMSBP1 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 280
OsMSBP2 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 225
SbMSBP1 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 324
HvSTP1 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 226
HvSTP2 : PVIYSETAPPPIRGLNLTLPQFGSGGMLFSYCVFVMSLSDSPSRAAMLGVLSPSLVFLVTVFYLPESPRULVSKGRMDEAKRVLQQLRGR-EDVSGEMALLVEGL : 208

```

```

AtMSBP1 : DIGEKTMDLLVTLDEHGDITLTVDEDCMRLYGTHTNCSYLARVPE--C--NSSLGLSRHGSLANCSMI--LRDPLVNLFGSLHEKMPHAGGNT--RSGTFF : 323
AtMSBP2 : CIGCEFTIEEYIIGPDEEV-TDDHDIIVDDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--GSTMVLSRHGSTMRRQGS-LIDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--MRSALFF : 323
AtMSBP3 : GVGKDTSEEEYIIGPDEEV-NECCNELRRDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--SSALASRQSGMLPR--GSLMDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--SMRMLFF : 325
NtMSBP1 : AVGNDPSEEEYIIGPDEEV-NECCNELRRDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--SSALASRQSGMLPR--GSLMDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--SMRMLFF : 312
OsMSBP1 : TVDCCNYIEDVYHGHANDE-FDDQ-SISNTETIKLYGAEGLSVARPVK--C--NVVSDHSPIN--LIDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--TPERT : 365
OsMSBP2 : GVGKDTSEEEYIIGPDEEV-NECCNELRRDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--GOSALGSLGSLSRHGSMLVSC--GSLMDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--SMRSTLFF : 326
SbMSBP1 : GVC-KHHEEYIIGPDEEV-NECCNELRRDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--NVVSDHSPIN--LIDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--RMSRFF : 387
HvSTP1 : GVGKDTSEEEYIIGPDEEV-NECCNELRRDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--GOSALGSLGSLSRHGSMLVSC--GSLMDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--SMRSTLFF : 329
HvSTP2 : GVC-KHHEEYIIGPDEEV-NECCNELRRDQIKLYGAEGLSVARPVK--C--NVVSDHSPIN--LIDPLVTLFGSHEKMPHAGGNT--RMSRFF : 310

```

```

AtMSBP1 : NFGSMFSVADAPHCAPAWERKIESHYNKDNDYATD-DCAGDDDSDDNDRSPLSRCTSMHDKDMPHETSCTL--SMRHSITLDC--GNGESSMIGGGWMMG : 426
AtMSBP2 : NFGSMFSVYGV-GMG--DRHDDNDEENLV-GEEDVPSDH-C-DSDSD--NESPLSRCTSMHDKDMPHETSCTL--STRHSGVOVQAGGAGSGGGWQVA : 418
AtMSBP3 : NFGSILGMM--GRGESC--UDPERN--MED-SDQ--DEN-LNSPLSRQATSEVDEDDYHORTVGT--MH-RRSSIFMANVGETATATISIGGGWQVA : 408
NtMSBP1 : NFGSMFSVADAPHCAPAWERKIESHYNKDNDYATD-DCAGDDDSDDNDRSPLSRCTSMHDKDMPHETSCTL--SMRHSITLDC--GNGESSMIGGGWMMG : 408
OsMSBP1 : SESGM-SV--HDE--C--PKTLESCHDLDVDD--LGHPLFRGSGYTEC--IDDACVN--GGWHIA : 422
OsMSBP2 : NFGSMFSV-ARQQQA--GDUDAES--C-REGEDVSDHCC-DHDES--NCSPLSRQATSEVDEKETAAP-HGSIINGVVE--SSSMQ--GGAVSSMIGGGWQVA : 421
SbMSBP1 : VFGMSFPFPEHEHMHEDRNSDQ--CTRE--AN-S--ACEVNNCG--DRASLISQAASVEVDANTSFSE--C--SSYLRRHGSVLAQEFMASTHDD : 476
HvSTP1 : NFGSMFSV-ARQQQA--GDUDAESH--RDEEDYASDH--GADDIED--N-LNSPLSRQATSEVDEKETAAP-HGSIINGVVE--SSSMQ--GGAVSSMIGGGWQVA : 422
HvSTP2 : NFGSMFSV-ARQQQA--GDUDAESH--RDEEDYASDH--GADDIED--N-LNSPLSRQATSEVDEKETAAP-HGSIINGVVE--SSSMQ--GGAVSSMIGGGWQVA : 403

```

```

AtMSBP1 : YRY-EN-DE-----YRYEYVLEDC--AE-----SRGSIHSPGGDGG--SYTHSALVS--RSVLGFSVHG-----S-ANVPEE-KIASGFLWALL : 503
AtMSBP2 : WKUTEREGADGREGGAGRIYVLEHEGVSDG--C-----SRGSIHSPGGDGG--EADVQASALVS--OPALYSKDLLEQQLA--GPMVHPS--EAT-RGSDHDDH : 500
AtMSBP3 : WKYNDYRGVADG--RVVNGGLQRMVYIHEETANNNTNPP--SRGSIHSPFGEGDGHQVNGYVQAAALVS--CASMPHGGG--ET--AM-LP--KEVRDQGGRELLK : 504
NtMSBP1 : WKUTEREGADGREGGAGRIYVLEHEGVSDG--C-----SRGSIHSPGGDGG--EADVQASALVS--OPALYSKDLLEQQLA--GPMVHPS--EAT-RGSDHDDH : 501
OsMSBP1 : WKUTEREGADGREGGAGRIYVLEHEGVSDG--C-----SRGSIHSPGGDGG--EADVQASALVS--OPALYSKDLLEQQLA--GPMVHPS--EAT-RGSDHDDH : 493
OsMSBP2 : WKUTEREGADGREGGAGRIYVLEHEGVSDG--C-----SRGSIHSPGGDGG--EADVQASALVS--OPALYSKDLLEQQLA--GPMVHPS--EAT-RGSDHDDH : 514
SbMSBP1 : IEEEPHIGFVLP--CSAPRDM--S-RGRH--QVRL--SETAD--MK--PKRVLL : 522
HvSTP1 : WKUTEREGADGREGGAGRIYVLEHEGVSDG--C-----SRGSIHSPGGDGG--EADVQASALVS--OPALYSKDLLEQQLA--GPMVHPS--EAT-RGSDHDDH : 515
HvSTP2 : WKUTEREGADGREGGAGRIYVLEHEGVSDG--C-----SRGSIHSPGGDGG--EADVQASALVS--OPALYSKDLLEQQLA--GPMVHPS--EAT-RGSDHDDH : 496

```



```

AtMSBP1 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 611
AtMSBP2 : DPGVKRALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 609
AtMSBP3 : EPGVKRALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 605
NtMSBP1 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 610
OsMSBP1 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 601
OsMSBP2 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 622
SbMSBP1 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 630
HvSTP1 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 624
HvSTP2 : EPGVKHALVGVGIGLQIQFSGINGVLYYTPQILEAGVILLSSGLSSISASFLISGLTTLTLLMLPAHVAMRLMDVSGRRSLLWTFPLVLSVVLVLSLHIS- : 605

```

```

AtMSBP1 : KYVNAALSTGCVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 720
AtMSBP2 : IYHVALSTVSVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 717
AtMSBP3 : SIN-ALISTAVVYVFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 713
NtMSBP1 : V-ARAVSTVSVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 718
OsMSBP1 : AIFGALLSTGCVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 710
OsMSBP2 : TVHVALSTVSVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 731
SbMSBP1 : FDRALVYFH-ALVYVFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 738
HvSTP1 : VV-HAALSTVSVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 732
HvSTP2 : VV-HAALSTVSVLVYFCFFVMGCPINILCSEIFPFRVRCIAIACALVFNIGDIIVYVLPVLLSSIGLVGWFSTYAAVVCVLSUVPVYMKVPEKGMPLVITDVA : 713

```

```

AtMSBP1 : VGARQQAASPSKDI----- : 734
AtMSBP2 : VGARQQAASPSKDI----- : 729
AtMSBP3 : VGARQQAASPSKDI----- : 729
NtMSBP1 : VGARQQAASPSKDI----- : 730
OsMSBP1 : VGARQQAASPSKDI----- : 723
OsMSBP2 : VGARQQAASPSKDI----- : 740
SbMSBP1 : LSROEVVQ----- : 746
HvSTP1 : VGARQQAASPSKDI----- : 743
HvSTP2 : VGARQQAASPSKDI----- : 753

```

Abbildung 3.3: Alignment der MSBPs untereinander. Dargestellt sind nur MSBP-Proteine mit der vollständig bekannten Sequenz. MSBP, (STP), Monosaccharid Binding Protein; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*; *Sb*, *Shorghum bicolor*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*. Die Nummern geben die Positionen der Aminosäuren an. Zur Verdeutlichung der Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen werden die artifiziell entstehenden Lücken durch Striche dargestellt. Die roten Pfeile zeigen den Beginn und das Ende des mittigen hydrophilen Loops.

Tabelle 3.3: Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuresequenzen der MSBP-Proteine. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der Programme ClustalW und GENEDOC durchgeführt. Angegeben sind die Ähnlichkeiten der MSBPs zueinander, im Klammern sind die Identitäten angegeben, alle Angaben sind in Prozent. MSBP, (STP), Monosaccharid Binding Protein; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*; *Sb*, *Shorghum bicolor*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*.

	<i>At</i> MSBP2	<i>At</i> MSBP3	<i>Nt</i> MSBP1	<i>Os</i> MSBP1	<i>Os</i> MSBP2	<i>Hv</i> STP1	<i>Hv</i> STP2	<i>Sb</i> MSBP1
<i>At</i> MSBP1	76 (62)	69 (53)	74 (59)	56 (39)	74 (58)	75 (60)	61 (46)	44(29)
<i>At</i> MSBP2		73 (59)	83 (69)	61 (45)	82 (70)	82 (69)	68 (54)	46 (31)
<i>At</i> MSBP3			72 (58)	58 (39)	73 (39)	74 (59)	61 (47)	44 (29)
<i>Nt</i> MSBP1				59 (41)	81 (68)	80 (66)	68 (54)	44 (29)
<i>Os</i> MSBP1					61 (46)	62 (45)	50 (34)	45 (29)
<i>Os</i> MSBP2						95 (89)	79 (71)	47 (31)
<i>Hv</i> STP1							82 (79)	46 (31)
<i>Hv</i> STP2								38 (23)

Aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Soja (*Glycine max*), Luzerne (*Medicago truncatula*), Sonnenblume (*Helianthus annuus*), Tomate (*Lycopersicum esculentum*), Weizen (*Triticum aestivum*), Kopfsalat (*Lactuca sativa*), Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*), der Eisblume (*Mesembryanthemum crystallinum*), Mais (*Zea mays*) und Baumwolle (*Gossypium*) konnten weitere cDNA-Teilfragmente für MSBP-Proteine identifiziert werden (TIGR Datenbank, Kap. 2.3.16). Diese werden in einem Alignment im Anhang dargestellt (Kap. 7.5, Abb. 7.2). Es wurden nur solche Klone berücksichtigt, die eindeutig homologe Bereiche zum großen hydrophilen Loop aufwiesen.

Es scheint somit, dass MSBP-Typ-Proteine in allen Angiospermem vorkommen. In anderen Pflanzen konnten bisher noch keine MSBP-Proteine nachgewiesen werden (Kap. 3.1.2).

3.1.2 Suche nach homologen Proteinen zum MSBP in eukaryotischen Algen

Um weitere homologe Proteine des MSBP-Typs zu identifizieren, wurden auf dem ersten Strang cDNA aus verschiedenen eukaryotischen Algen (*Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cyanophora paradoxa*) PCR-Reaktionen mit degenerierten Primern gegen konservierte Bereiche des zentralen Loops durchgeführt (Tab. 2.4, Loop 1 - 4). Es konnten verschiedene Produkte amplifiziert und kloniert werden. Bei der Überprüfung mittels Sequenzierung konnten diese allerdings nicht den MSBP-Proteinen zugeordnet werden.

In den zur Verfügung stehenden Datenbanken eukaryotischer Algen wurde des Weiteren nach Sequenzen für MSBP-Proteine gesucht. Es konnten keine Vertreter dieses Typs gefunden werden. Auch in Datenbanken für höherer entwickelte Pflanzen konnten außer bei den Angiospermen noch keine weiteren MSBP-Typ-Proteine identifiziert werden.

Somit konnten weder durch PCR- noch durch Genomanalysen MSBP-Typ-Proteine in anderen Pflanzen außer den Angiospermen nachgewiesen werden.

3.1.3. Stammbaumanalysen

Mit Hilfe der Programme ClustalW, GENEDOC, PHYLIP und TREEVIEW wurde ein wurzelloser Distanzstammbaum erstellt (THOMSON et al., 1994; NICHOLAS et al., 1997; FELSENSTEIN, 1993, 2002; PAGE, 1996). Dieser zeigt, dass die MSBP-Typ-Proteine eine eigene Gruppe innerhalb der Zuckertransporterfamilie bilden. Der Stammbaum zeigt darüber hinaus eindeutig, dass die MSBP-Proteine eher den bakteriellen Transportern zuzuordnen sind (etwa dem Galaktosetransporter aus *E. coli* (*EcGALP*), den cyanobakteriellen Glukosetransportern aus *Synechocystis* (*SsGTR*) und *Nostoc* (*NpGTR*) und dem plastidären Glukosetranslokator (*AtpGlcT*)), als den Zuckertransportern aus den Plasmamembranen von Pflanzen, Tieren oder Hefen (Abb. 3.4). Dies bestätigt den Vergleich der konservierten Sequenzen, denn auch hier sind die MSBPs ähnlicher zu den bakteriellen als zu den pflanzlichen Transportern (Kap. 3.1, Tab. 1.2). Diese höhere Ähnlichkeit der MSBPs zu den bakteriellen Zuckertransportern deutet somit zweifelsfrei auf eine bakterielle Herkunft hin.

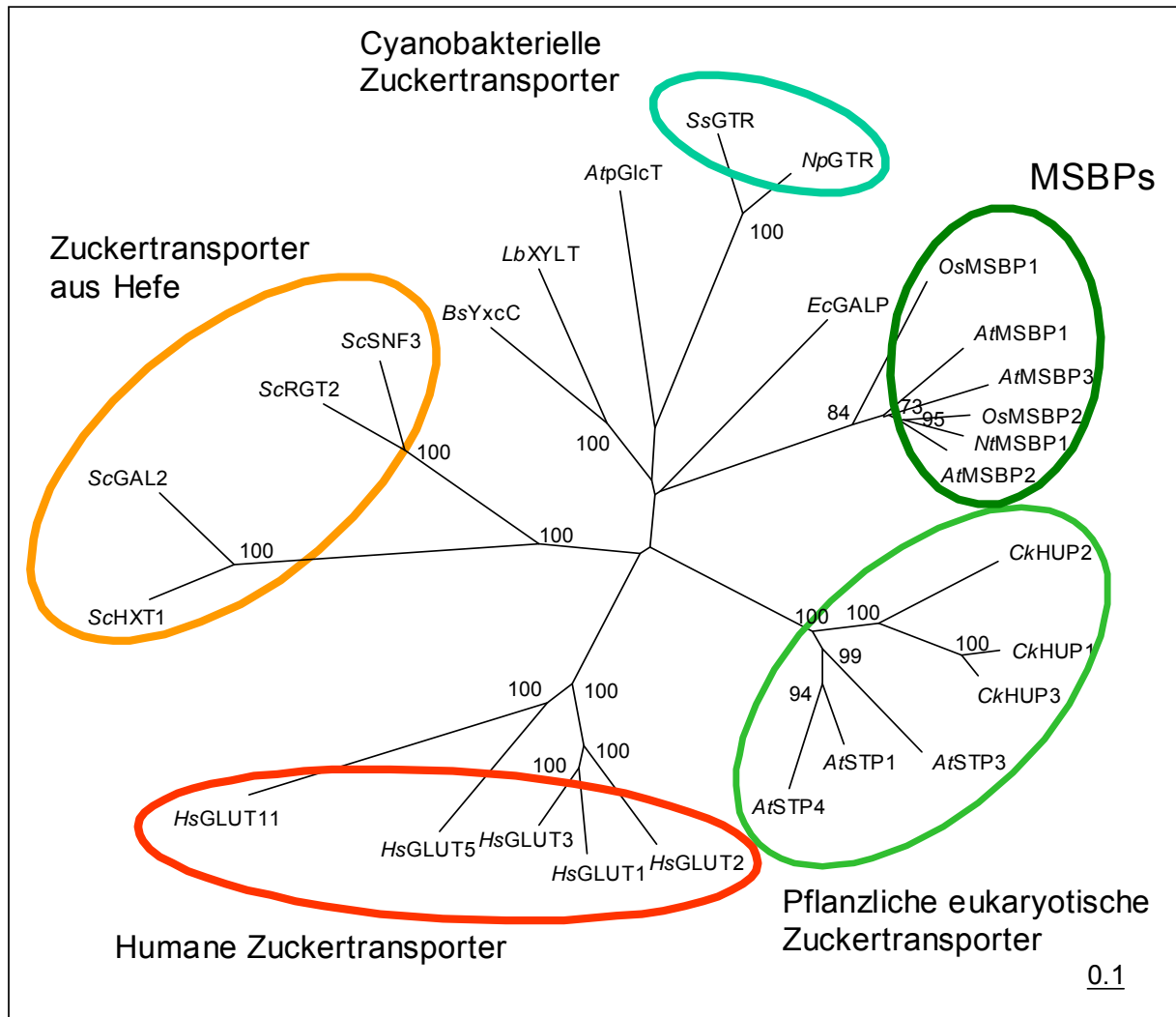


Abbildung 3.4: Wurzeloser Distanzstammbaum ausgewählter Zuckertransporter. Die Länge der Abstände zwischen den einzelnen Transportern gibt den zeitlichen Abstand der Veränderung der Aminosäuresequenzen an. Die Zahlen an den Abzweigungen geben an, in wie vielen von hundert berechneten Stammbäumen die Abzweigung auch vorhanden ist, Werte unter 40 werden dabei nicht angegeben. Die Gruppen einzelner Zuckertransporter aus verschiedenen Organismen wurden umkreist. Dargestellt sind Vertreter aus dem Menschen, aus Hefen, pflanzliche Zuckertransporter des eukaryotischen Typs, Transporter aus Cyanobakterien und MSBP-Proteine. Die ersten beiden Buchstaben geben den Organismus an (*At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Ck*, *Chlorella kessleri*; *Ec*, *Escherichia coli*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Lb*, *Lactobacillus brevis*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Np*, *Nostoc punctiforme*; *Os*, *Oryza sativa*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Ss*, *Synechocystis spec.(PCC 6803)*).

Im Anhang ist ein wurzeloser Stammbaum für die identifizierten MSBP-Proteine dargestellt (Kap. 7.6, Abb. 7.3). Hier gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass es sich größtenteils nur um Teilabschnitte bei den Sequenzen handelt, so dass

Ungenauigkeiten bei der Berechnung der Abzweigungen auftreten können. Der gezeigte Stammbaum soll nur erste Hinweise auf eine phylogenetische Entwicklung der MSBP-Proteine geben.

3.2 Heterologe Expression des *AtMSBP1* im Hefe- bzw. *Synechocystis*-System

Viele bekannte Zuckertransporter konnten in Hefen exprimiert und charakterisiert werden (BÜTTNER & SAUER, 2000). Auch für die Expression des *AtMSBP1* wurden in den Diplomarbeiten von TJADEN (1996) und TRENTMANN (1998) verschiedene Hefesysteme getestet. So wurde der *AtMSBP1*, kloniert in den Vektor 112AINE, für Aufnahmeversuche an *Saccharomyces cerevisiae* W 303 mit verschiedenen Zuckern verwendet. Bei keinem der getesteten Zucker D(+)-Glukose, D(-)-Fruktose, D(-)-Galaktose, D(+)-Mannose, D(-)-Arabinose, Saccharose, Maltose, Mannitol, Sorbitol und UDP-Glukose konnte eine Aufnahme beobachtet werden (TJADEN, 1996). In dieser Arbeit wurden weitere Hefesysteme für eine Expression des *AtMSBP1* getestet. So wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* *INVSc1* in Kombination mit dem Hefepiasmid pYES2 verwendet (beide von Invitrogen, Karlsruhe). In diesem System konnten bereits andere Membranproteine überexprimiert werden, so z. B. der vakuoläre Dicarbonsäuretransporter *AtDT* (HURTH, 2002). Bei der Expression wurde das *AtMSBP1*-Protein mit einem Histidin-Tag ausgestattet, der eine schnelle und leichte Anreicherung und Detektion ermöglichen sollte (pEM 146). Als Kontrolle diente der Hefestamm *INVSc1* mit dem leeren pYES2-Vektor. Bei der Überprüfung der Membranfraktionen mit einem gegen den Histidin-Tag gerichteten Antikörper (Qiagen, Hilden) konnte jedoch kein Nachweis für die Expression des *AtMSBP1*-Proteins erbracht werden, obwohl mRNA für *AtMSBP1* in den Hefen nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Hefesystem wurde in Kooperation mit Prof. Norbert Sauer (Universität Erlangen) genutzt. Auch in dem von ihm freundlicher Weise zur Verfügung gestellten Hefevektor NEV-E konnten bereits mehrere Zuckertransporter erfolgreich exprimiert und charakterisiert werden (SAUER & STOLZ, 1994). Die cDNA des *AtMSBP1* wurde über *EcoRI* in den entsprechend geschnittenen Vektor kloniert (pEM 395). Aufnahmeversuche zeigten aber auch hier keine erfolgreiche Expression des *AtMSBP1* (Daten nicht gezeigt).

Der einzige Monosaccharid/H⁺-Symporter GTR des Cyanobakteriums *Synechocystis* 6803 hat eine höhere Ähnlichkeit zum AtMSBP1 als die plasmamembranlokalisierten Zuckertransporter aus *Arabidopsis thaliana*. Aus diesem Grund sollten verschiedene Fusionsproteine aus dem AtMSBP1 und dem SsGTR in einer SsGTR-Deletionsmutante getestet werden (*ALG1*, freundlicherweise von Prof. Georg Schmetterer aus Wien zur Verfügung gestellt). Diese Fusionskonstrukte sollten Aufschluss über die Bedeutung des ungewöhnlich großen hydrophilen Loops des AtMSBP1 geben. Dazu wurden verschiedene Konstrukte erstellt, bei denen die Helices 1 – 6, der zentrale hydrophile Loop und die Helices 7 – 12 der Transporter SsGTR und AtMSBP1 gegeneinander ausgetauscht wurden (Kap. 7.7, Abb. 7.7.1-4). Der Promotor- und der Terminatorbereich des SsGTR sollten für eine homologe Rekombination in das *ALG1*-Genom dienen. Die stabile Transformation der Blaualgen und die Rekombination der Fusionskonstrukte ins Genom sollten durch eine Kanamycinresistenz überprüft werden, die in die verwendeten Vektoren pBSK (Stratagene, Heidelberg) und pUC18 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) kloniert wurde. Die Tabelle 3.4 zeigt die erstellten Konstrukte. Als Transformationskontrollen dienten zwei von der Arbeitsgruppe Sültemeyer (Kaiserslautern) zur Verfügung gestellte pUC18-Konstrukte (K1 und K2a) mit einer Kanamycinresistenz.

Tabelle 3.4: Fusionskonstrukte zwischen AtMSBP1 und SsGTR. Dargestellt sind die unterschiedlichen Strukturbereiche von SsGTR bzw. AtMSBP1, aus denen sich die jeweiligen chimären Proteine zusammensetzen. In die verwendeten Vektoren wurde jeweils eine Kanamycinresistenz eingefügt.

Name des Konstruktes	Nummer	Transporter Teilstück				SsGTR hinter dem Start	Vektor
		SsGTR vor dem Start	Helix 1-6	Zentraler Loop	Helix 7-12		
pEM 592	V	+	SsGTR	AtMSBP1	SsGTR	+	pBSK
pEM 468/587	X	+	AtMSBP1	AtMSBP1	AtMSBP1	+	pBSK
pEM 499/580	XVI	+	AtMSBP1	SsGTR	AtMSBP1	+	pBSK
pEM 612	XVI	+	AtMSBP1	AtMSBP1	AtMSBP1	+	pUC18

Die Transformation des Cyanobakteriumstamms *Synechocystis* 6803 *ALG1* konnte erfolgreich mit den Kontrollkonstrukten K1 und K2a durchgeführt werden. Bei der Transformation mit den Zuckertransporter-Fusionskonstrukten konnten jedoch sowohl

mit den pBSK- als auch mit den pUC18-Konstrukten keine Kolonien erhalten werden. Dies könnte an der Position der Kanamycinresistenz liegen. Diese lag nicht innerhalb der Fusionskonstrukte, sondern im Vektorbereich, der bei der Transformation mit ins Genom rekombinieren sollte. Es wurde mit der Klonierung neuer Konstrukte begonnen, bei denen die Kanamycinresistenz 100 bp hinter dem Stop des SsGTR im Terminatorbereich liegt, wieder gefolgt von 300 bp DNA des SsGTR-Terminators. So soll die Kanamycinresistenz besser mit den Zuckertransporter-Fusionskonstrukten in das Genom rekombinieren.

3.3 Gewebespezifität der Expression der AtMSBP-Proteine

Die bisher untersuchten Isoformen der Monosaccharidtransporter aus *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen zeigen eine sehr gewebe- und zeitspezifische Expression (BÜTTNER & SAUER, 2000). Auch für die Isoformen der MSBP-Proteine wurde die Expression in verschiedenen Geweben auf mRNA-Ebene untersucht. Zu diesem Zweck waren spezifische Sonden für die jeweilige Isoform der *AtMSBP*-Gene notwendig.

3.3.1 Spezifität der AtMSBP-cDNA-Sonden

Um die mRNA-Akkumulation der MSBPs in Geweben zu untersuchen, wurden spezifische Sonden für die Isoformen der *MSBP*-Gene benötigt. Für radioaktive Sonden gegen die jeweilige *AtMSBP1-3*-mRNA wurden die cDNAs der einzelnen Isoformen in ihrer gesamten Länge verwendet. Die Spezifität der Sonden wurde anhand von Testfiltern überprüft, bei denen die jeweilige cDNA der *AtMSBP1-3*, kloniert in pBSK, in unterschiedlichen Konzentrationen (50 ng – 50 pg) auf eine Membran aufgetragen wurden. Wie Abbildung 3.5 zeigt, erkannten die Sonden die ihnen entsprechende cDNA sehr gut, aber kaum die cDNA der beiden anderen Isoformen aus *Arabidopsis*. Durch diese sehr spezifische Erkennung ist eine Analyse der Expression der einzelnen Isoformen auf mRNA-Ebene möglich.

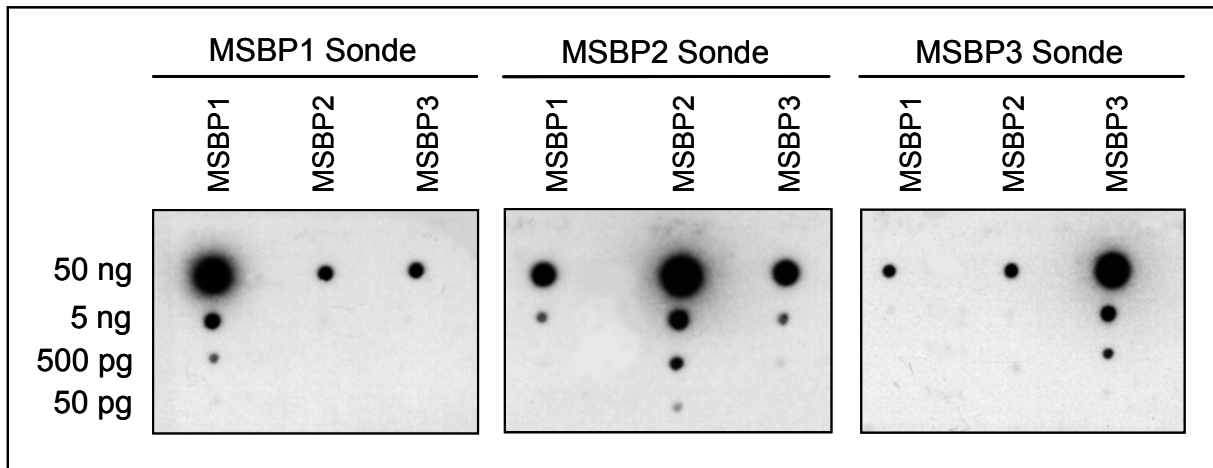


Abbildung 3.5: Spezifität der cDNA-Sonden für *AtMSBP1-3*. Die cDNAs für *AtMSBP1-3*, kloniert in pBSK, wurden in der jeweils angegebenen Konzentration aufgetragen und mit den entsprechenden radioaktiven Sonden hybridisiert.

3.3.2 Analysen der *AtMSBP*-mRNA-Akkumulation

Um die Gewebespezifität der mRNA für *AtMSBP1-3* in *Arabidopsis thaliana* zu testen, wurde Gesamt-RNA aus Wurzeln, voll entwickelten („Source“-) und jungen („Sink“-) Blättern, Stengeln und Blüten isoliert und Northern-Blots mit diesen unterschiedlichen Gewebetypen erstellt. Die Hybridisierung der Northern-Blots erfolgte mit den spezifischen Sonden gegen die cDNAs der *AtMSBP1-3* (Kap. 3.3.1).

Wie Abb. 3.6 zeigt, akkumulierte die mRNA für *AtMSBP1* vor allem in den älteren „Source“-Blättern, während in jungen „Sink“-Blättern kaum ein Signal zu finden war. Die mRNA für *AtMSBP2* konnte in fast allen *Arabidopsis*-Gewebe nachgewiesen werden, besonders in Stengeln und Wurzeln, aber auch in jungen Blättern und Blüten. *AtMSBP3*-mRNA akkumulierte vor allem in „Sink“-Blättern, geringe Mengen in Wurzeln und Stengeln. Diese Northern-Blot-Analysen zeigten deutlich eine differenzierte gewebespezifische Expression der drei Isoformen der *AtMSBPs*, wie sie auch für andere Monosaccharidtransporter aus *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen wurde (BÜTTNER & SAUER, 2000).

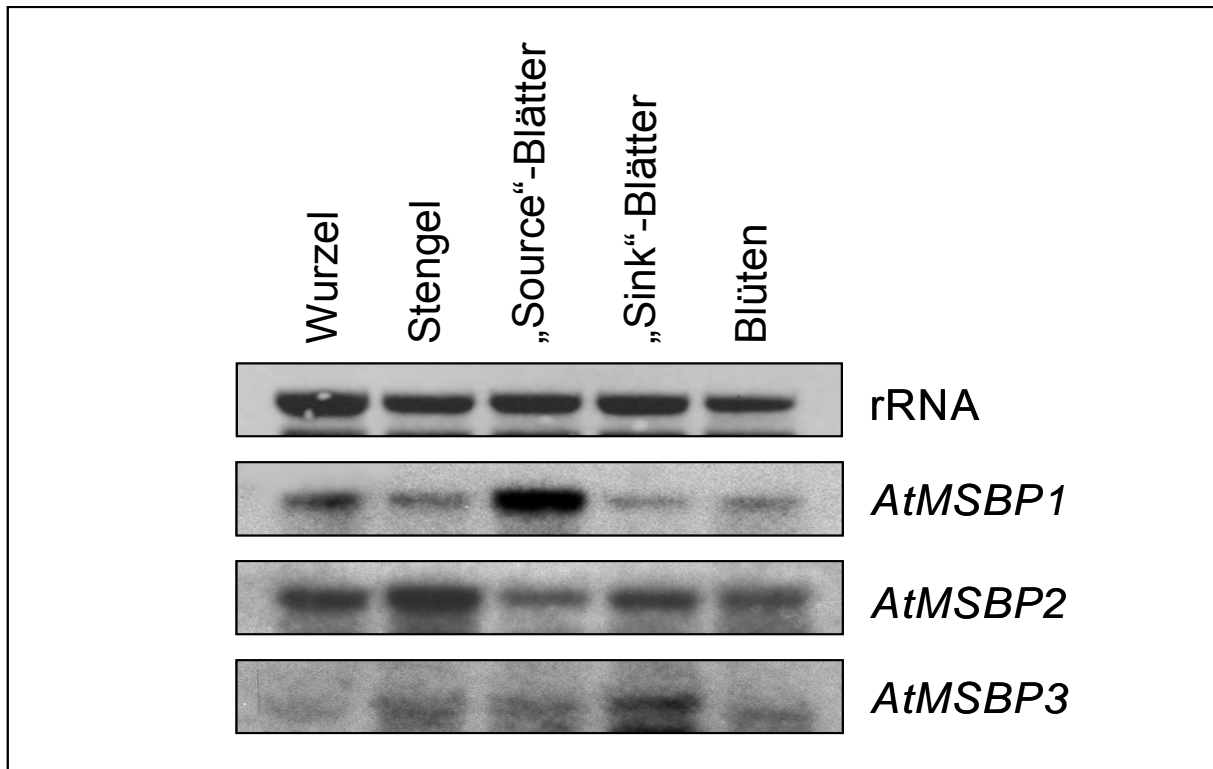


Abbildung 3.6: Analysen der *AtMSBP*-mRNA-Akkumulation in unterschiedlichen Geweben aus *Arabidopsis*. Die Northern-Blots wurden erstellt mit je 10 µg Gesamt-RNA aus Wurzeln, Stengeln, alten („Source“-) Blättern, jungen („Sink“-) Blättern und Blüten. Als Sonde wurden jeweils die *AtMSBP1-3*-cDNAs verwendet.

Die mRNA für *NtMSBP1* konnte spezifisch in den Blüten der Tabakpflanzen nachgewiesen werden (Uwe Sonnewald, mündliche Mitteilung).

Die mRNA-Akkumulation der MSBPs aus der Gerste (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) wurden von WESCHKE et al. (2003) untersucht. Deren Studien zeigte eine sehr gewebe- und zeitspezifische Akkumulation der *HvSTP1*- und *HvSTP2*-mRNA in sich entwickelnden Gerstenkörnern, die mit den Ergebnissen für andere Zuckertransporter korreliert (BÜTTNER & SAUER, 2000).

Genauere Ergebnisse bezüglich der Lokalisation und zeitlichen Expression der MSBP-Proteine in *Arabidopsis* sollen durch Promotor-GUS-Fusionen erhalten werden.

3.4 Lokalisation des *AtMSBP1* in der Zelle

Fast alle bisher untersuchten pflanzlichen Monosaccharidtransporter sind in der Plasmamembran lokalisiert (BÜTTNER & SAUER, 2000), eine Ausnahme bildet lediglich der plastidäre Glukosetransporter (pGlcT, WEBER et al., 2000). Um die zelluläre

Lokalisierung des *AtMSBP1*-Proteins zu bestimmen, wurde ein *AtMSBP1*-GFP-Fusionsprotein hergestellt und transient in Tabakprotoplasten transformiert. Außerdem wurden *In-vitro*-Translations- und anschließende Targetingversuche durchgeführt, ebenso wie Immunodetektionen mit einem Antikörper, der gegen den großen hydrophilen Loop des *AtMSBP1* hergestellt wurde (TRENTMANN, 1998).

3.4.1 *AtMSBP1*-GFP-Fusionen

Durch die Fusion von Proteinen mit dem Grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) kann ihre Lokalisation in der Zelle bestimmt werden. Auch mit dem *AtMSBP1* wurde ein GFP-Fusionsprotein erstellt um die Lokalisation dieses Mitgliedes der Zuckertransporterfamilie zu untersuchen. Der *AtMSBP1* wurde zu diesem Zweck über *Xba*I und *Xho*I Schnittstellen in den Vektor GFP2 (KOST et al., 1998) kloniert. Bei der Amplifizierung des *AtMSBP1* wurde eine *Xba*I Schnittstelle vor dem Startcodon und eine *Xho*I Schnittstelle unter Beibehaltung des Leserasters bei gleichzeitiger Entfernung des Stopcodons eingefügt (Tab. 2.2; Kap. 2.3.8, pEM 152). Das entstandene *AtMSBP1*-GFP-Konstrukt und weitere Kontrollkonstrukte wurden für die transiente Transformation von isolierten Tabakprotoplasten zur Expression der verschiedenen GFP-Fusionsproteine benutzt (Kap. 2.4.10).

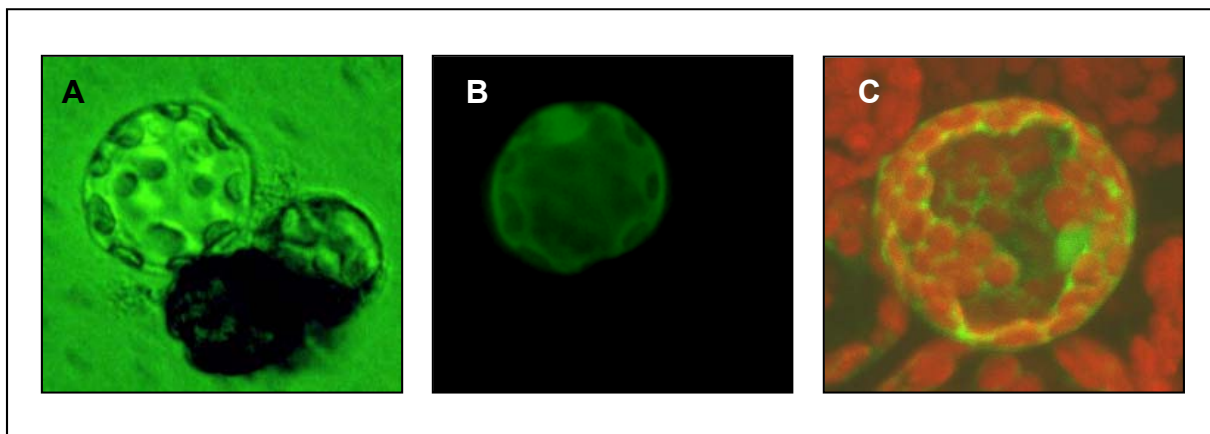


Abbildung 3.7: Transiente Expression des GFPs in Tabakprotoplasten.

A: Durchlicht, B: UV-Licht, C: UV-Licht, rot: Autofluoreszenz des Chlorophylls.

Wurde nur der GFP2-Vektor transient in Tabakprotoplasten transformiert, zeigte sich im UV-Licht eine starke Fluoreszenz des exprimierten GFPs im Kern und im Zytosol der Zellen (Abb. 3.7, GREBENOK et al., 1997).

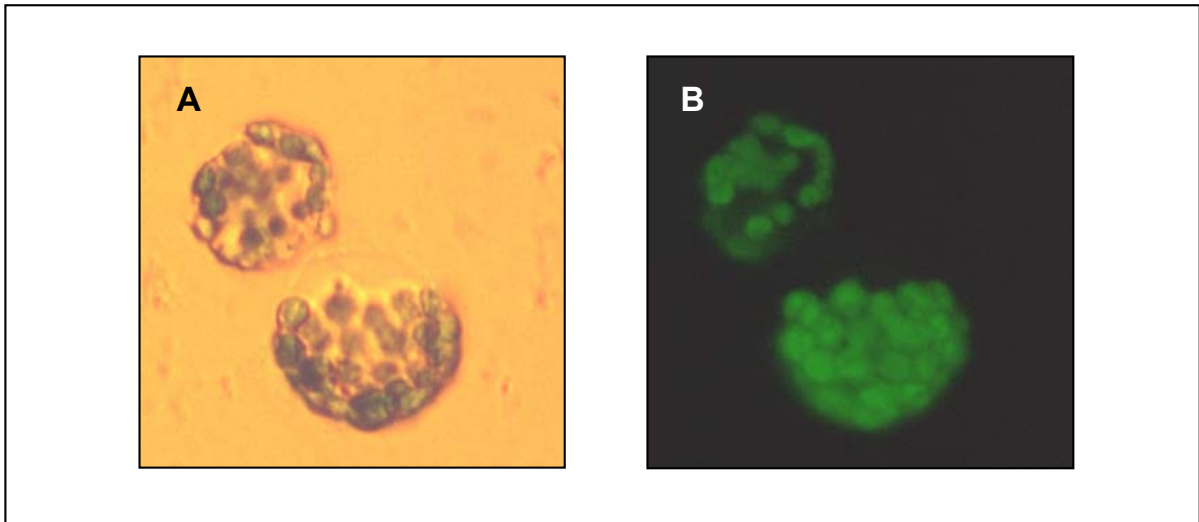


Abbildung 3.8: Transiente Expression des *AtMSBP1*-GFP-Fusionskonstruktes in Tabakprotoplasten. A: Durchlicht, B: UV-Licht.

Im Gegensatz dazu akkumulierte das *AtMSBP1*-GFP-Konstrukt in transformierten Tabakprotoplasten in den Plastiden. Dies zeigte sich deutlich beim Vergleich zwischen UV- und Durchlicht, beim dem die grüne Fluoreszenz des GFP mit der Lokalisation der Plastiden in den Tabakprotoplasten übereinstimmte (Abb. 3.8).

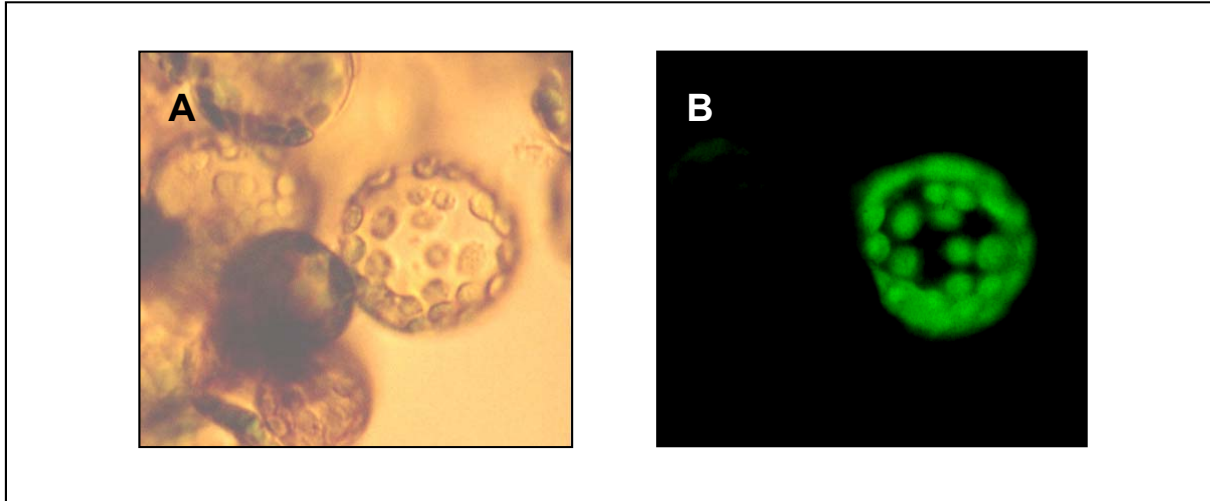


Abbildung 3.9: Transiente Expression eines *AtGlc6P-DH*-GFP-Fusionskonstruktes zur Kontrolle der Lokalisation in Plastiden in Tabakprotoplasten. A, B: GFP-Fusionskonstrukt mit der N-terminalen Leadersequenz der plastidären Glc6P-Dehydrogenase-Isoform, A: Durchlicht, B: UV-Licht.

Zur Kontrolle der Lokalisation in Plastiden wurde ein Fusionskonstrukt des GFPs mit der N-terminalen Leadersequenz einer plastidären Glc6P-Dehydrogenase-Isoform in Tabakprotoplasten transient transformiert (Abb. 3.9; WENDT et al., 2000). Bei diesem

Konstrukt war in den Plastiden ein zum *AtMSBP1*-GFP-Konstrukt vergleichbares Muster der GFP-Fluoreszenz nachweisbar.

Ein Fusionskonstrukt des GFP mit LeSUT, einem in der Plasmamembran lokalisierten Saccharosetransporter, wurde als Kontrolle für die Akkumulation der GFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran bei Tabakprotoplasten verwendet (Abb. 3.10). Hier akkumulierte deutlich die grüne Fluoreszenz in der Plasmamembran.

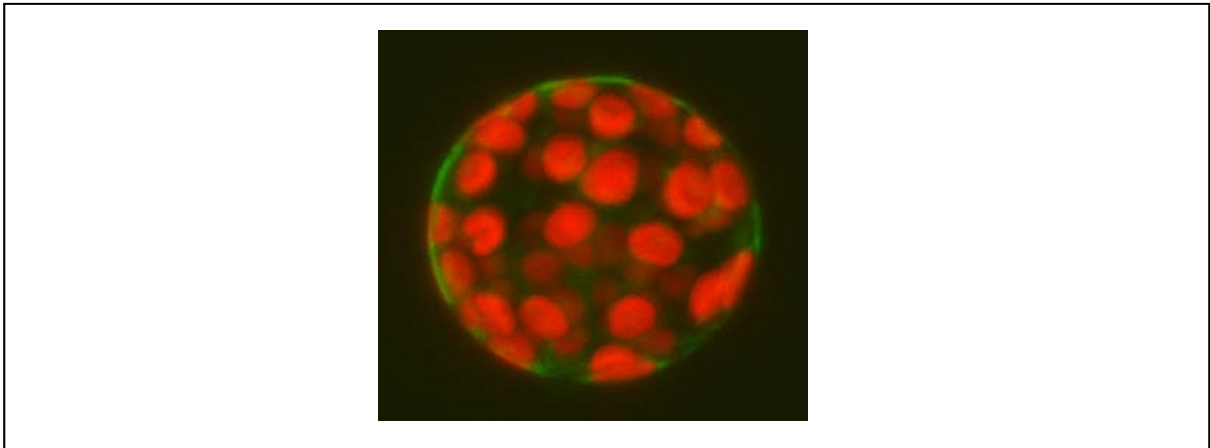


Abbildung 3.10: Transiente Expression eines *LeSUT1*-GFP-Fusionskonstruktes zur Kontrolle der Lokalisation in der Plasmamembran in Tabakprotoplasten. *LeSUT*-GFP-Fusionskonstrukt im UV-Licht, rot: Autofluoreszenz des Chlorophylls.

3.4.2 *In-vitro*-Translation und Importstudien mit dem *AtMSBP1*-Preprotein in Chloroplasten

Die *In-vitro*-Translation des *AtMSBP1* und die anschließende Inkubation von isolierten Chloroplasten mit dem Produkt stellt eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Lokalisation des *AtMSBP1* dar. Die cDNAs des *AtMSBP1* und des *OsMSBP1* wurden hierzu in den pET16b Vektor kloniert (ohne His-Tag) (Kap. 2.3.8, pEM 175 und pEM 433). Die Konstrukte wurden bei der *In-vitro*-Translation zum einen im “TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System” und zum anderen im “TNT[®] Coupled Wheat Germ Extrakt System” (Promega, Mannheim) unter der Verwendung von radioaktivem ³⁵S-Methionin transkribiert und translatiert (Kap. 2.4.5).

Bei der Auftrennung der radioaktiv markierten *In-vitro*-Translationsprodukte von *AtMSBP1* und *OsMSBP1* in einem SDS-Gel wurden sehr starke Signale in Höhe von ca. 79 kDa mittels eines Autoradiogramms nachgewiesen (Abb. 3.11). Die errechnete Molekularmasse des *AtMSBP1* beträgt 80,7 kDa (*OsMSBP1*: 79,5 kDa). Diese leichte Abweichung von der wirklichen Molekularmasse konnte besonders häufig bei

Membranproteinen beobachtet werden (SAUER & STADLER, 1993). Bei den weiteren Banden im Autoradiogramm handelt es sich vermutlich um unspezifisch markierte Proteine sowie um unvollständige Abbruchfragmente der Translation.

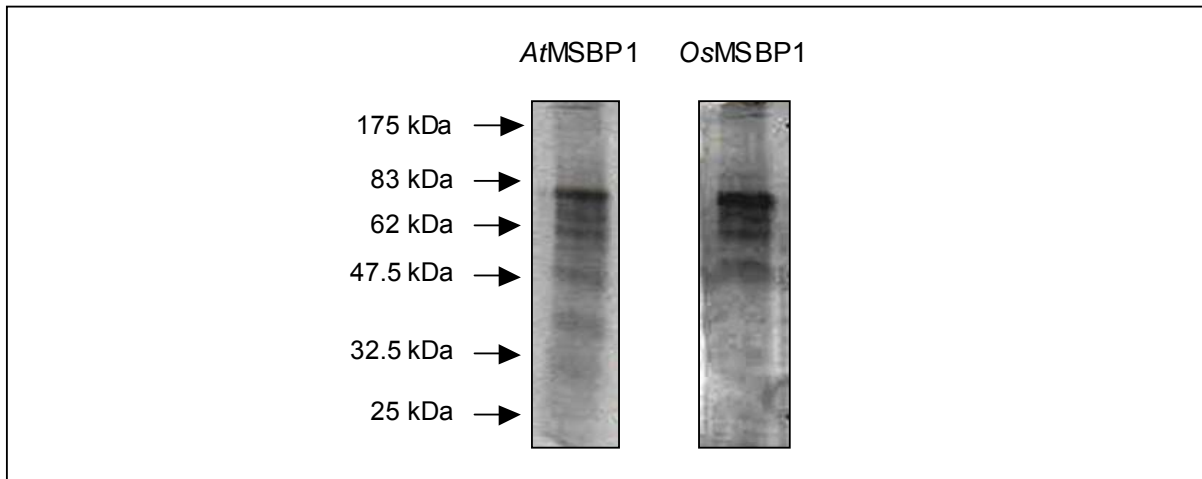


Abbildung 3.11: *In-vitro*-Translation des AtMSBP1 und OsMSBP1. Die *In-vitro*-Translansationsansätze wurden mittels eines SDS-Gels aufgetrennt und ein Autoradiogramm erstellt.

Isolierte Chloroplasten aus Spinat oder Erbsen wurden bei 25 °C unter Belichtung mit dem Zusatz von ATP oder im Dunkeln ohne ATP mit den radioaktiv markierten *In-vitro*-Translansationsprodukten inkubiert (Kap. 2.4.9). Zur Kontrolle diente der plastidäre AtNTT1 in pET16b ohne His-Tag, ein envelopemembranlokalisierter ATP/ADP-Transporter (pET7, THOM, 1996). Nach der Inkubation wurden die Chloroplasten einem Verdau mit Thermolysin unterzogen, welches unspezifisch gebundenes Protein an der Außenhülle der Plastiden abbaut. Dann wurden die Chloroplasten direkt mit SDS-Gelladepuffer versetzt bzw. zuvor in Hüllmembranen-, Stroma- und Thylakoidmembranen-Fractionen aufgetrennt (Kap. 2.4.9) und dann mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kap. 2.4.3) und anschließendem Autoradiogramm dargestellt.

Erwartet wurde ein Einbau der AtMSBP1- und OsMSBP1-Proteine in die Hüllmembranen der Chloroplasten (unter Belichtung mit dem Zusatz von ATP). Dieses konnte jedoch nicht gezeigt werden, da keine entsprechende Bande auf dem Autoradiogramm zu detektieren war. Die zur Kontrolle durchgeführte Inkubation der Chloroplasten mit dem AtNTT1 zeigte eine diskrete Bande in der Höhe von 62 kDa, welches der erwarteten Molekularmasse nach Abspaltung des Transitpeptides entspricht (NEUHAUS et al., 1997, Daten nicht gezeigt). Wurde jedoch nach der

Inkubation der Chloroplasten mit den *In-vitro*-Translationsprodukten auf den Thermolysinverdau verzichtet, konnte für die MSBP-Proteine ein Signal in Höhe der *In-vitro*-Translationsprodukte beobachtet werden, aber auch für den AtNTT1 (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht auszuschließen, dass sich bei den Signalen um außen an den Chloroplasten unspezifisch „klebendes“ Protein handelte.

Diese Daten zeigen, dass der AtMSBP1 nicht in der inneren Envelopemembran inseriert, da dort kein Abbau mit Termolysin erfolgen kann. Die Lokalisation des AtMSBP1 in der äußeren Membran kann aber durch diese Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3.4.3 Immunodetektion des AtMSBP1 in Envelopemembranen aus *Arabidopsis*

Um die Ergebnisse der GFP- und *In-vitro*-Translations-Versuche bezüglich der Lokalisierung des AtMSBP1 in den Plastiden weiter zu bestätigen, wurden äußere und innere Envelopemembranen aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (nach KEEGSTRA & YOUSIF, 1986; Kap. 2.4.8). Ausgehend von reinen Chloroplasten bildeten sich im Gradienten zwei klare Banden, die innere Envelopemembran (gelb gefärbt) und die äußere Envelopemembran (weißlich gefärbt) trennten sich deutlich voneinander ab. Die erhaltenen Fraktionen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt um die Spezifität der Membranisolierung zu überprüfen (Kap. 2.4.3). Anhand der Markerproteine, wie z. B. des 30 kDa Proteins in der inneren Envelopemembran (plastidärer Triose-Phosphat-Transporter), konnte die Reinheit der Membran-isolierung bestätigt werden (KEEGSTRA & YOUSIF, 1986; FLÜGGE & HELDT, 1977). Parallel wurde ein entsprechendes SDS-Gel auf eine Nylon-Membran geblottet. Die Immunodetektion erfolgte mit einem Antikörper gegen den zentralen hydrophilen Loop des AtMSBP1 (TRENTMANN, 1996) (Kap. 2.4.4).

In der Fraktion der äußeren Plastidenmembran war eine starke Bande zu detektieren, aber nur sehr schwach in der inneren Membran (Abb. 3.12). Die schwache Bande in der Fraktion der inneren Hüllmembranen war vermutlich auf leichte Verunreinigungen bei der Auftrennung der Membranen voneinander zurückzuführen. Die bei ca. 74 kDa liegende Bande in der äußeren Membran entsprach dem erwarteten Signal, auf ähnlicher Höhe lief auch der *In-vitro*-translatierte AtMSBP1 (siehe Kap. 3.4.2). Die Spezifität dieses Signals wurde durch ein entsprechendes Präimmunserum bestätigt (Daten nicht gezeigt).

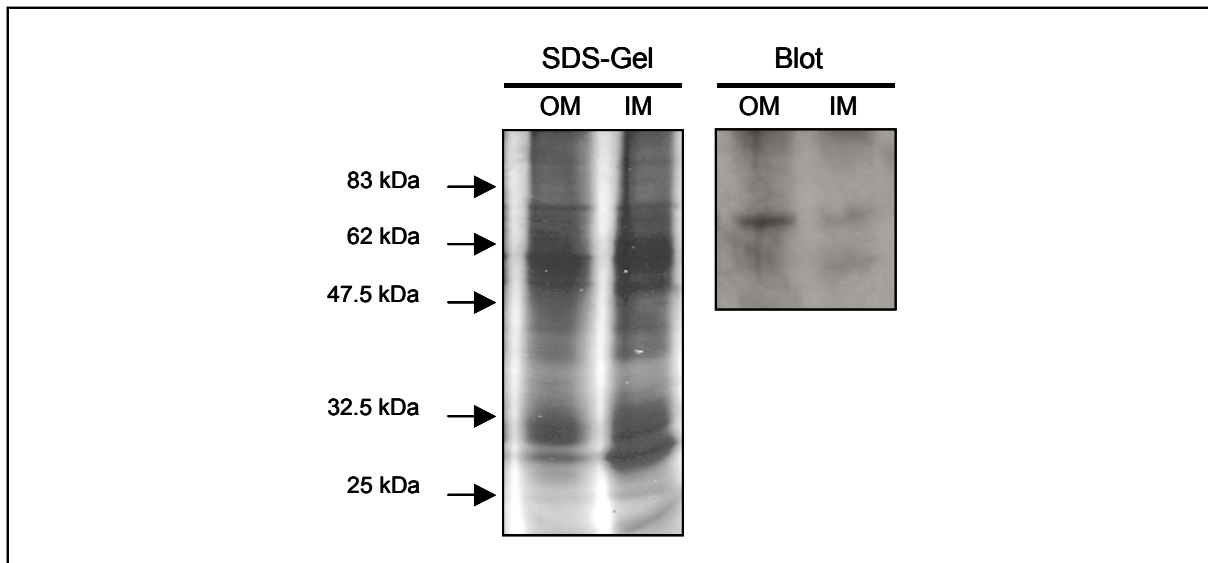


Abbildung 3.12: Immunodetektion des AtMSBP1 in Plastidenmembranen mit einem spezifischen AtMSBP-Loop-Antikörper. Dargestellt ist links das silbergefärbte SDS-Gel und rechts der entsprechende Western-Blot (Chemilumineszenz). OM, äußere Plastidenhüllmembran, IM, innere Plastidenhüllmembran.

Zusammenfassend lässt sich aus den Daten dieser unterschiedlichen Methoden schließen, dass der AtMSBP1 in der äußeren Plastidenmembran lokalisiert ist. Die Lokalisation des AtMSBP1 in Plastiden konnte durch das AtMSBP1-GFP-Fusionsprotein eindeutig gezeigt werden. Die Ergebnisse der Importstudien mit radioaktiv markierten *In-vitro*-Translationsprodukten und isolierten Chloroplasten deuteten darauf hin, dass der AtMSBP1 nicht in der inneren Envelopemembran lokalisiert ist. Die Immunodetektion des AtMSBP1 in Envelopemembranen aus *Arabidopsis* zeigte deutlich die Lokalisation des AtMSBP1 in der äußeren Envelopemembran.

3.5 Mutanten für die AtMSBP-Proteine

Um die Funktion eines Proteins im pflanzlichen Stoffwechsel zu untersuchen, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Eine dieser Möglichkeiten ist die Herstellung von transgenen Pflanzen, in der die Expression des zu untersuchenden Gens gezielt beeinflusst werden. Zu diesen transgenen Pflanzen gehören sogenannte „Sense“- und „Antisense“-Pflanzen, in denen der mRNA-Gehalt des zu untersuchenden Gens gesteigert oder verringert wird und in Folge dessen der Proteingehalt beeinflusst werden soll. Verschiedene interne Mechanismen der Pflanzen wirken aber regulatorisch auf die Genexpression ein, so dass es nicht unbedingt zu Änderungen

auf Proteinebene kommen muss. In „RNAi“-Pflanzen wird ebenfalls die Genexpression auf der mRNA-Ebene beeinflusst. In „RNAi“-Pflanzen ist aber der Abbau der mRNA wesentlich effektiver als in „Antisense“-Pflanzen, so dass hier eher die Auswirkungen des Fehlens eines Gens untersucht werden können. Eine effektive Möglichkeit für die Analyse des Fehlens bestimmter Gene bieten „knock out“-Mutanten, in denen das Gen direkt durch die Insertion einer sogenannten T-DNA betroffen ist und in Folge dessen keine mRNA und entsprechend kein Protein mehr gebildet wird.

3.5.1 Identifikation von „knock out“-Mutanten für *AtMSBP1* und *AtMSBP2*

„Knock out“-Mutanten stellen eine gute Möglichkeit für die gezielte Untersuchung der Funktion eines Gens im pflanzlichen Stoffwechsel da. Durch die Insertion einer sogenannten T-DNA in ein Gen kann die Transkription dieses Gens nicht mehr stattfinden, so dass kein entsprechendes Protein mehr gebildet wird. Mit dieser Methode können die Auswirkungen des Fehlens des betroffenen Gens untersucht werden und somit Rückschlüsse auf die Funktion des entsprechenden Proteins gezogen werden. Der Effekt der T-DNA kann auch auftreten, wenn diese im Promotor, im Ende eines Gens oder in einem Intron inseriert.

Für zwei von drei Isoformen der MSBP-Proteine in *Arabidopsis thaliana* konnten homozygote „knock out“-Mutanten erhalten werden. Die „knock out“-Mutanten für *AtMSBP1* (*AtMSBP1::T-DNA*, Garlic_296_E01.b.1a.Lb3Fb) und für *AtMSBP2* (*AtMSBP2::T-DNA*, Garlic_124_H03.b.1a.Lb3Fa) wurden uns vom Torrey Mesa Research Institute zur Verfügung gestellt (TMRI, San Diego, CA, USA). Die genaue Insertion der T-DNAs im Genom der beiden Linien ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Bei *AtMSBP1::T-DNA* ist die T-DNA 9 bp hinter dem Startcodon ins erste Exon integriert (Position 7247654 – 7247615), während bei *AtMSBP2::T-DNA* die T-DNA 330 bp vor dem Stopcodon in das Exon inseriert ist (Position 15761298 – 15701254).

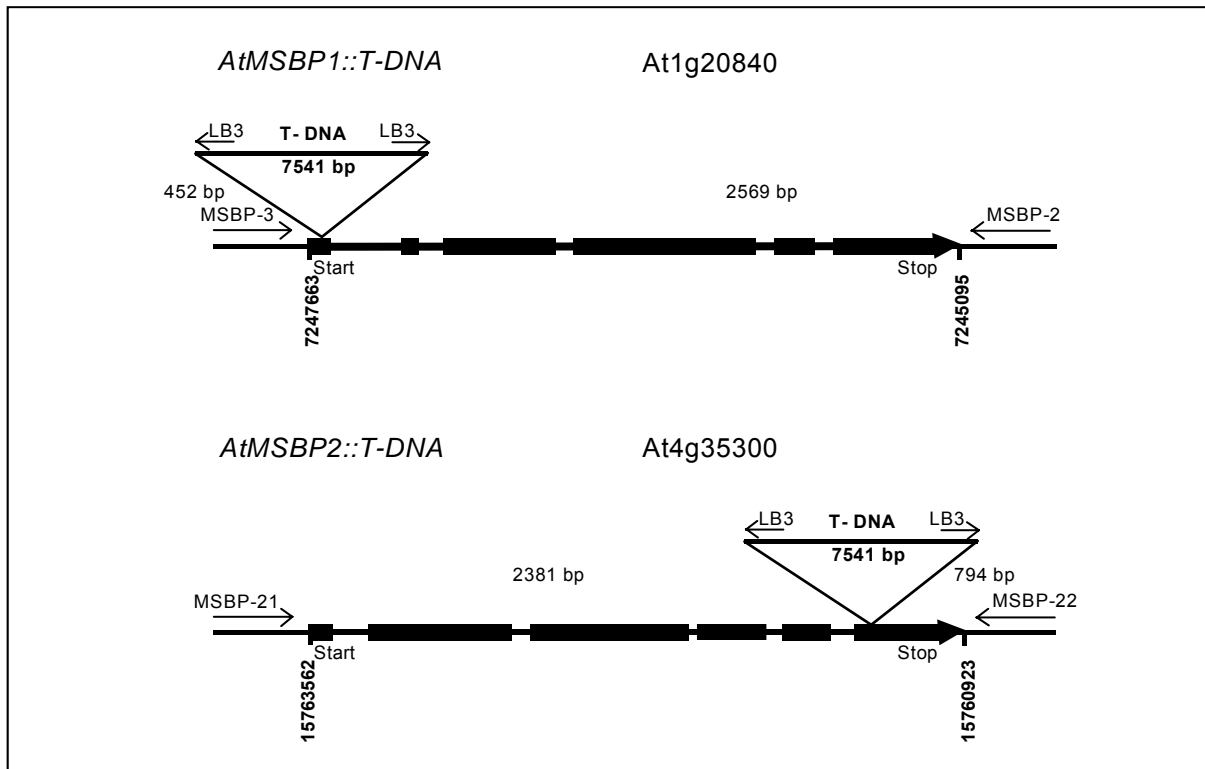


Abbildung 3.13: Insertion der T-DNA in *AtMSBP1* und *AtMSBP2*. MSBP2, MSBP3, MSBP21 und MSBP22 sind genspezifische Primer, LB3 ist ein T-DNA-spezifischer Primer. Angegeben ist die Position der T-DNA-Insertion auf dem jeweiligen Chromosom, die Nummer des betroffenen Genes und die Größe der erwarteten PCR-Fragmente.

Die Insertion der T-DNA ins Genom der „knock out“-Mutanten wurde zunächst durch PCR-Analysen auf genomischer DNA überprüft. Durch die Kombination von jeweils genspezifischen Primern für *AtMSBP1* und *AtMSBP2* mit dem T-DNA-spezifischen Primer LB3 konnte die Insertion der T-DNA direkt nachgewiesen und so „knock out“-von Wildtyppflanzen unterschieden werden.

Für die Mutante *MSBP1::T-DNA* wurden die genspezifischen Primer MSBP2 bzw. MSBP3 zusammen mit dem T-DNA-spezifischen Primer LB3 kombiniert. Die Kombination des Primers LB3 mit dem Primer MSBP2 amplifizierte ein 2569 bp großes Stück, mit dem Primer MSBP3 wurde ein 452 bp großes Stück amplifiziert (Abb. 3.14). Auch mit den genspezifischen Primern MSBP21 und MSBP22 für *AtMSBP2* in Kombination mit dem Primer LB3 konnten die entsprechenden Stücke (2381 bp und 794 bp) amplifiziert werden (Abb. 3.14). Hingegen konnte bei der Kombination der genspezifischen mit dem T-DNA-spezifischen Primer LB3 kein PCR-Produkt auf genomischer DNA aus Wildtyppflanzen amplifiziert werden. In Wildtyppflanzen und in heterozygoten „knock out“-Mutanten wurde ein PCR-Produkt

mit genspezifischen Primern gegen *AtMSBP1* und *AtMSBP2* in der erwarteten Größe amplifiziert (MSBP2 mit MSBP3: 3021 bp, MSBP21 mit MSBP22: 3175 bp). In den homozygoten „knock out“-Mutanten konnte hingegen durch die Insertion der T-DNA auf genomischer Ebene mit den genspezifischen Primern kein PCR-Produkt mehr für das jeweils ausgeschaltete Gen amplifiziert werden.

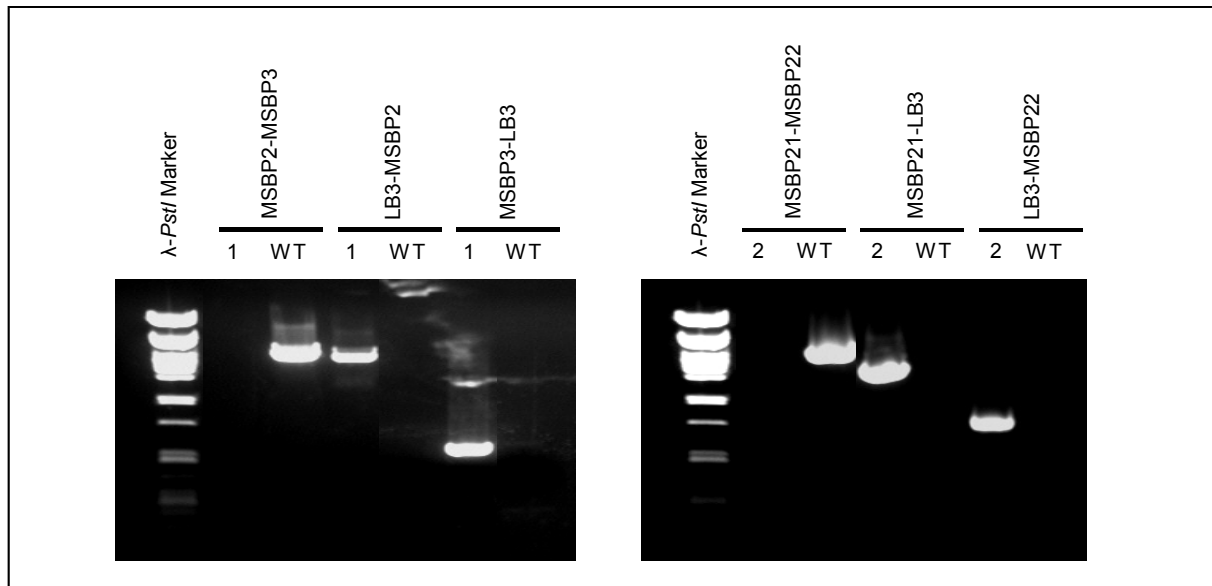


Abbildung 3.14: PCR-Analysen der *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen. WT, Wildtyp; 1, *AtMSBP1::T-DNA*; 2, *AtMSBP2::T-DNA*. MSBP2, MSBP3, MSBP21 und MSBP22 sind genspezifische Primer, LB3 ist ein T-DNA spezifischer Primer.

Die erhaltenen PCR-Produkte der Kombinationen der genspezifischen Primer mit dem Primer LB3 auf genomischer DNA aus den „knock out“-Pflanzen wurden in den Vektor pGEM_{T-easy} kloniert und sequenziert. Durch die Bestätigung der PCR-Produkte konnte die Insertion der T-DNA in *AtMSBP1* und *AtMSBP2* belegt werden.

In den homozygoten „knock out“-Mutanten konnte mittels Northern-Blot-Analysen keine mRNA mehr für das jeweils unterbrochene Gen mit genspezifischen cDNA-Sonden nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Darüber hinaus zeigte sich, dass auf mRNA-Ebene das Fehlen eines MSBP-Gens nicht zur Steigerung der Expression der anderen Isoformen *AtMSBP1* bzw. *AtMSBP2* führt.

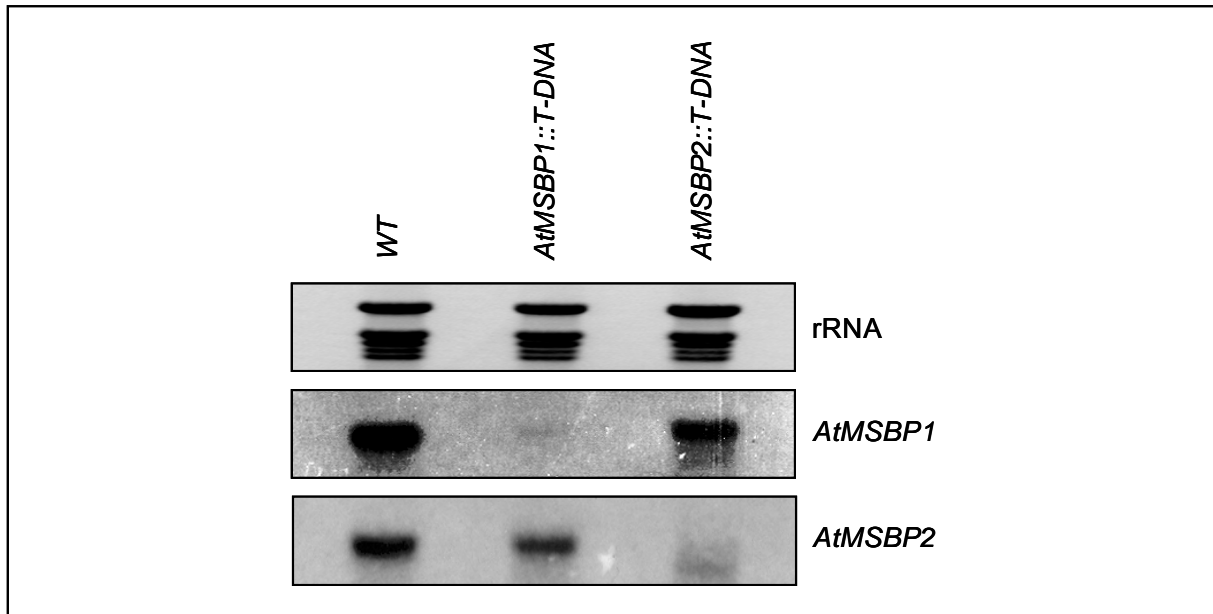


Abbildung 3.15: Northern-Blot-Analysen der *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen. Je 10 µg Gesamt-RNA aus Blättern wurde pro Spur aufgetragen. Als Sonden wurden die cDNAs des *AtMSBP1* und *AtMSBP2* verwendet.

Die durchgeführten Kontrollversuche zeigten, dass es sich bei den Linien *AtMSBP1::T-DNA* (Garlic_296_E01.b.1a.Lb3Fb) und *AtMSBP2::T-DNA* (Garlic_124_H03.b.1a.Lb3Fa) um homozygote „knock out“-Mutanten für die *AtMSBP1*- und *AtMSBP2*-Proteine handelte. Diese „knock out“-Mutanten konnten nun für weitere Versuche zur Bestimmung der Funktion der MSBP-Proteine verwendet werden.

3.5.2 Herstellung von „RNAi“-Mutanten für *AtMSBP3*

Für den *AtMSBP3* konnten bisher keine „knock out“-Mutanten identifiziert werden. Deshalb wurde für diese Isoform ein „RNAi“-Ansatz gewählt. „RNAi“-Konstrukte enthalten Abschnitte eines Gens in „sense“- und „antisense“-Richtung getrennt durch ein Intron. Wird ein „RNAi“-Konstrukt in der Zelle transkribiert, bildet sich aufgrund der zueinander komplementären RNA eine sogenannte Haarnadelschleife, die zur Induktion des „RNAi“-Mechanismus in der Zelle führt. Dieser zelleigene Mechanismus führt zum effektivem Abbau doppelsträngiger RNA und in Folge dessen zum effektiven Abbau der entsprechenden mRNA in der ganzen Zelle (SCHWEIZER et al., 2000; CHUANG & MEYEROWITZ, 2000; JOHANSEN & CARRINGTON, 2001).

Transgene Pflanzen mit einem „RNAi“-Konstrukt gegen den vorderen Teil des

zentralen Loops des *AtMSBP3* (Abb. 7.5) liegen bereits in der F3-Generation vor und können nun für Versuche bezüglich der Funktion des *AtMSBP3* genutzt werden. In der F2-Generation wurden bereits nur Pflanzen mit verringerten *AtMSBP3*-mRNA-Gehalten zur Samenbildung ausgewählt (Daten nicht gezeigt).

3.6 Analyse der *AtMSBP1*- und *AtMSBP2*-„knock out“-Mutanten

Der Verlust eines im Zuckertransport substantiell involvierten Proteins, sei es ein Transporter oder Sensor, führt zur Veränderung des Zuckerstatus in den Zellen und beeinflusst die Expression vieler zuckerregulierter Gene. Die Analyse der „knock out“-Mutanten für *AtMSBP1* und *AtMSBP2* bietet die Möglichkeit, den Einfluss dieser Proteine im pflanzlichen Stoffwechsel zu untersuchen. Durch den Vergleich mit Wildtyppflanzen können Rückschlüsse auf die Funktion der MSBP-Proteine gezogen werden. Dabei stellt sich insbesondere die Frage, ob die MSBP-Proteine signifikant am Transport von Zuckern in der Pflanze beteiligt sind, oder ob sie aufgrund ihrer ungewöhnlichen Struktur eher eine andere Rolle im Zuckerstoffwechsel der Pflanzen einnehmen, wie z. B. eine Beteiligung der MSBP-Proteine am Zuckersensing der Pflanzen. Zu Aufklärung der Funktion der MSBP-Proteine wurden die Veränderungen der „knock out“-Mutanten sowohl auf phänotypischer, als auch auf molekularer Ebene untersucht.

3.6.1 Wachstum der *AtMSBP1*- und *AtMSBP2*-„knock out“-Mutanten auf Erde

Das Fehlen eines am Zuckertransport beteiligten Proteins könnte zu phänotypischen Veränderungen des Wachstums der Mutanten führen. Die Anzucht der *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen auf Erde unter Kurztagbedingungen zeigte zunächst keine signifikanten Unterschiede zu parallel angezogenen Wildtyppflanzen. Erst bei Beginn der Blühphase wurde deutlich, dass *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen ca. eine Woche früher als *AtMSBP2::T-DNA*- und Wildtyppflanzen mit der Blütenbildung beginnen (Abb. 3.16).

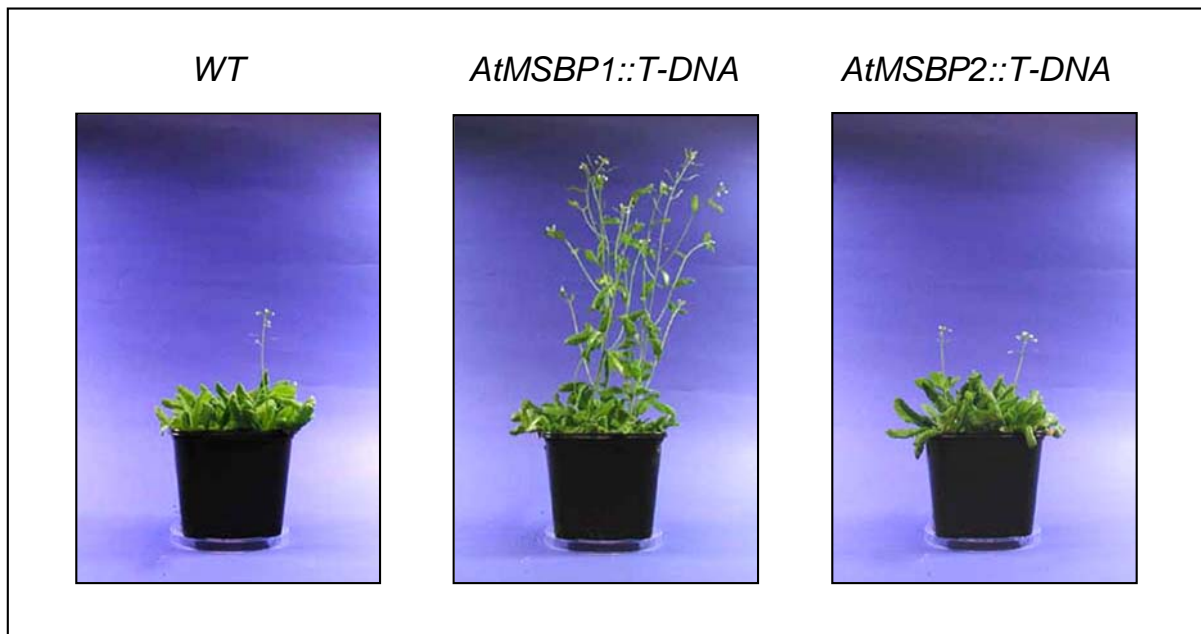


Abbildung 3.16: Vergleich der Wildtyp- mit den „knock out“-Pflanzen bei Beginn der Blühphase. Pflanzen im Alter von ca. 8 Wochen auf Erde unter Kurztagbedingungen.

3.6.2 Metabolitenbestimmung

Der Zuckerstaus in den Zellen der „Source“-Blätter wird zum einen durch die Photosynthese bestimmt, zum anderen haben Zuckertransporter einen Einfluss auf die Verteilung der Zucker in der Pflanze. Das Fehlen eines am Zuckertransport beteiligten Proteins kann den Zuckerstoffwechsel verändern. Um zu untersuchen, ob die *AtMSBP1*- und *AtMSBP2*-Proteine substantiell zum Zuckertransport beitragen und somit einen Einfluss auf den Kohlenhydratstatus haben, wurden die „knock out“-Pflanzen auf Veränderungen verschiedener Metabolite im Vergleich zu Wildtyppflanzen untersucht. Des Weiteren wurde der Chlorophyllgehalt der Blätter der drei Genotypen bestimmt, da dieser durch den Zuckerstatus der Zellen beeinflusst wird.

Die Chlorophyllgehalte waren in den drei Genotypen annähernd gleich, dabei ist der Wert nach der Dunkelphase höher als nach der Lichtphase (Abb. 3.17).

Bei der Untersuchung des Glukosegehaltes zeigten sich bei den „knock out“-Mutanten leicht erniedrigte Werte im Vergleich mit den Wildtyppflanzen (Abb. 3.18). Bei den Wildtyp- und den *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen waren nach der Lichtphase die Werte niedriger als bei der Nachtphase, während bei den *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen die Glukosegehalte annähernd gleich waren.

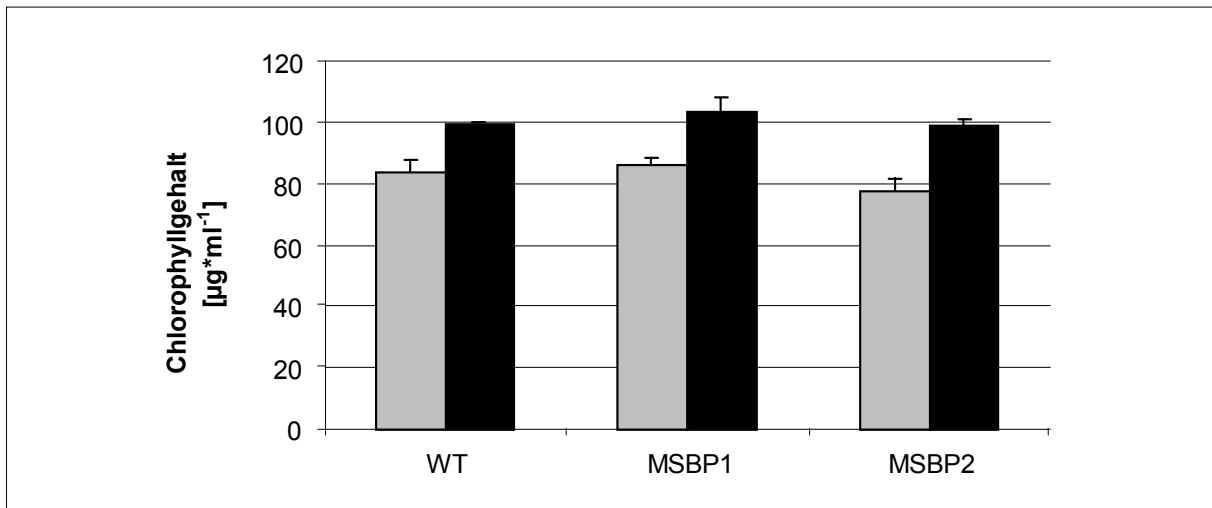


Abbildung 3.17: Vergleich der Chlorophyllgehalte der Wildtyp- mit denen der „knock out“-Pflanzen. Der Chlorophyllgehalt der Pflanzen wurde gemittelt aus je 4 Blattscheiben mit 1 cm Durchmesser. WT, Wildtyppflanzen; MSBP1, *AtMSBP1::T-DNA*; MSBP2, *AtMSBP2::T-DNA*; ■ Wert nach 10 h Belichtung, ■ Wert nach 14 h Dunkelphase.

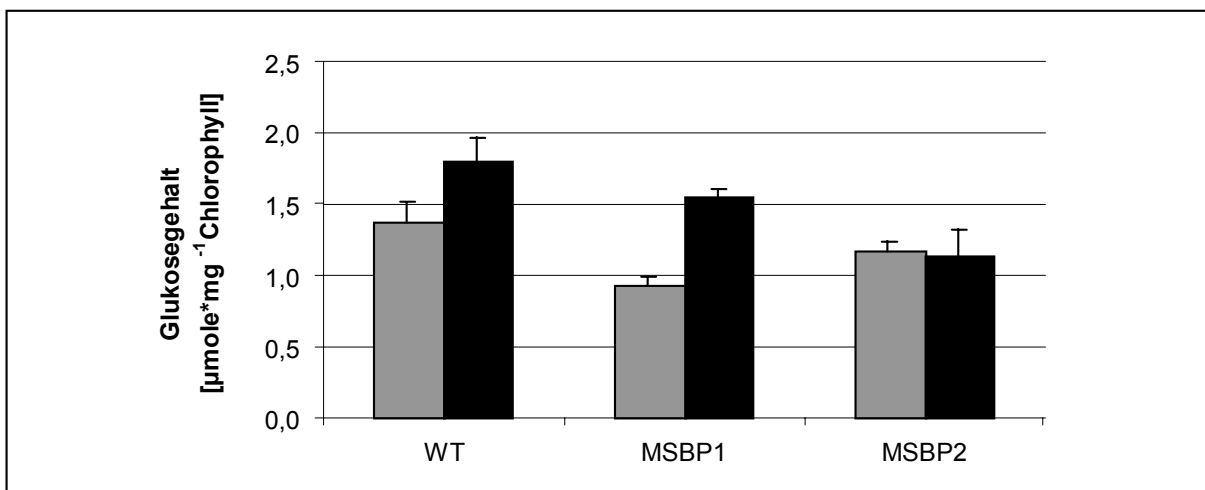


Abbildung 3.18: Vergleich der Glukosegehalte der Wildtyp- mit denen der „knock out“-Pflanzen. Der Glukosegehalt der Pflanzen wurde auf den Chlorophyllgehalt der Blätter bezogen. WT, Wildtyppflanzen; MSBP1, *AtMSBP1::T-DNA*; MSBP2, *AtMSBP2::T-DNA*; ■ Wert nach 10 h Belichtung, ■ Wert nach 14 h Dunkelphase.

Die Fruktosewerte waren bei den Wildtyppflanzen höher als bei den „knock out“-Mutanten (Abb. 3.19). Dabei waren die Werte nach der Lichtphase etwas höher als nach der Dunkelphase.

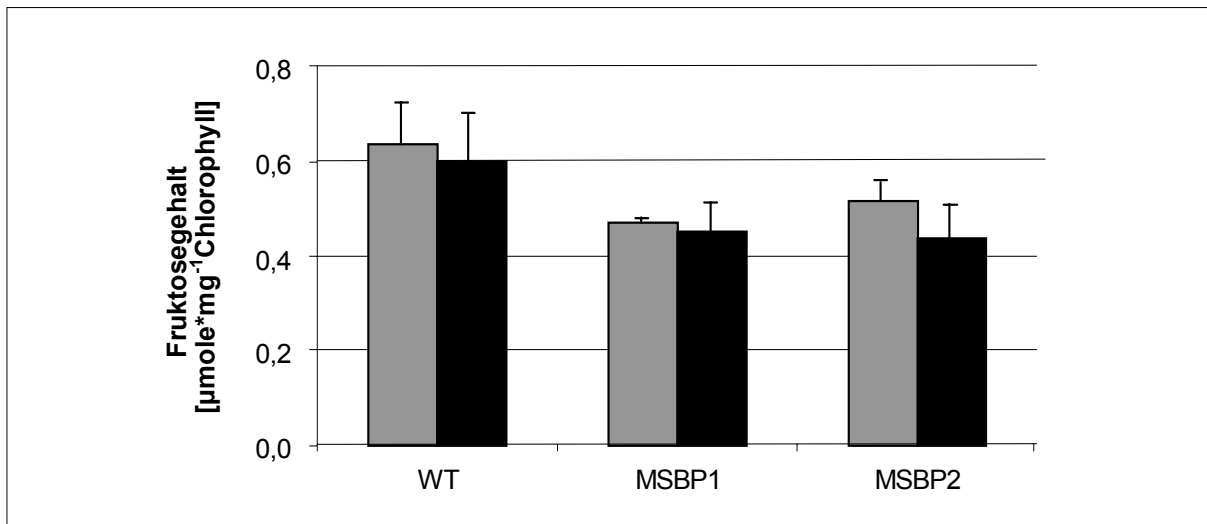


Abbildung 3.19: Vergleich der Fruktosegehalte der Wildtyp- mit denen der „knock out“-Pflanzen. Der Fruktosegehalt der Pflanzen wurde auf den Chlorophyllgehalt der Blätter bezogen. WT, Wildtyppflanzen; MSBP1, *AtMSBP1::T-DNA*; MSBP2, *AtMSBP2::T-DNA*, ■ Wert nach 10 h Belichtung, ■ Wert nach 14 h Dunkelphase.

Die Saccharosegehalte waren nach der Dunkelphase in allen drei Genotypen gleich (Abb. 3.20). Nach der Lichtphase war der Saccharosegehalt in Wildtyppflanzen leicht erhöht gegenüber den Mutanten.

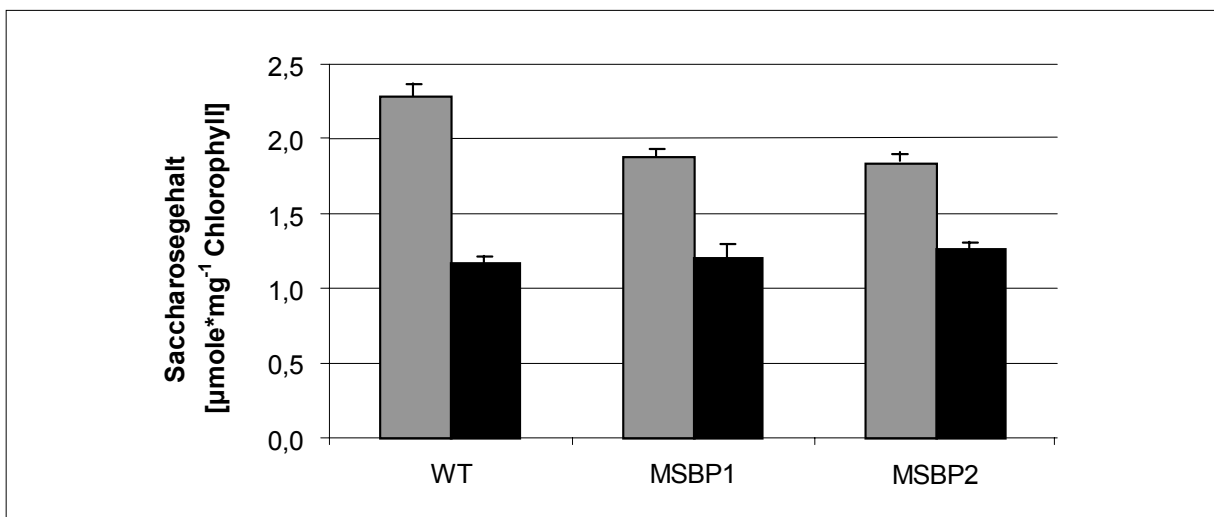


Abbildung 3.20: Vergleich der Saccharosegehalte der Wildtyp- mit denen der „knock out“-Pflanzen. Der Saccharosegehalt der Pflanzen wurde auf den Chlorophyllgehalt der Blätter bezogen. WT, Wildtyppflanzen; MSBP1, *AtMSBP1::T-DNA*; MSBP2, *AtMSBP2::T-DNA*, ■ Wert nach 10 h Belichtung, ■ Wert nach 14 h Dunkelphase.

Die Stärkegehalte waren in allen drei Genotypen gleich (Abb. 3.21). Nach der Belichtung war signifikant mehr Stärke in den Blättern als nach der Dunkelphase.

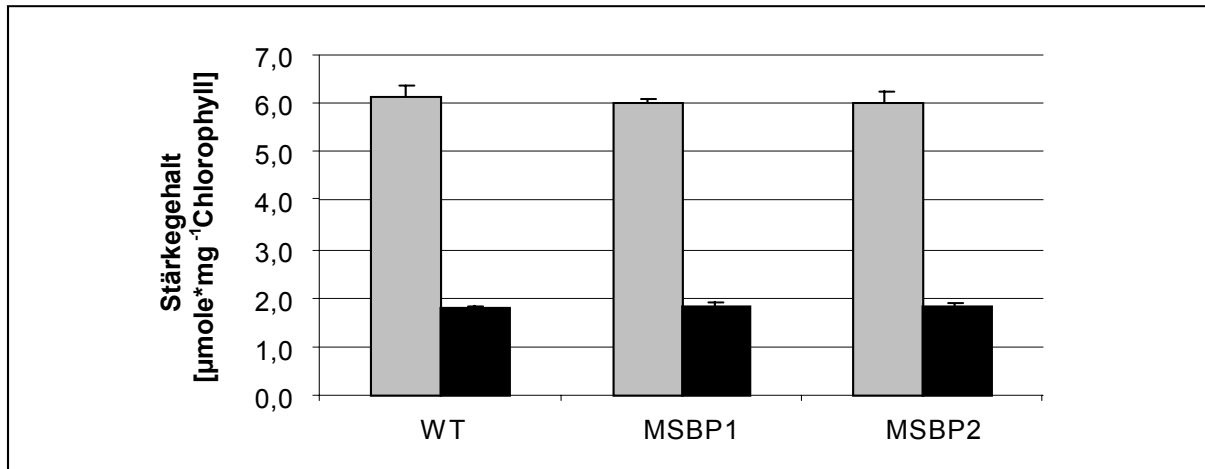


Abbildung 3.21: Vergleich der Stärkegehalte der Wildtyp- mit denen der „knock out“-Pflanzen. Der Stärkegehalt der Pflanzen wurde auf den Chlorophyllgehalt der Blätter bezogen. WT, Wildtyppflanzen; MSBP1, *AtMSBP1::T-DNA*; MSBP2, *AtMSBP2::T-DNA*, ■ Wert nach 10 h Belichtung, ■ Wert nach 14 h Dunkelphase.

Zusammenfassend zeigte sich in den „knock out“-Mutanten eine leichte Reduktion des Glukose-, des Fruktose- und des Saccharosegehaltes, bei dem Chlorophyll- und Stärkegehalt ließen sich keine Unterschiede feststellen. Somit bestanden bezüglich der Metabolitengehalte kaum signifikante Unterschiede zwischen den „knock out“-Mutanten und Wildtyppflanzen. Die MSBP-Proteine scheinen daher keinen starken Einfluss auf die Metabolitengehalte in „Source“-Blättern unter normalen Wachstumsbedingungen im Kurztag zu haben.

3.6.3 ¹⁴C-Glukose-Aufnahmeversuche an isolierten Chloroplasten

An isolierten Chloroplasten wurde der Transport von Zuckern nachgewiesen (SCHÄFER et al., 1977). In der inneren Envelopemembran der Plastiden ist der plastidäre Glukosetranslokator pGlcT lokalisiert, dem eine Rolle beim Export von Glukose aus dem Chloroplasten zugeschrieben wird (WEBER et al., 2000). Der *AtMSBP1* ist hingegen in der äußeren Plastidenmembran lokalisiert (Kap. 3.4). Zwischen dem Zytosol und dem Intermembranraum der Plastiden besteht wahrscheinlich kein Zuckerkonzentrationsunterschied. Um abzusichern, dass der *AtMSBP1* nicht doch signifikant am Glukosetransport in Chloroplasten beteiligt ist,

wurden intakte Chloroplasten aus Wildtyp- und *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen isoliert und Aufnahmeversuche mit ^{14}C -Glukose durchgeführt.

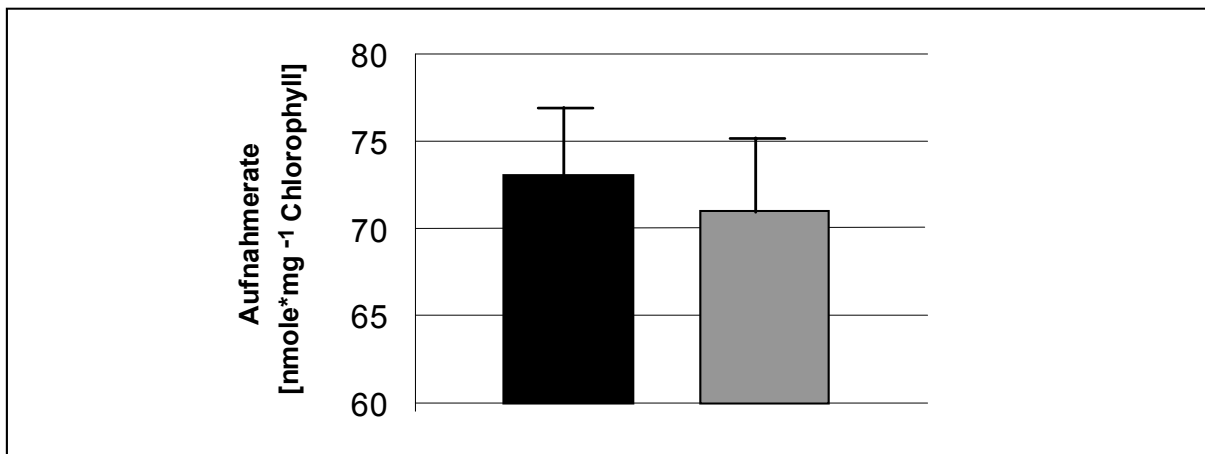


Abbildung 3.22: Vergleich der ^{14}C -Glukose-Aufnahme an isolierten Chloroplasten aus Wildtyp- und „knock out“-Pflanzen. Die Aufnahmedauer betrug 3 Sekunden, ■, Wildtyppflanzen; ▒, *AtMSBP1::T-DNA*.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Aufnahmeraten für ^{14}C -Glukose an isolierten Chloroplasten aus Wildtyp- und *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3.22). Der *AtMSBP1* scheint nicht substantiell am Transport der Glukose über die Plastidenmembranen beteiligt zu sein.

3.6.4 Wachstum der „knock out“-Mutanten und Wildtyppflanzen auf zuckerhaltigen Medien

Steigende Zuckerkonzentrationen bei der Anzucht von Pflanzen führen zu einer Störung oder Hemmung des Wachstums und der Entwicklung (JANG et al., 1997). Verschiedene *Arabidopsis*-Mutanten, die bezüglich ihrer Reaktion auf Zucker stark beeinflusst sind, konnten bei der Anzucht auf erhöhten Zuckerkonzentrationen identifiziert werden. Diese Mutanten werden zur Aufklärung der zuckerbeeinflussten Genregulation herangezogen.

Die bisherigen Analysen der MSBP-„knock out“-Mutanten zeigten keinen signifikanten Einfluss der MSBP-Proteine in *Arabidopsis*-Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen. Um so interessanter war die Frage, ob die MSBP-Proteine unter erhöhten Zuckerkonzentrationen eine Rolle im Zuckerstoffwechsel spielen. Wenn die MSBP-Proteine eine Funktion beim Zuckertransport (oder auch beim

Zuckersensing) haben, sollte bei der Anzucht der Mutanten auf erhöhten Zuckerkonzentrationen eine veränderte Reaktion im Vergleich zu den Wildtyppflanzen zu beobachten sein. Um den Einfluss verschiedener Zucker in unterschiedlichen Konzentrationen auf die „knock out“-Pflanzen zu testen, wurden diese mit Zuckern, Zuckeralkoholen oder Zuckeranaloga in steigenden Konzentrationen auf MS-Medium in Sterilkultur angezogen (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002).

Beim Vergleich des Wachstums auf 1, 2,5 und 5 % Saccharose konnten kaum Unterschiede zwischen den „knock out“- und den Wildtyppflanzen festgestellt werden (5 % Saccharose, Abb. 3.23). Bei 5 % Saccharose im Medium war das Wachstum der Pflanzen leicht gehemmt im Vergleich zu 1 oder 2,5 % Saccharose im Medium (Daten nicht gezeigt).

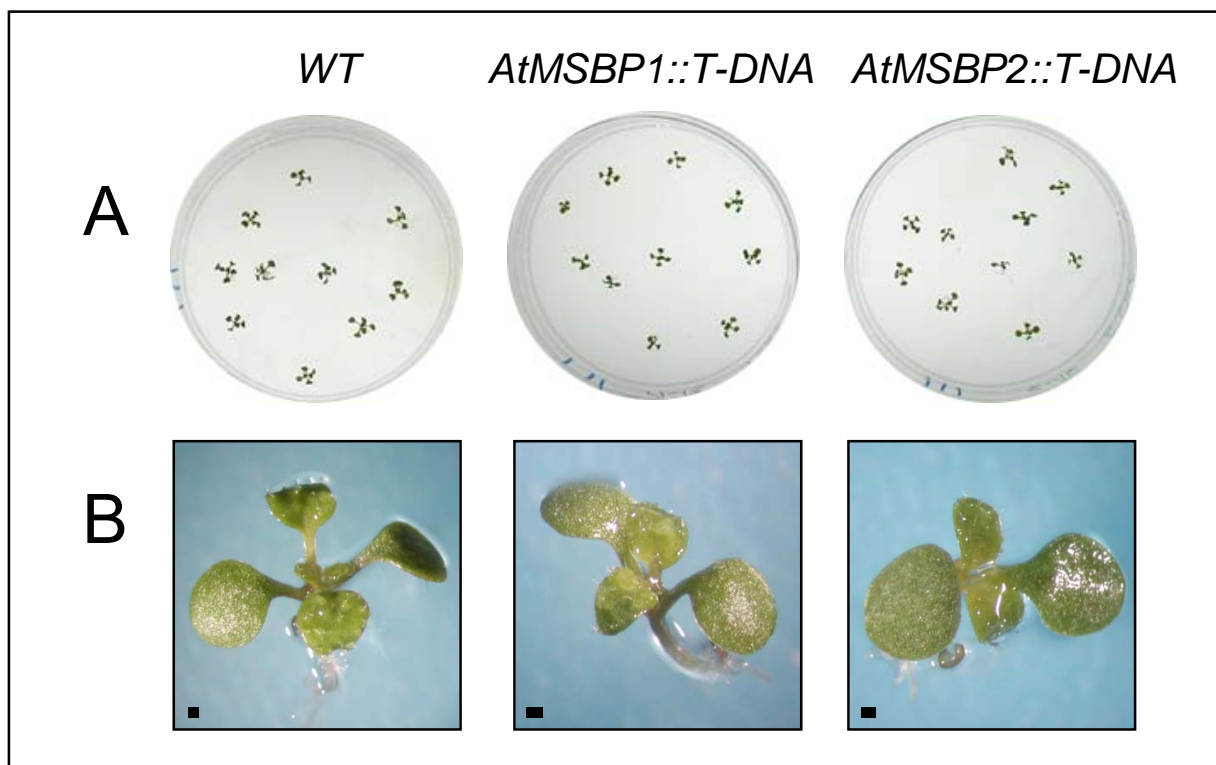


Abbildung 3.23: Vergleich des Wachstums der Wildtyp- mit den „knock out“-Pflanzen auf 5 % Saccharose. A, Platten mit 13 Tage alten Pflanzen; B, Detailaufnahme von 11 Tage alten Pflanzen. Die Balken entsprechen je 1 mm.

Bei 5 % Glukose im Medium war das Wachstum reduziert im Vergleich zu niedrigeren Glukosekonzentrationen. Bei *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Mutanten wurde die Entwicklung stärker beeinträchtigt als bei den Wildtyppflanzen, die Keimungseffizienz sank ebenfalls (Abb. 3.24). Die „knock out“-Mutanten reagierten

somit sensitiver bei hohen Glukosekonzentrationen im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Dabei wurden die *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen mehr beeinträchtigt als die *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen. Betrachtet man die Morphologie der Pflanzen im Detail, sieht man, dass die Wildtyppflanzen nach 11 Tagen das 4-Blatt-Stadium erreicht hatten, während die „knock out“-Pflanzen erst zwei Blätter entwickelt hatten. Bei den *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen war kaum noch eine Bildung der Folgeblätter erkennbar.

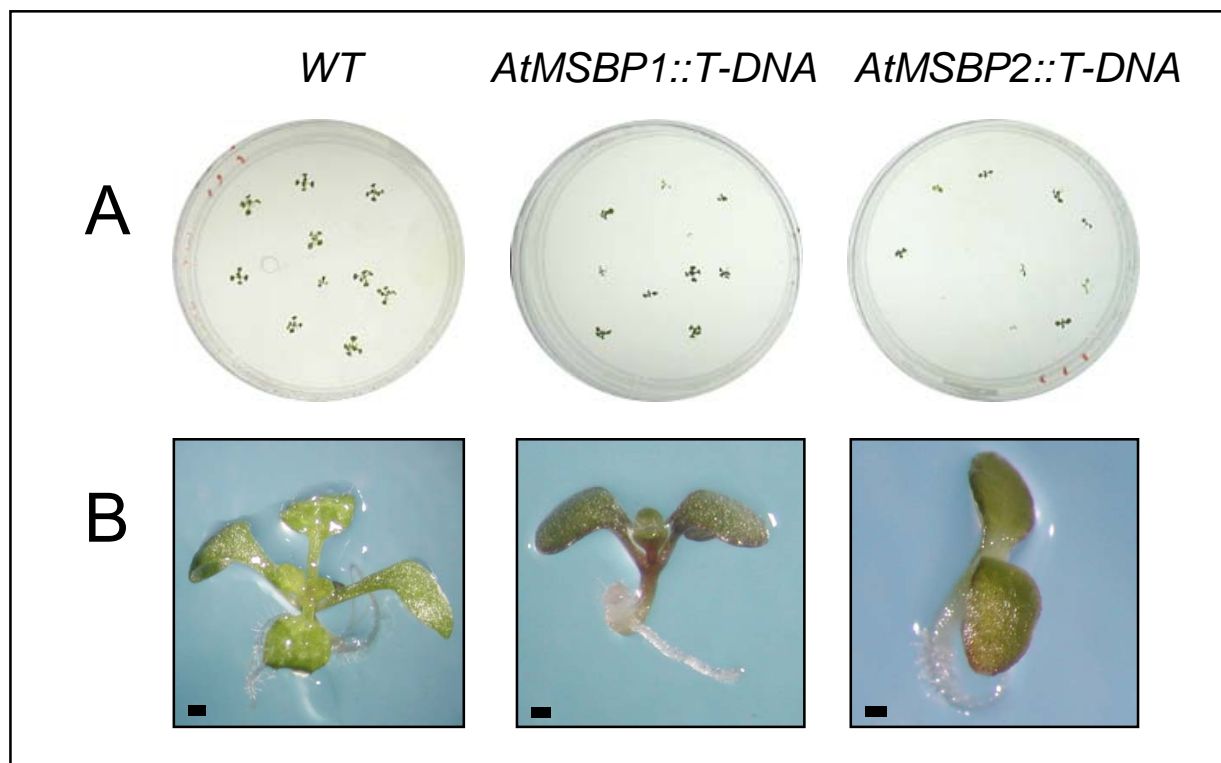


Abbildung 3.24: Vergleich des Wachstums der Wildtyppflanzen mit den „knock out“-Pflanzen auf 5 % Glukose. A, Platten mit 13 Tage alten Pflanzen; B, Detailaufnahme von 11 Tage alten Pflanzen. Die Balken entsprechen je 1 mm.

Die *Arabidopsis*-Pflanzen reagierten schon auf 1 % Fruktose im Medium sehr empfindlich mit einer Reduktion des Wachstums und bei höheren Konzentrationen auch mit einer Verminderung der Keimungseffizienz. Bei 2,5 % Fruktose wurde die Keimung und Entwicklung der Pflanzen stark beeinflusst, bei den „knock out“-Mutanten in sehr viel stärkeren Maßen als bei den Wildtyppflanzen (Abb. 3.25). Bei 5 % Fruktose keimten sogar nur 70 % der Wildtyppflanzen, die „knock out“-Pflanzen entwickelten sich nicht mehr zu vollständigen Pflanzen mit autotrophen Geweben.

Dieser Effekt war am stärksten in den *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen zu beobachten, diese entwickelten nur in 30 % der Fälle eine sehr kleine heterotrophe primäre Wurzel, die meisten Samen keimten gar nicht (Abb. 3.25, B und C).

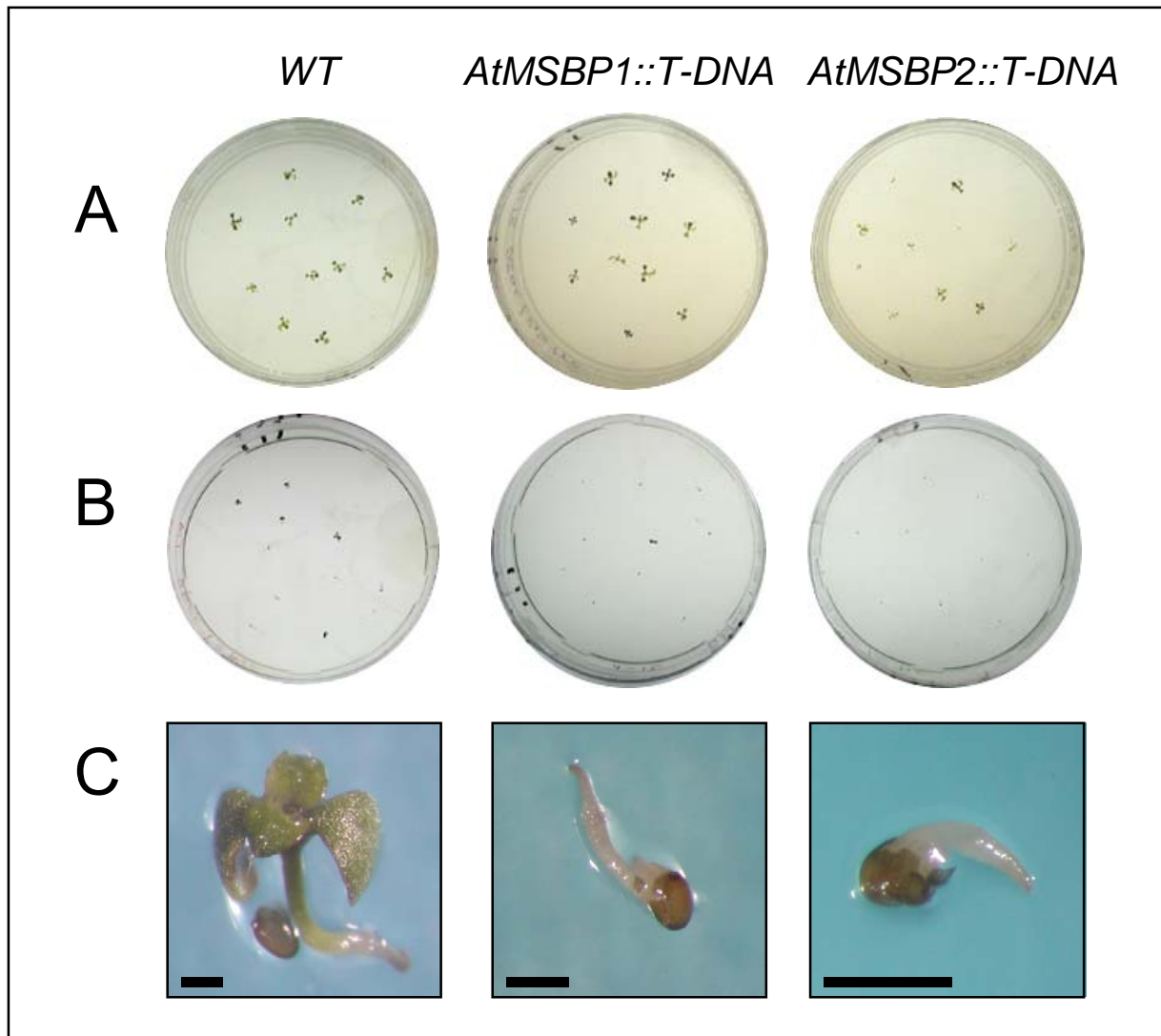


Abbildung 3.25: Vergleich des Wachstums der Wildtyppflanzen mit den „knock out“-Pflanzen auf 2,5 und 5 % Fruktose. A, Platten mit 2,5 % Fruktose, 13 Tage alte Pflanzen; B, Platten mit 5 % Fruktose, 13 Tage alte Pflanzen; C, Detailaufnahme von 11 Tage alten Pflanzen auf 5 % Fruktose. Die Balken entsprechen je 1 mm.

Um osmotische Effekte bei den Anzuchtversuchen auszuschließen, wurden die Pflanzen auf Sorbitol angezogen, welches den *Arabidopsis*-Pflanzen nicht als Zuckerquelle dienen kann. 1 % Glukose wurde dem Medium hinzugesetzt, um den *Arabidopsis*-Pflanzen dennoch eine Kohlenstoffquelle zu bieten, es wurden dementsprechend nur 4 % Sorbitol ins Medium gegeben um die Endkonzentration wieder auf 5 % Zucker im Medium einzustellen. Bei diesen Versuchen zeigten sich

keine signifikanten Unterschiede zwischen *AtMSBP1::T-DNA*-, *AtMSBP2::T-DNA*- und Wildtyppflanzen (Abb. 3.26). Alle drei Genotypen keimten allerdings sehr ungleichmäßig, entwickelten teilweise nur die Primärblätter und waren auch danach auch in ihrer Entwicklung beeinträchtigt.

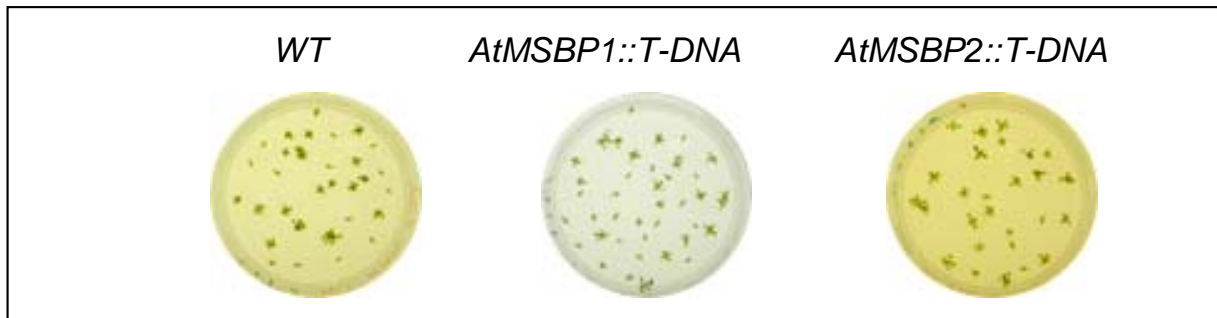


Abbildung 3.26: Vergleich der Wildtyppflanzen mit den „knock out“-Pflanzen auf Sorbitol. Die auf 1 % Glukose und 4 % Sorbitol angezogenen Pflanzen sind 13 Tage alt.

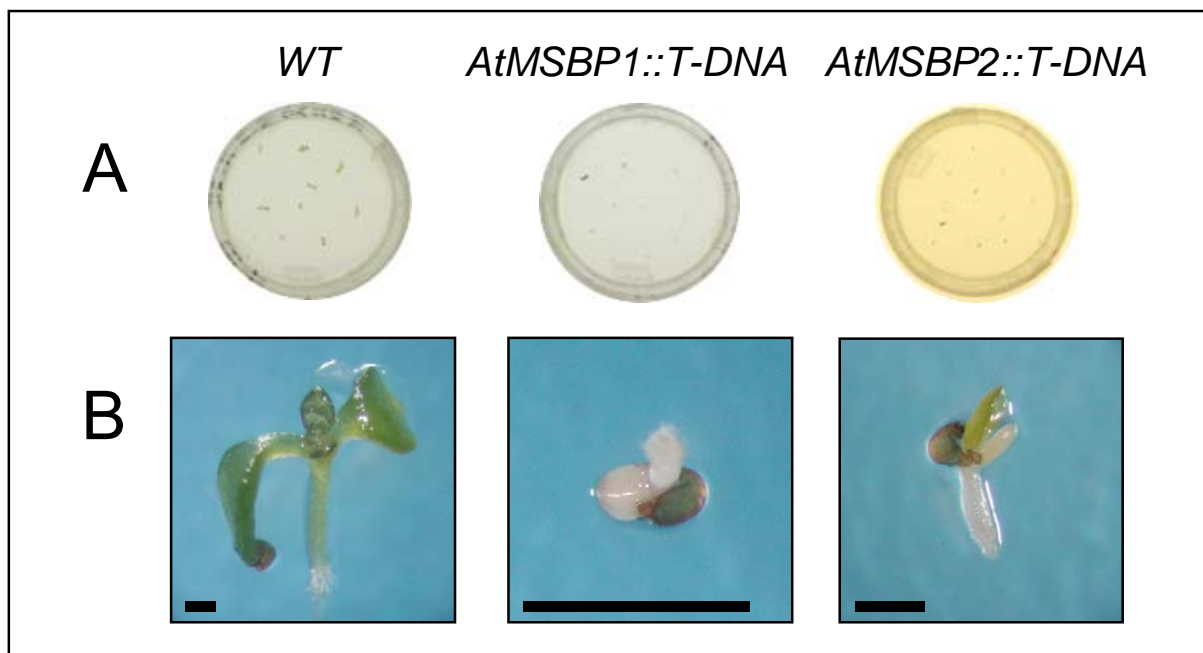


Abbildung 3.27: Vergleich der Wildtyppflanzen mit den „knock out“-Pflanzen auf 3-O-Methylglukose. Die Pflanzen wurden auf 1 % Glukose und 4 % 3-O-Methylglukose angezogen. A, Platten mit 13 Tage alten Pflanzen; B, Detailaufnahme von 11 Tage alten Pflanzen. Die Balken entsprechen je 1 mm.

Mit dem Hexosederivat 3-O-Methylglukose kann ein „Hexokinase-unabhängiges“-Zuckersensing festgestellt werden (XIAO et al., 2000; CORTÉS et al., 2003). 3-O-Methylglukose wird nur sehr eingeschränkt von der Hexokinase als Substrat

erkannt und nicht von der Zelle als Zucker genutzt (CORTÉS et al., 2003). Nach der verstärkten Reaktion der „knock out“-Mutanten auf erhöhte Zuckerkonzentrationen im Medium sollte durch die Inkubation der Pflanzen mit 3-O-Methylglukose festgestellt werden, ob die beobachteten Effekte mit dem „Hexokinase-abhängigen“-Zuckersensing in Zusammenhang stehen.

Die stärkere Hemmung der „knock out“-Mutanten zeigte sich auch bei 3-O-Methylglukose im Vergleich zu den Wildtyppflanzen (Abb. 3.27). Nur die Wildtyppflanzen konnten grüne, autotrophe Gewebe entwickeln. Auch hier wurde Glukose als Kohlenstoffquelle angeboten und dementsprechend nur 4 % 3-O-Methylglukose ins Medium gegeben. Somit reagierten die „knock out“-Pflanzen auch sensitiver auf 3-O-Methylglukose und zeigten so, dass sie unabhängig von der Hexokinase auf dieses Zuckeranalogon reagierten.

Die folgenden Abbildungen fassen noch einmal die Ergebnisse der Plattentests zusammen. Sie stellen die Keimungseffizienz, die durchschnittliche Größe der Pflanzen und die durchschnittliche Zahl der Blätter da.

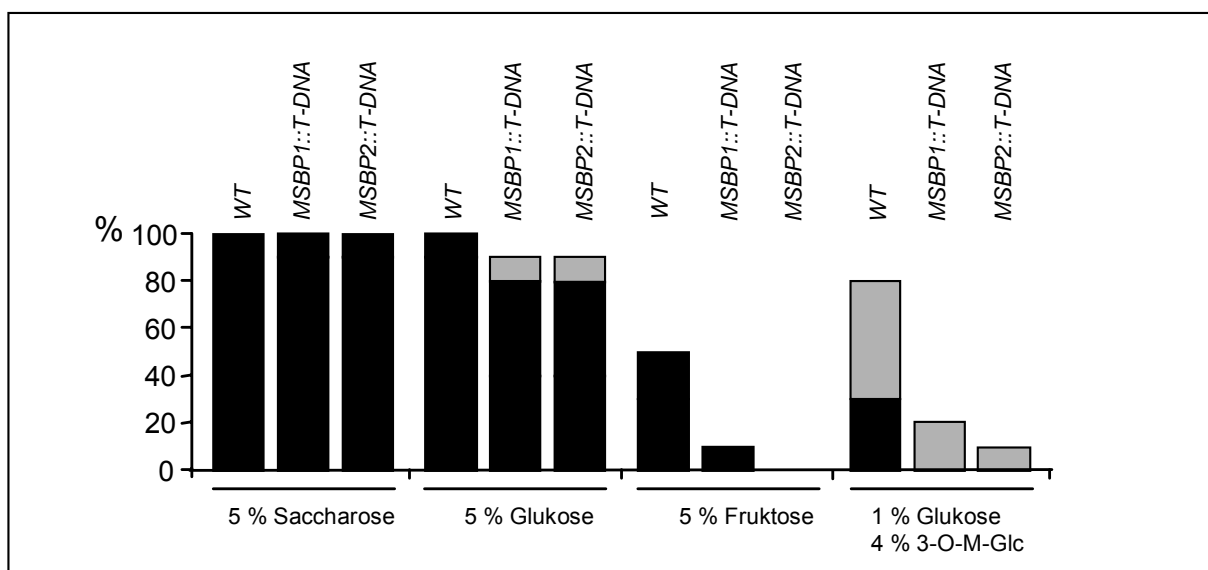


Abbildung 3.28: Keimungseffizienz der Wildtyp- und der „knock out“-Pflanzen.

Die angebotenen Zuckerkonzentrationen sind jeweils unter den Balken angegeben. Die Pflanzen waren 13 Tage alt. Schwarze Balken stellen die gekeimten Samen da, aus denen sich Pflanzen entwickelt haben; graue Balken stellen die Samen da, die zur Keimung fähig waren, aus denen sich aber keine autotrophen Pflanzen entwickelt haben.

Bei der Bestimmung der Keimungseffizienz (Abb. 3.28) zeigte sich, dass bei 5 % Saccharose die Samen aller Genotypen keimten. Bei 5 % Glukose keimten die Mutanten etwas schlechter, ein Teil der keimenden Samen entwickelte zwar eine Primärwurzel und die Primärblätter, eine weitere Entwicklung fand aber nicht statt. Bei 5 % Fruktose war dieser Effekt sehr stark. Auch die Wildtyppflanzen keimten nur zu 50 %, bei den „knock out“-Pflanzen nur 10 % der *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen, die *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen keimten nicht mehr. Wurden die Pflanzen auf 1 % Glukose und 4 % 3-O-Methylglukose angezogen, keimten auch hier die *AtMSBP::T-DNA*-Mutanten deutlich schlechter als die Wildtyppflanzen. Die „knock out“-Mutanten bildeten auch hier nur die Primärblätter und wuchsen nicht zu autotrophen Pflanzen heran. Die Keimungseffizienz spiegelte so die empfindlichere Reaktion der „knock out“-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen wieder.

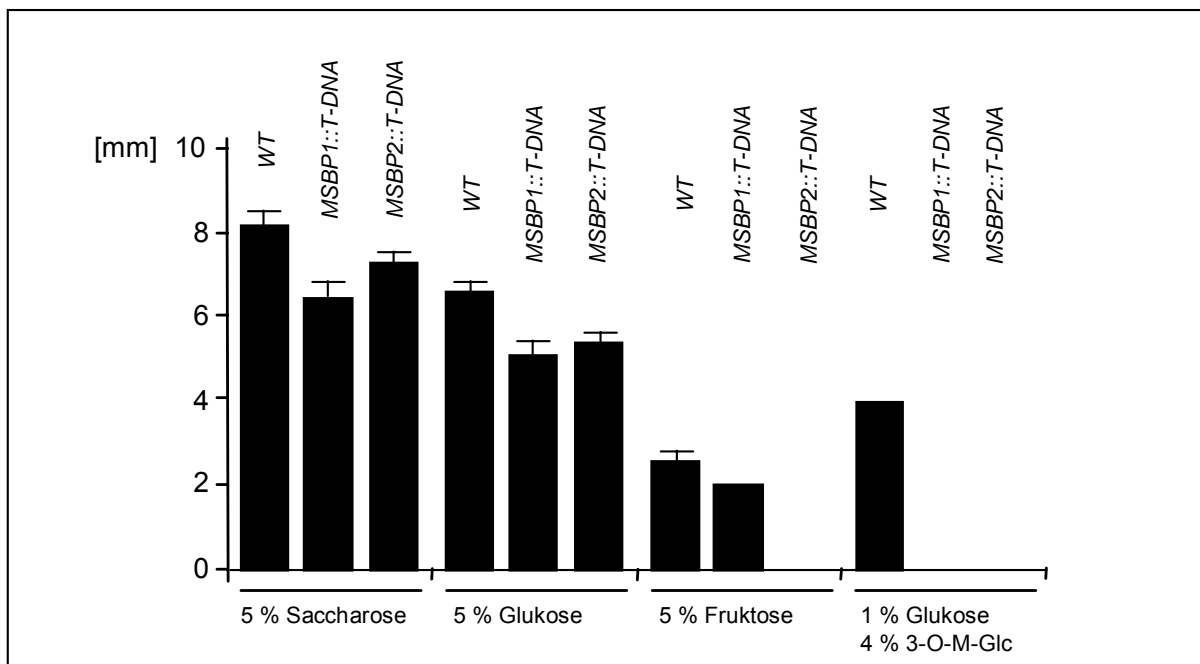


Abbildung 3.29: Durchschnittliche Pflanzengröße der Wildtyp- und der „knock out“-Pflanzen. Die Pflanzen wurden vermessen und jeweils die durchschnittliche Größe in mm bestimmt. Die angebotenen Zuckerkonzentrationen sind jeweils unter den Balken angegeben. Die Pflanzen waren 13 Tage alt.

Bei der durchschnittlichen Größe der Pflanzen (Abb. 3.29) erkennt man, dass bei 5 % Saccharose eine leichte Hemmung des Wachstums der Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen eintrat. Die auf Glukose angezogenen Pflanzen waren im Durchschnitt kleiner als die auf Saccharose angezogenen Pflanzen. Auch bei 5 %

Glukose waren die „knock out“-Mutanten etwas kleiner als die Wildtyppflanzen. Dieser Effekt wurde noch deutlicher bei 5 % Fruktose, die wenigen keimenden Pflanzen waren sehr klein und zeigten starke Stress-Symptome. Dazu gehörte unter anderem die Akkumulation von Anthocyanen (Abb. 3.25), die auch bei den auf 5 % Glukose gewachsenen „knock out“-Mutanten zu beobachten war (Abb. 3.24). Nur die Wildtyppflanzen konnten auf 1 % Glukose und 4 % 3-O-Methylglukose autotroph wachsen, die Mutanten waren dazu nicht in der Lage. Auch die durchschnittlichen Größen der Pflanzen bestätigten somit die verstärkte empfindliche Reaktion der „knock out“-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen.

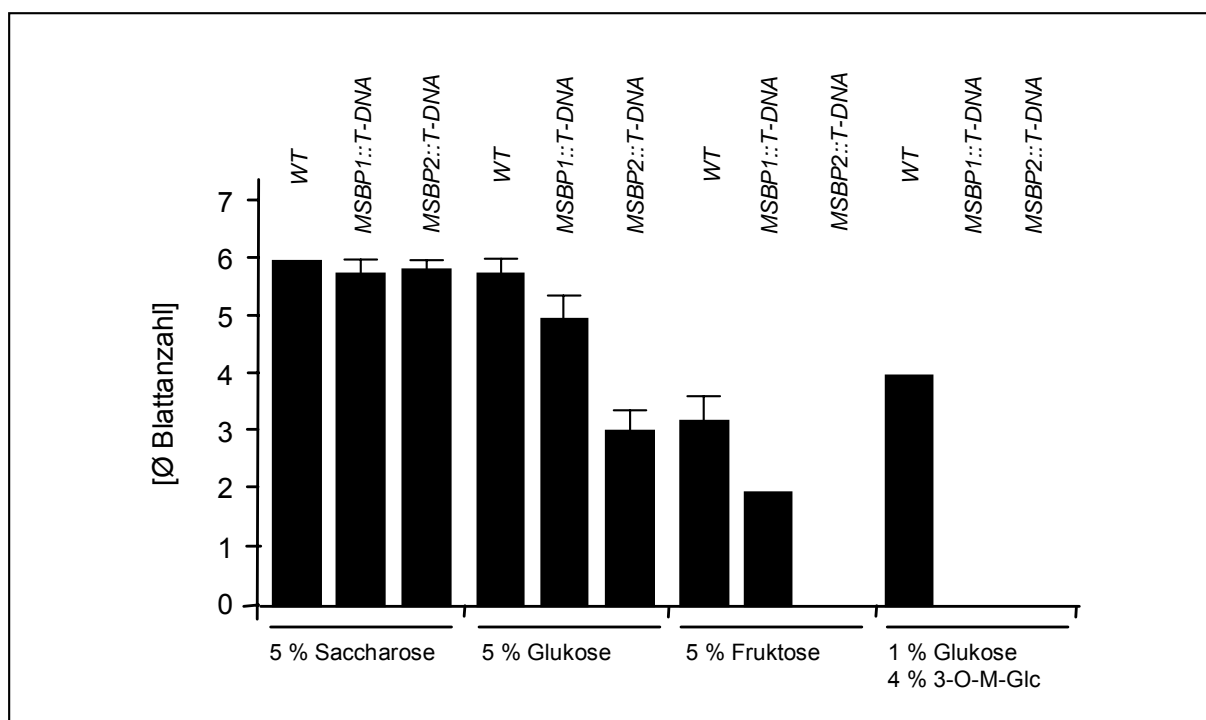


Abbildung 3.30: Durchschnittliche Blattanzahl der Wildtyp- und der „knock out“-Pflanzen. Die angebotenen Zuckerkonzentrationen sind jeweils unter den Balken angegeben. Die Pflanzen waren 13 Tage alt.

Bei der Errechnung der durchschnittlichen Blattzahl (Abb. 3.30) zeigte sich bei 5 % Saccharose eine leichte Reduktion bei den „knock out“-Mutanten im Vergleich mit den Wildtyppflanzen. Bei der Anzucht auf 5 % Glukose und Fruktose bildeten sich deutlich weniger Blätter bei den *AtMSBP::T-DNA* Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen. Auf 1 % Glukose und 4 % 3-O-Methylglukose konnten nur die Wildtyppflanzen autotrophe Blätter bilden. Die stärkere Reaktion der „knock out“-

Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen zeigte sich folglich auch bei der durchschnittlichen Blattzahl.

Zusammenfassend zeigt sich deutlich, dass die „knock out“-Mutanten empfindlicher auf erhöhte Zuckerkonzentrationen im Vergleich zu den Wildtyppflanzen reagierten. Dabei war die Reaktion auf erhöhte Monosaccharidkonzentrationen sehr viel stärker als auf erhöhte Disaccharidkonzentrationen. Auch auf das Hexoseanalog 3-O-Methylglukose erfolgte eine überempfindliche Reaktion. Dies zeigt, dass die hier zu beobachtenden Reaktionen unabhängig von der im Zuckersensing involvierten Hexokinase waren.

3.6.5 Molekulare Analysen der Effekte verschiedener Zucker auf den Transkriptionsgehalt ausgewählter zuckerbeeinflusster Gene bei den *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen

Viele pflanzliche Gene reagieren sensitiv auf den Zuckerstatus und den Zuckerfluss in der Zelle und im Gewebe. Dies dient der zellulären Anpassung an die Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit und zur Kontrolle der Ressourcen-verteilung zwischen den Geweben und Organen. Bei der Abnahme von Zuckern werden die Gene für die Photosynthese, für die Mobilisierung von Reserven und für Exportprozesse hoch reguliert („Famine“-Gene). Hingegen werden die Gene für die Speicherung von Kohlenstoffen und Proteinen und für verschiedenen Neusynthesen bei der Zunahme von Zuckern positiv beeinflusst („Feast“-Gene) (KOCH, 1996). Transgene Pflanzen mit Veränderungen der Expression von Genen des Zuckerstoffwechsels, wie z. B. der am Zuckersensing beteiligten Hexokinase, zeigen eine weitreichende Änderung des Expressionsmusters vieler zuckersensitiver Gene.

Da die „knock out“-Pflanzen auf die Erhöhung der Zuckerkonzentration im Medium eine überempfindliche Antwort auf der phänotypischen Ebene zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass in diesen Mutanten die Expression der zuckersensitiven Gene verändert ist als Reaktion auf die Erhöhung der Zuckergehalte. Die Untersuchung der Expression verschiedener zuckersensitiver Gene bietet die Möglichkeit weitere Einblicke in die Rolle der MSBP-Proteine im pflanzlichen Zuckerstoffwechsel zu erhalten. Allerdings könnte die mehrwöchige Anzucht der „knock out“-Mutanten und Wildtyppflanzen auf zuckerhaltigen Agarmedien in Sterilkultur zu Artefakten durch

auftretende pleiotrope metabolische Änderungen in den durch die Zucker phänotypisch stark gehemmten Pflanzen führen. Um diese Effekte zu vermeiden, wurden für die Studien der Genexpression zuckersensitiver Gene auf Erde angezogene Pflanzen verwendet, da diese keine signifikanten phänotypischen Auffälligkeiten zeigten (Abb. 3.16 – 3.21).

Um ein System für die Analyse der zuckersensitiven Gene zu erhalten, wurden zunächst Blattscheiben von auf Erde angezogenen Wildtyppflanzen verwendet. Die verwendeten Pflanzen wurden im Kurztag angezogen und für 3 Stunden vor dem Ausstechen der Blattscheiben belichtet. Die Blattscheiben wurden für 24 h im Dunkeln in Wasser oder steigenden Glukosekonzentrationen inkubiert (0 – 250 mM) (NEUHAUS & STITT, 1989). Aus den Proben wurde Gesamt-RNA isoliert und Northern-Blots erstellt. Die Blots wurden mit spezifischen Sonden für zuckersensitive Gene hybridisiert und die Signale quantifiziert. Zu den durch Zucker reprimierten Genen gehören die Gene für das *Chlorophyll_{ab} Binding Protein (CAB)* und für *Plastocyanin (PC)*. Das Gen für die *Nitratreduktase (NR)* wird hingegen durch Zucker induziert (KOCH, 1996).

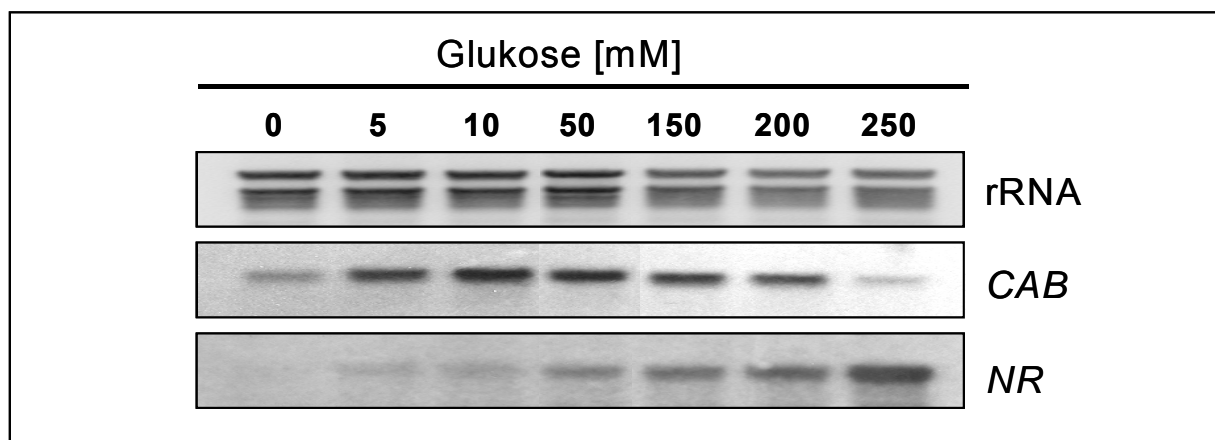


Abbildung 3.31: Inkubation von „Source“-Blattscheiben mit steigenden Glukosekonzentrationen. *CAB*, *Chlorophyll_{ab} Binding Protein*; *NR*, *Nitratreduktase*.

Steigende Glukosekonzentrationen führten in den verwendeten „Source“-Blättern zunächst zu einer Stimulierung der *CAB*-mRNA-Akkumulation, ab einer Konzentration von 50 mM verringerte sich der mRNA-Gehalt allerdings wieder (Abb. 3.31).

Im Gegensatz dazu stieg der Gehalt der mRNA für die *NR* kontinuierlich in Korrelation mit steigenden Glukosekonzentrationen in den „Source“-Blättern an (Abb. 3.31). Diese Ergebnisse zeigten, dass die ausgewählten Gene wie erwartet auf die

Inkubation mit Zucker reagieren (KOCH, 1996). Somit scheint unser System für die Untersuchung der zuckerinduzierten Effekte bei den „knock out“-Mutanten geeignet. Für die Versuche wurde eine Zuckerkonzentration von 100 mM ausgewählt.

Weiterhin wurde der mRNA-Gehalt der einzelnen Gene vor der Inkubation der Blattscheiben getestet, indem Blattproben direkt in flüssigem Stickstoff bei der Ernte eingefroren wurden. Dies zeigte den mRNA-Gehalt der untersuchten zuckersensitiven Gene in „Source“-Blättern unter normalen Wachstumsbedingungen bei allen drei Genotypen. Wie Abbildung 3.32 zeigt, war der mRNA-Gehalt der *CAB*, des *PC* und der *NR* in den *AtMSBP1::T-DNA*-, *AtMSBP2::T-DNA*- und den Wildtyppflanzen jeweils ähnlich hoch. Der *NR*-mRNA-Gehalt war aber in allen drei Genotypen deutlich niedriger als die mRNA-Gehalte der lichtinduzierten Gene *CAB* und *PC*.

Für die Untersuchung der Veränderung der zuckerinduzierten Genexpression in den „knock out“-Mutanten wurden die Blattscheiben mit je 100 mM Saccharose, Glukose, Fruktose und Sorbitol 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation in Wasser im Dunkeln. Sie zeigte die Veränderung der Genexpression der untersuchten Gene ohne die Zugabe von Zuckern nach 24 h im Dunkeln. Sorbitol diente als Kontrolle für osmotische Effekte während des Versuches, da dieser Zuckeralkohol kaum in den Stoffwechsel von *Arabidopsis* einfließt.

Die mRNA-Gehalte der *CAB*, des *PC* und der *NR* waren in allen drei Genotypen nach 24 Stunden Dunkelinkubation im Wasser sehr niedrig (Abb. 3.32). Diese Hemmung der Genexpression zeigte die Energieverarmung der Zellen nach 24 h Inkubation im Dunkeln.

Bei der Inkubation aller drei Genotypen mit dem als Kontrolle verwendeten Zuckeralkohol Sorbitol (100 mM) waren nur geringe Unterschiede in der Akkumulation der mRNA der *CAB*, des *PC* und der *NR* zu verzeichnen (Abb. 3.32). Es zeigte sich aber eine gleichmäßige Stimulierung bzw. Hemmung der mRNA-Akkumulation der untersuchten Gene im Vergleich zu der Wasserprobe. Dies deutet darauf hin, dass Sorbitol doch von den Zellen als Zuckerquelle genutzt werden konnte.

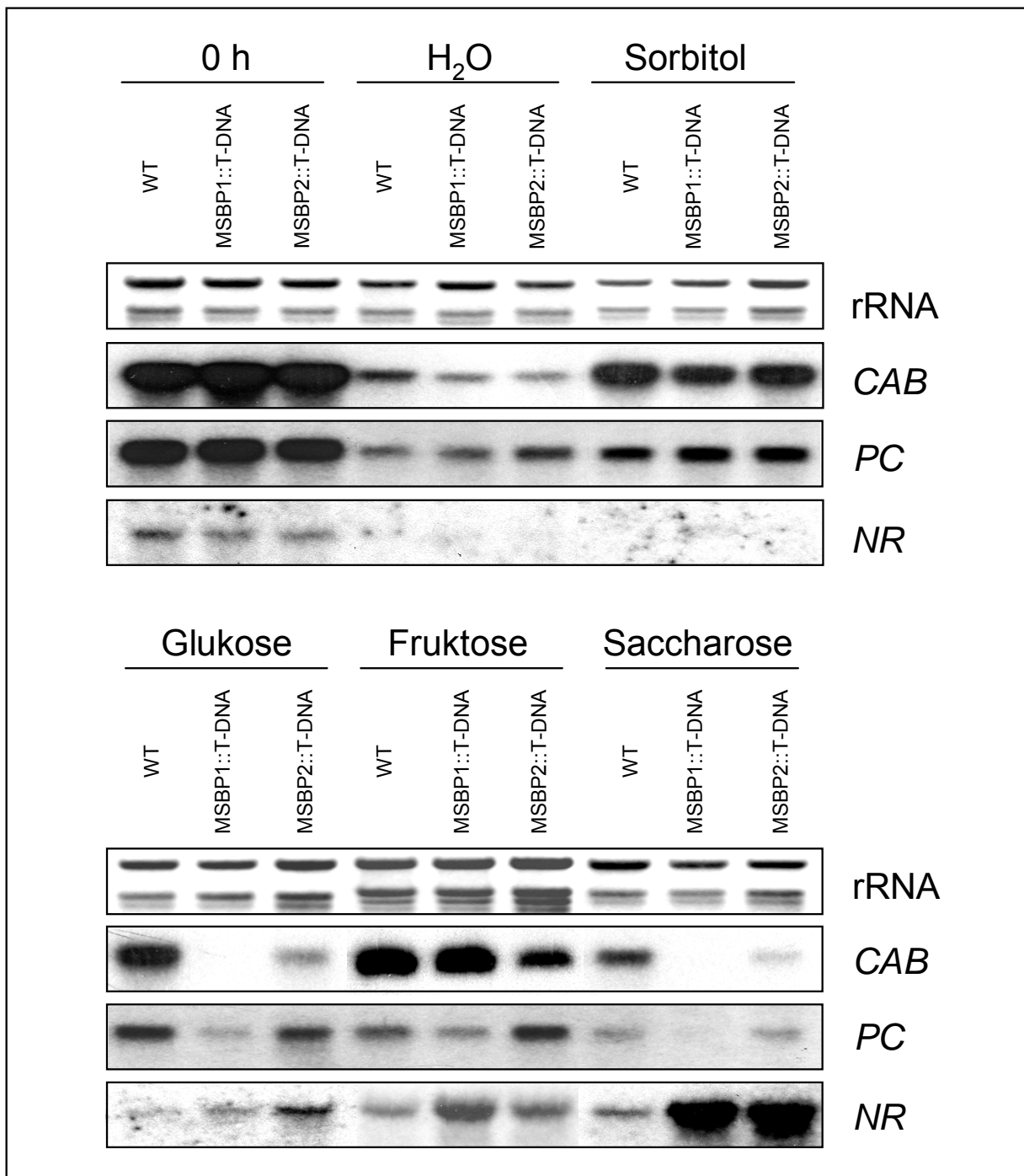


Abbildung 3.32: mRNA-Akkumulation zuckerempfindlicher Gene bei der Inkubation von „Source“-Blattscheiben mit unterschiedlichen Zuckern. Die Blattscheiben wurden 3 h nach Beginn der Lichtphase geerntet, die Inkubation in je 100 mM des jeweiligen Zuckers erfolgte für 24 h im Dunkeln. 0 h, Blattkontrolle; H₂O, Wasserkontrolle; WT, Wildtyp; CAB, Chlorophyll_{a/b} Binding Protein; NR, Nitratreduktase; PC, Plastocyanin.

Die mRNA-Gehalte der zuckerempfindlichen Gene in den mit 100 mM Zucker inkubierten Blattscheiben zeigten hingegen eine sehr verstärkte sensitive Reaktion der „knock out“-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen (Abb. 3.32).

Nach 24 Dunkelinkubation mit 100 mM Glukose war der *CAB*-mRNA-Gehalt bei den Wildtyppflanzen deutlich höher als in den beiden „knock out“-Mutanten. In *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen war keine *CAB*-mRNA mehr detektierbar, in *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen nur sehr schwach. Bei der Inkubation mit Saccharose zeigte sich ein ähnliches Bild. In den Wildtyppflanzen war *CAB*-mRNA nachweisbar, während in den „knock out“-Mutanten kaum Signale zu verzeichnen waren. Dies zeigte deutlich, dass auch auf molekularer Ebene die „knock out“-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen sensitiver auf erhöhte Zuckerkonzentrationen reagieren, da das *CAB*-Gen zu den durch hohe Zuckerkonzentrationen gehemmten Genen gehört. Bei der Inkubation der Blattscheiben in 100 mM Fruktose war das Signal der *CAB*-mRNA *AtMSBP2::T-DNA*-Mutante sehr viel geringer im Vergleich zu dem der Wildtyppflanzen, das Signal der *AtMSBP1::T-DNA*-Mutanten war hingegen so stark wie das der Wildtyppflanzen. Bei Fruktose reagierte also nur die *AtMSBP2::T-DNA*-Mutante eindeutig empfindlicher.

Das ebenfalls durch Zucker negativ regulierte Plastocyanin zeigte bei Glukose, Fruktose und Saccharose ebenfalls eine im Vergleich zum Wildtyp stärkere Hemmung der mRNA-Akkumulation bei den „knock out“-Pflanzen (Abb. 3.32), diese Hemmung war bei den *AtMSBP1::T-DNA*-Mutanten sehr stark.

Durch Inkubation in 100 mM Glukose nahm die *NR*-mRNA zu bei den *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyppflanzen (Abb. 3.32). Bei 100 mM Saccharose akkumulierte der *NR*-mRNA-Gehalt in den „knock out“-Pflanzen noch stärker als bei Glukose. Auch bei Inkubation mit 100 mM Fruktose war die mRNA-Akkumulation der *NR*-Gene ausgeprägter als in den Wildtyppflanzen, auch hier reagierte die „knock out“-Mutante *AtMSBP1::T-DNA* stärker.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass wie auch schon bei der Anzucht auf zuckerhaltigen Medien, bei den „knock out“-Mutanten *AtMSBP1::T-DNA* und *AtMSBP2::T-DNA* auch auf molekularer Ebene eine verstärkte Reaktion gegenüber der Zuckerapplikation zu beobachten ist.

3.7 Untersuchungen zur möglichen Funktion des zentralen Loops der MSBP-Proteine

Die Mitglieder der MSBP-Typ-Protein-Familie heben sich vor allem durch den großen zentralen hydrophilen Loop von anderen bisher bekannten Zuckertransportern ab. Der Loop in der Mitte der MSBP-Proteine zwischen den transmembranen Helices 6 und 7 ist mit 330 Aminosäuren 3 bis 5 mal so lang wie in klassischen Zuckertransportern (Abb. 3.1 und 3.2). Dieser Loop ist nur in den Mitgliedern der MSBP-Familie etwas kürzer, die eine N-terminale Verlängerung aufweisen (Abb. 3.3; OsMSBP1 und SbMSBP1).

Eine weitere Besonderheit dieser neuartigen Mitglieder der Zuckertransporterfamilie liegt in der Mitte des zentralen Loops. Dort befindet sich eine stark negativ geladene aspartatreiche Region. Sie ist in allen MSBP-Proteinen vorhanden und kommt zudem in einigen Proteinen vor, die an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind.

Der große zentrale Loop weist auf eine besondere Funktion der MSBP-Proteine im pflanzlichen Zuckerstoffwechsel hin. Bisher konnte für die MSBP-Proteine noch keine Zuckertransportfunktion nachgewiesen werden, weder im heterologen Hefesystem (Kap. 3.2), noch beim Vergleich der ^{14}C -Glukoseaufnahme an isolierten Chloroplasten aus „knock out“- und Wildtyppflanzen (Kap. 3.6.3, Abb. 3.22). Somit scheint die Funktion der MSBP-Proteine nicht im Transport von Zuckern zu liegen.

Extreme Sequenzerweiterungen findet man auch bei Zuckertransportern, die am Zuckersensing beteiligt sind. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben die beiden Zuckersensoren RGT2 und SNF3 eine C-terminale Sequenzerweiterung, die wichtig für die Generation des Glukosesignals ist (ÖZCAN et al, 1996b, 1998; VAGNOLI et al., 1998). Diese ist 4 bis 6 mal so lang wie bei den anderen Zuckertransportern der Hefe. Bei dem Zuckertransporter und Sensor GLUT2 aus dem Menschen liegt die Sensorfunktion im verlängerten zentralen Loop (GUILLEMAIN et al., 2000).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, weist die Struktur der MSBP-Proteine auf eine mögliche Rolle beim Zuckersensing der Pflanzen hin. Diese Vermutung wird durch die sensitivere Reaktion der „knock out“-Pflanzen auf steigende Zuckerkonzentrationen unterstützt. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, welche Rolle der zentrale Loop für die mögliche Zuckersensing-Funktion der MSBP-Proteine spielt.

Um die Funktion des zentralen *AtMSBP1*-Loops zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurden Fusionskonstrukte aus dem Glukosetransporter GTR des Cyanobakteriums *Synechocystis 6803* und dem *AtMSBP1* erstellt, die Aufschlüsse über die Funktion des Loops im heterologen *Synechocystis*-System geben sollen (Kap. 3.2). Ein weiterer Ansatz bestand in der Erzeugung von transgenen Pflanzen, die den *AtMSBP1*-Loop im Zytosol oder in den Plastiden überexprimieren sollen. Weiterhin wurden *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionsproteine erstellt und transient in Tabakprotoplasten und Zwiebelepidermismzellen exprimiert.

3.7.1 *AtMSBP1*-Loop-„Sense“-Pflanzen

Um Aufschluss über die Funktionen des *AtMSBP1*-Loops zu gewinnen, sollten transgene „Sense“-Pflanzen erzeugt werden, die erhöhte Gehalte des *AtMSBP1*-Loops im Zytosol oder im Stroma der Plastiden besitzen. Für die Erzeugung der „Sense“-Pflanzen mit der zytosolischen Lokalisation des *AtMSBP1*-Loops wurde der *AtMSBP1*-Loop mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *PstI* in den Zwischenvektor pA35S (GLEAVE et al., 1992) und von dort aus zusammen mit einem CaMV35S-Promotor und einem OCSpA-Terminator über *EcoRI* und *HindIII* in den binären Pflanzenvektor PDE1001 (Plant Genetics Systems) kloniert (Abb. 7.4). Für das „Sense“-Konstrukt mit der plastidären Lokalisation des *AtMSBP1*-Loops wurde vor den *AtMSBP1*-Loop über eine *XbaI* Schnittstelle die Leadersequenz der kleinen Untereinheit der RubisCO (*pSSU*) aus *Arabidopsis* kloniert. Ansonsten wurde das Konstrukt in gleicher Weise kloniert wie das Konstrukt für die zytosolische Lokalisation des *AtMSBP1*-Loops (Abb. 7.4).

Mit den Konstrukten wurden über das *Agrobacterium GV 3101 Arabidopsis*-Pflanzen (Var. *Columbia*) transformiert. Die Samen dieser Pflanzen wurden auf kanamycinhaltigem MS-8-Medium angezogen (Kap. 2.2.2). Dies gewährt, dass nur transformierte Pflanzen durch die Vektor vermittelte Resistenz heranwachsen können. Nach der Transformation mit dem plastidären *AtMSBP1*-Loop-„Sense“-Konstrukt konnten mehrere transgene Pflanzen erhalten werden. Bei dem zytosolischen Konstrukt war keine Pflanze überlebensfähig nach dem Umsetzen von den kanamycinhaltigen Medien auf Erde von den 10 zunächst auf Kanamycin überlebenden Pflanzen.

Die Pflanzen mit dem plastidären Konstrukt wurden über eine PCR-Reaktion auf genomischer DNA-Ebene überprüft. Dazu wurde der „sense“-Primer pSSU1 für die Amplifizierung der *pSSU* und der „Antisense“-Primer ML 34 für den *AtMSBP1*-Loop genutzt (Tab. 2.4). Da das entstehende Produkt nicht natürlich in der Pflanze vorkommt, konnte so ein schneller Nachweis für die erfolgreiche Transformation erbracht werden. Die F2-Generation dieser Pflanzen steht inzwischen für erste Funktionsanalysen zur Verfügung.

3.7.2 Lokalisation von *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionsproteinen in Pflanzenzellen

Der Zuckertransporter GLUT2 aus dem Menschen spielt eine Rolle beim Zuckersensing der Leberzellen. Wird sein verlängerter zentraler Loop mit dem GFP-Protein fusioniert, akkumuliert das Fusionsprotein in signifikanter Weise im Kern (GUILLEMAIN et al., 2000). Dies wird auf eine Interaktion des *HsGLUT2*-Loops mit löslichen Faktoren zurückgeführt. Um zu überprüfen, ob der *AtMSBP1*-Loop ähnlich mit löslichen Faktoren interagiert, wurde ein *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt erstellt und transient in Tabakprotoplasten exprimiert.

Der zentrale Loop-Bereich des *AtMSBP1* wurde mittels PCR amplifiziert und über *XbaI* und *XhoI* Schnittstellen in den Vektor GFP2 (KOST et al., 1998) kloniert (Tab. 2.2, pEM 575). Am N-Terminus des Loops wurde ein Startcodon eingefügt und das Stopcodon wurde entfernt unter Erhaltung des Leserasters.

Bei der transienten Transformation von Tabakprotoplasten mit dem *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt akkumulierte die Fluoreszenz im UV-Licht im Zytosol und sehr stark im Kern (Abb. 3.33). Dies deutet darauf hin, dass auch der *AtMSBP1*-Loop wie der *HsGLUT2*-Loop mit löslichen Faktoren interagiert, die das *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt in den Kern „ziehen“. Das *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt ist mit ca. 64 kDa zu groß, um unspezifisch durch die Kernporen in den Kern zu gelangen, die eine Ausschlussgröße von 40 - 60 kDa aufweisen (GÖRLICH & MATTAJ, 1996; VON ARMIN et al., 1998).

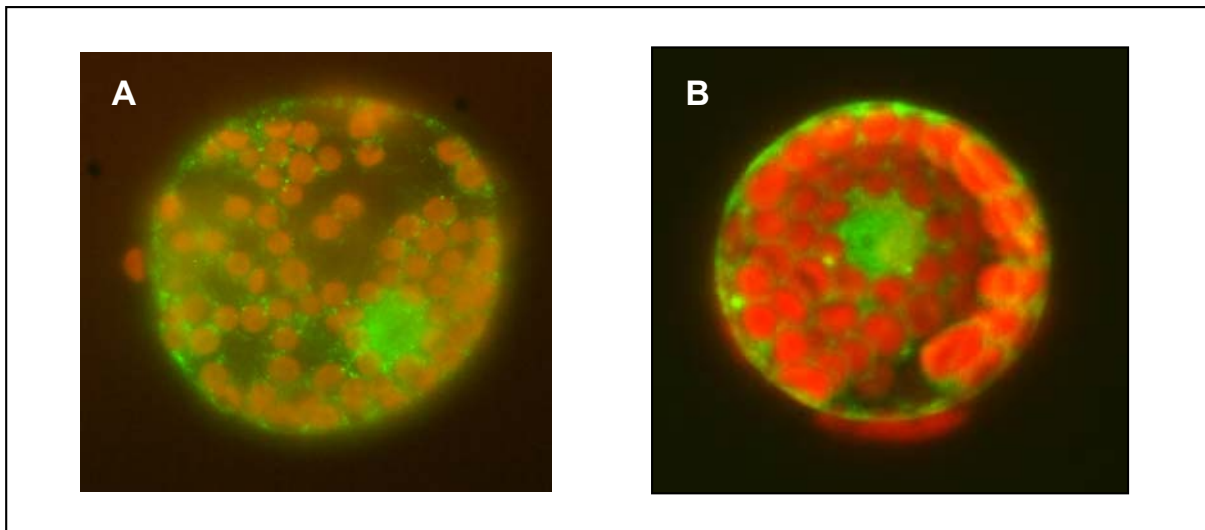


Abbildung 3.33: Transiente Expression des *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstruktes in Tabakprotoplasten. A, B: UV-Licht, rot: Autofluoreszenz des Chlorophylls.

Die Akkumulation des *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstruktes im Kern der transient transformierten Zellen lässt den Schluss zu, dass ebenso wie beim *HsGLUT2*-Loop eine Interaktion des *AtMSBP1*-Loops mit löslichen Faktoren stattfindet, die im Kern akkumulieren können.

3.7.3 Analyse der aspartatreichen Domäne im zentralen Loop der *AtMSBP*-Proteine

In der Mitte des zentralen langen Loops (AS 182 – 512) befindet sich eine außergewöhnliche, stark negativ geladene aspartatreiche Region. Zwischen den 20 Aminosäuren 355 – 374 des *AtMSBP1*-Loops liegen 11 Aspartatreste. Diese aspartatreiche Region ist auch in den anderen bisher identifizierten *MSBP*-Proteinen vorhanden (Tab. 3.5, Kap. 7.7, Abb. 7.2). Lediglich beim *SbMSBP1* ist diese Region nicht sehr ausgeprägt.

Ähnliche aspartatreiche Regionen kommen in einigen an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligten Proteinen vor (Tab. 3.5). Dazu gehören *SNF4*, eine Untereinheit des „*SNF1*-Komplexes“ aus *Saccharomyces cerevisiae*, der am Zuckersignalling beteiligt ist (CELENZA & CARLSON, 1989a, 1989b; HARDIE et al. 1998; JOHNSTON, 1999), *SIP4* aus *Saccharomyces*, einem Transkriptionsfaktor, der an der *SNF1*-Genregulation beteiligt ist (LESAGE et al., 1996), die zellteilungsaktiven *MAP*-Kinasen *ANP1-3* aus *Arabidopsis thaliana* (NISHIHAMA et al., 1997) und *BCK1* aus *Saccharomyces*, ein Homolog der Protein-Kinase C (LEE & LEVIN, 1991).

Bisher gab es jedoch keine genauen Untersuchungen bezüglich der Funktion dieser konservierten aspartatreichen Domäne.

Tabelle 3.5: Vergleich der aspartatreichen Domäne der MSBP-Proteine mit denen anderer an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligter Proteine. Die Aspartatreste sind rot dargestellt, homologe Bereiche der MSBPs gelb unterlegt, die Zahlen geben die Position der Aminosäuren an. MSBP, (STP), Monosaccharid Binding Protein; SIP4, Transkriptionsfaktor; SNF4 Untereinheit des „SNF1-Komplexes“; ANP1-3, MAP-Kinasen; BCK1, Homolog der Protein-Kinase C. *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*; *Sb*, *Shorghum bicolor*, *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Protein	Aspartatreiche Region
<i>At</i> MSBP1	³³⁹ KPAHWEK D IESHYNKDN DD YATD-DGAG DDDD SD N DL ³⁷⁴
<i>At</i> MSBP2	³³⁶ -PRHE D WDEENLV-GE G EDYPSDH-G-- DD SE DD --L ³⁶⁵
<i>At</i> MSBP3	³³⁹ SQ----WDPERN----NE D -SS D Q----- D EN-L ³⁵⁷
<i>Nt</i> MSBP1	³²⁶ K DDH--WDEESLQ-REG D GYPSD--GIG A DS DD -N-L ³⁵⁵
<i>Os</i> MSBP1	³⁷³ ----- D IE--Q--PKT D LESQ E DL D TDY EDD ---L ³⁹⁵
<i>Os</i> MSBP2	³⁴¹ K --G D W D AE S -Q-REG E DYGS D HGG- DD IE D S---L ³⁶⁸
<i>Sb</i> MSBP1	⁴⁰² EHR D GNS D Q---Q T RE-- A Y- S --AGEVN N GD G ---L ⁴²⁷
<i>Hv</i> STP1	³⁴⁴ K - A -- D W D AE S H--R D DE D Y A SD H -G A DD I ED--N-L ³⁷¹
<i>Hv</i> STP2	³²⁵ K - A -- D W D AE S H--R D DE D Y A SD H -G A DD I ED--N-L ³⁵²
<i>Sc</i> SIP4	⁷¹³ ENY D YET D EGYA E DD E ED S DS D NSL ⁷³⁸
<i>Sc</i> SNF4	³³⁵ DD N D SL I D I Y S R S D ³⁴⁸
<i>At</i> ANP1	³⁹⁴ QQ N D N GG D E DD M C L I DD E N F ⁴¹³
<i>At</i> ANP2	³⁹² N NGY DD DD DD N D M C L I DD E N F ⁴¹⁰
<i>At</i> ANP3	³⁹⁸ G F G W R D G S DD L C Q T D M D D ^{L417}
<i>Sc</i> BCK1	⁹⁶¹ D AP P MF D S DD S DD S SS S DD ⁹⁸⁰

Das Vorhandensein diese ungewöhnlichen Domäne der MSBP-Proteine impliziert die Frage, ob die aspartatreiche Region möglicherweise durch Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle für die Funktion der MSBP-Typ-Proteine spielt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde mit der Klonierung eines *At*MSBP1-Loop-GFP-Fusionskonstruktes begonnen, in dem die aspartatreiche Region entfernt ist.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die molekulare und biochemische Charakterisierung des AtMSBP1 (*Arabidopsis thaliana* Monosaccharid Binding Protein 1), eines neuartigen Proteins der Zuckertransporterfamilie aus *Arabidopsis*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Protein nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Besonderheiten im Vergleich zu anderen bisher bekannten Zuckertransportern aus *Arabidopsis* aufweist. Mit Hilfe von „knock out“-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen dieses in der äußeren Plastidenmembran lokalisierten Proteins zu einer erhöhten Empfindlichkeit auf phänotypischer und molekularer Ebene gegenüber verschiedenen Zucker führt. Diesem neuen Typ von Zuckertransportern, der in allen Angiospermen vorzukommen scheint, kann eine Rolle im Zuckersensing zugeordnet werden und damit ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der komplexen Vorgänge des Zuckersensing in Pflanzen erbracht werden.

4.1 Charakteristika der MSBP-Proteine

Mitglieder der Zuckertransporterfamilie kommen sowohl in Pro- als auch Eukaryoten vor (PAO et al., 1998). Sie sind Bestandteil der großen Gruppe der MFS (Major Facilitator Superfamily; MARGER & SAIER, 1993). Viele Organismen beinhalten mehrere Isoformen der Zuckertransporter, die einer gewebe- und zeitabhängigen Expression unterliegen. Zu den 53 Genen für putative Zuckertransporter allein in *Arabidopsis thaliana* gehören die plasmamembranlokalisierten STPs (Sugar Transport Protein) und der pGlcT in der inneren Plastidenmembran (Plastidic Glucose Transporter, WEBER et al., 2000). Viele der durch das *Arabidopsis*-Genomprojekt postulierten putativen Zuckertransporter sind bisher aber noch nicht funktionell charakterisiert worden.

Der AtMSBP1 ist ein neues Mitglied der Zuckertransporterfamilie in Pflanzen. Er weist die charakteristischen 12 transmembranen Helices auf, die zwischen Helix 6 und 7 eine größere hydrophile Schleife („Loop“) beinhalten (MARGER & SAIER, 1993; HEDIGER, 1994; GRIFFITH et al., 1992; SAUER & TANNER, 1993). Dieser Loop ist bei dem AtMSBP1 aber 4 bis 5 mal so lang wie der Loop in anderen bisher bekannten Zuckertransportern (Abb. 3.1 und 3.2).

In *Arabidopsis thaliana* konnten zwei weitere Zuckertransporter des MSBP-Typs im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojektes identifiziert werden, die ebenfalls einen

extrem verlängerten hydrophilen Loop aufweisen (*AtMSBP2* und *AtMSBP3*). Weitere Proteine dieses Typs konnten bisher nur Angiospermen identifiziert werden, wie z. B. in *Nicotiana tabaccum* (*NtMSBP1*, *Solanaceae*) und den *Poaceae* *Oryza sativa* (*OsMSBP1* und *OsMSBP2*) und *Shorghum bicolor* (*SbMSBP1*) (Abb. 3.3, Tab. 3.4). Auch aus Gerste (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) wurden zwei weitere Mitglieder der MSBP-Familie identifiziert, die im Rahmen einer Expressionsstudie unter dem Namen *HvSTP1* und *HvSTP2* veröffentlicht wurden (WESCHKE et al., 2003).

Für alle bisher bekannten MSBP-Proteine ergibt sich eine Länge von 723 – 753 Aminosäuren (Abb. 3.3). Über weite Teile sind die Sequenzen der MSBP-Transporter stark konserviert, vor allem in den transmembranen Helixbereichen.

Weitere Zuckertransporter des MSBP-Protein-Typs konnten in Teilsequenzabschnitten identifiziert werden. Es wurden allerdings nur solche Proteine berücksichtigt, die zum zentralen hydrophilen Loop homologe Sequenzen enthielten (Kap. 7.5, Abb. 7.2). So konnten bislang unvollständige MSBP-Typ-Proteine in den dicotylen Familien *Asteraceae* (*Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*), *Amaranthaceae* (*Beta vulgaris*), *Fabaceae* (*Glycine max*, *Medicago truncatula*), *Azoiaceae* (*Mesembryanthemum crystallinum*), *Malvaceae* (*Gossypium*) und *Solanaceae* (*Lycopersicum esculentum*, *Solanum tuberosum*) identifiziert werden, sowie in der monokotylen Familie der *Poaceae* (*Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*). Der Stammbaum für die bisher bekannten MSBP-Proteine spiegelt die Einordnung in die entsprechenden Pflanzenfamilien wieder (Kap. 7.6, Abb. 7.3). Allerdings muss beachtet werden, dass bei einigen Vertretern nur Teilsequenzen bekannt sind, so dass es zu Verfälschungen kommen könnte.

4.2 Einordnung der MSBP-Proteine in die Familie der Zuckertransporter

Bei der Einordnung der MSBP-Proteine in die große Familie der Zuckertransporter ähneln die MSBP-Typ-Proteine eher den prokaryotischen, als den eukaryotischen Zuckertransportern. Sie weisen eine höhere Ähnlichkeit zu dem Glukose/H⁺Symporter GTR aus *Synechocystis 6803* (SCHMETTERER, 1990; 29 % Ähnlichkeit, 16 % Identität), als zu den in der plasmamembranlokalisierten Monosaccharidtransportern auf (STPs, 26 % Ähnlichkeit, 13 % Identität) (Tab. 3.1). Auch die konservierten Aminosäuresequenzen der MSBP-Proteine ähneln eher den konservierten Motiven prokaryotischer Zuckertransporter (Tab. 3.2).

Die Nähe der MSBP-Typ-Proteine zu den prokaryotischen Zuckertransportern spiegelt sich auch in einem wurzellosem Stammbaum mit Vertretern der

Zuckertransporter aus verschiedenen Organismen wieder (Abb. 3.4). Hier sind die MSBP-Proteine den bakteriellen Zuckertransportern zugeordnet und nicht den pflanzlichen Zuckertransportern.

Diese Daten sprechen dafür, dass Proteine des MSBP-Typs eher einen prokaryotischen als eukaryotischen Ursprung haben. Sie haben sich phylogenetisch wahrscheinlich nicht aus den in der plasmamembranlokalisierten Zuckertransportern der Eukaryoten entwickelt, sondern stammen von Zuckertransportern aus *Cyanobakterien* ab. Dafür spricht zum einen die hohe Ähnlichkeit zu dem Glukosetransporter SsGTR aus *Synechocystis 6803*, zum anderen die später noch genauer diskutierte Lokalisation der MSBP-Proteine in den Plastiden. Der Vorläufer der MSBP-Proteine könnte somit bei der monophyletischen Entstehung der Plastiden durch Endosymbiose in die Zelle gelangt sein (KOVALLIK, 1994). Die eigentliche Entwicklung der MSBP-Proteine liegt aber noch im Dunkeln, da bisher nur in Angiospermen Proteine dieses Typs identifiziert werden konnten.

4.3 Heterologe Expression des AtMSBP1

Die heterologe Expression in Hefen ist eine gängige Methode um die Eigenschaften von Zuckertransportern zu untersuchen (BÜTTNER & SAUER, 2000). Schon in den Diplomarbeiten von TJADEN (1996) und TRENTMANN (1998) wurden verschiedene Hefesysteme für die Expression des AtMSBP1 getestet. In dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae W 303*, transformiert mit AtMSBP1 in dem Hefevektor 112AINE, konnte bei keinem der getesteten Zucker eine Aufnahme beobachtet werden (TJADEN, 1996).

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hefestamm *S. cerevisiae INVSc1*, in Kombination mit dem Hefevektor pYES2 (beides Invitrogen, Karlsruhe), zeigte zwar eine deutliche mRNA-Akkumulation für den AtMSBP1 (Daten nicht gezeigt), aber auf Proteinebene konnte kein spezifischer Nachweis für die Expression des AtMSBP1-Proteins erbracht werden. Ebenfalls konnten keine Ergebnisse mit dem Hefevektor NEV-E (SAUER & STOLZ, 1994) gewonnen werden.

Der nicht nachzuweisende Transport von Zuckern im Hefesystem könnte verschiedene Gründe haben: Obwohl der AtMSBP1 aufgrund seiner Struktur eindeutig in die Familie der Monosaccharidtransporter eingeordnet werden kann, ist er möglicherweise nicht zum Transport von Zuckern in der Lage. Die Northern- und Western-Blot-Analysen deuten aber darauf hin, dass der AtMSBP1 zwar in Hefen transkribiert wird, aber danach keine Translation mehr stattfindet. Wurde der AtMSBP doch translatiert,

reichten die Proteinmengen vermutlich nicht für eine Detektion mit dem His-Tag- oder dem *AtMSBP1*-Loop-Antikörper (TRENTMANN, 1998) aus. Vielleicht wurde der *AtMSBP1* aber auch aufgrund seiner Lokalisierung in den pflanzlichen Plastiden nicht funktionell in die Plasmamembran der Hefen eingebaut oder es erfolgte ein schneller Abbau des Proteins.

Da der *AtMSBP1* nicht erfolgreich funktionell in den getesteten Hefesystemen exprimiert werden konnte, wurde ein anderer Versuchsansatz zur heterologen Expression des *AtMSBP1* gewählt mit einer *Synechocystis*-Deletionsmutante des Monosaccharid/H⁺-Symporters *SsGTR* (*ALG1*). In diesem System sollten mögliche Transporteigenschaften des *AtMSBP1* und durch Fusionskonstrukte die Bedeutung des ungewöhnlich großen hydrophilen Loops des *AtMSBP1* untersucht werden. Da die *Synechocystis*-Transformation nicht erfolgreich verlief, wurde mit der Klonierung neuer Konstrukte begonnen, bei denen die verwendete Kanamycinresistenz bei der Rekombination besser mit ins Genom integrieren soll.

4.4 Untersuchungen zur Expression der MSBP-Proteine auf mRNA-Ebene

In den meisten Organismen, einschließlich der Pflanzen, liegen mehrere Isoformen der Monosaccharidtransporter vor, die stark reguliert sind und einer spezifischen gewebe-, zeit- und umweltabhängigen Expression unterliegen (BÜTTNER & SAUER, 2000; WILLIAMS et al., 2000). Auch die drei Isoformen der MSBP-Proteine in *Arabidopsis* akkumulierten auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Es wurde gezeigt, dass *AtMSBP1*-mRNA vor allem in älteren „Source“-Blättern akkumuliert. *AtMSBP2*-mRNA hingegen wurde in fast allen *Arabidopsis*-Geweben nachgewiesen. Die mRNA für *AtMSBP3* akkumulierte vor allem in „Sink“-Geweben (Abb. 3.6). Die Expression der drei Isoformen konnte auf mRNA-Ebene gut untersucht werden, da sich die verwendeten cDNA-spezifischen Sonden kaum gegenseitig erkannten (Abb. 3.5).

Für die beiden Homologe aus Gerste wurde eine sehr genau regulierte zeitliche und gewebespezifische mRNA-Akkumulation in sich entwickelnden Gerstenkörnern nachgewiesen (WESCHKE et al., 2003). Dabei wurde eine Koexpression der MSBP-Proteine und zellwandgebundener Invertasen festgestellt, wie auch schon für Invertasen und Monosaccharidtransporter in anderen „Sink“-Geweben als wichtiger Mechanismus zur Versorgung mit Monosacchariden (EHNESS & ROITSCH, 1997).

Bei Northern-Blot-Analysen sollte jedoch beachtet werden, dass manchmal Abweichungen zwischen der Menge an mRNA und der Proteinmenge bestehen können (RIESMEIER et al., 1993; GEIGENBERGER et al., 2001).

Um genauere Ergebnisse bezüglich der Lokalisation und zeitlichen Expression der MSBP-Proteine in *Arabidopsis* zu erhalten, bieten sich Promotor-GUS-Fusionen an. Es liegen inzwischen transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit einem *AtMSBP3*-Promotor-GUS-Konstrukt vor. Die F2-Generation steht für erste Analysen mittels spezifischer Färbereaktionen bezüglich der Aktivität des *AtMSBP3*-Promotors zur Verfügung.

4.5 Untersuchungen zur Lokalisation des *AtMSBP1*-Proteins in der Pflanzenzelle

Für das Verständnis der Funktion der MSBP-Proteine ist aber nicht nur die Kenntnis des Expressionsmusters in der Pflanze wichtig, sondern auch die Lokalisation innerhalb der Pflanzenzellen. Dafür bieten sich verschiedene Methoden an, wie z. B. die Fusion des Proteins mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) oder der Nachweis durch MSBP-spezifische Antikörper.

Das im UV-Licht grün leuchtende GFP-Protein akkumuliert in transformierten Tabakprotoplasten im Zytosol und dem Zellkern (Abb. 3.7, GREBENOK et al., 1997). Es kann aufgrund seiner Größe durch die Kernporen in den Kern gelangen, deren Proteinausschlussgröße ca. 40 – 60 kDa beträgt (GÖRLICH & MATTAJ, 1996).

Bei der transienten Expression eines *AtMSBP1*-GFP-Fusionskonstruktes in Tabakprotoplasten ließ sich eine eindeutige Lokalisation des *AtMSBP1* in den Plastiden nachweisen (Abb. 3.8). Eine zur Kontrolle durchgeführte Transformation mit einem Fusionskonstrukt des GFPs mit der N-terminalen Leadersequenz der plastidären Glc6P-Dehydrogenase-Isoform zeigte ein ähnliches Fluoreszenzmuster in den Chloroplasten (Abb. 3.9; WENDT et al., 2000). Im Gegensatz dazu akkumulierte die Grünfluoreszenz deutlich innerhalb der Plasmamembran bei der Verwendung eines Fusionskonstruktes aus GFP und *LeSUT*, einem plasmamembranlokalisierten Saccharosetransporter (Abb. 3.10).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Targetingversuche mit isolierten Chloroplasten und radioaktiv markierten *AtMSBP1*- und *OsMSBP1*-Proteinen durchgeführt. Die Versuche zeigten, dass der *AtMSBP1* vermutlich nicht in die innere Membran der Plastiden inseriert ist, da er dort nicht durch die Protease Thermolysin verdaut werden könnte. Die Lokalisation des *AtMSBP1* in der äußeren

Envelopemembran konnte aber durch diesen Versuch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis des *AtMSBP1* in der äußeren Plastidenmembran war durch die Immunodetektion mit einem Antikörper gegen den zentralen hydrophilen Loop des *AtMSBP1* (TRENTMANN, 1998) in gereinigten äußeren und inneren Envelopemembranen möglich. Die starke Bande in der äußeren Plastidenmembran in der Höhe von 74 kDa (Abb. 3.12) entspricht dem erwarteten Signal, da auf ähnlicher Höhe auch das *AtMSBP1*-Signal bei der Auftrennung der *In-vitro*-Translationsprodukte läuft (79 kDa, Abb. 3.11). Das schwache Signal in der inneren Envelopemembranfraktion ist vermutlich auf leichte Verunreinigungen bei der Auftrennung der Membranen voneinander zurückzuführen.

Für die Lokalisation des MSBPs in der äußeren Plastidenmembran spricht, dass alle Membranproteine der äußeren Envelopemembran, mit Ausnahme von TOC75, keine Transitdomäne haben, wie sie auch den MSBP-Proteinen fehlen, und spontan in diese Membran inserieren (SOLL & TIEN, 1998). Nur der *OsMSBP1* aus *Oryza sativa* und der *SbMSBP1* aus *Shorghum bicolor* haben eine N-terminale Sequenzverlängerung. Für die Membrantransporter der inneren Hüllmembran wurde hingegen stets eine Transitdomäne als notwendig für den Import angesehen (FLÜGGE, 1999; NEUHAUS & WAGNER, 2000).

Der MSBP ist somit der zweite in den Plastiden lokalisierte Zuckertransporter neben dem in der inneren Envelopemembran lokalisierten pGlcT (WEBER et al., 2000).

4.6 Untersuchungen an „knock out“-Mutanten zur Analyse der Funktion der MSBP-Proteine in *Arabidopsis thaliana*

Eine gezielte Möglichkeit zur Analyse einzelner Gene bieten „knock out“-Mutanten. In diesen Mutanten können die Auswirkungen eines fehlenden Proteins durch die Insertion einer sogenannten T-DNA in das entsprechende Gen untersucht und somit Rückschlüsse auf die Funktion des entsprechenden Proteins gezogen werden. Für zwei von drei Isoformen der MSBP-Proteine konnten in *Arabidopsis thaliana* „knock out“-Mutanten identifiziert (*AtMSBP1::T-DNA* und *AtMSBP2::T-DNA*) und durch PCR- und Northern-Blot-Analysen als homozygot bestätigt werden (Abb. 3.13 - 3.15). Darüber hinaus zeigten die Northern-Blot-Analysen, dass durch das Fehlen der *AMSBP1*- oder *AtMSBP2*-Isoform weder die mRNA für *AtMSBP2* bzw. *AMSBP1* entsprechend stärker akkumulierte.

Wie im folgenden Teil der Diskussion gezeigt wird, zeigten die beiden unabhängigen „knock out“-Linien *AtMSBP1::T-DNA* und *AtMSBP2::T-DNA* ähnliche Reaktionen auf phänotypischer und molekularer Ebene. Aus diesem Grund sind die beobachteten Effekte auf die jeweilige Mutation der *MSBP*-Gene zurückzuführen. Die Isolierung von unabhängigen Mutanten eines Genes, die ähnliche Merkmale zeigen, liefern Information über die spezifischen Änderungen durch die genomischen Mutationen und sichern gegenseitig die erhaltenen Ergebnisse ab (THORNEYCROFT et al., 2001). So können durch die Analyse der *MSBP*-„knock out“-Mutanten wichtige Erkenntnisse über die Funktion der *MSBP*-Proteine gewonnen werden.

Da für den *AtMSBP3* bisher keine „knock out“-Mutante identifiziert werden konnte, wurde für diese Isoform ein „RNAi“-Ansatz gewählt, der in transgenen Pflanzen zum effektivem Abbau der entsprechenden mRNA in der ganzen Zelle führt (GLEAVE et al., 1992; SCHWEIZER et al., 2000; CHUANG & MEYEROWITZ, 2000; JOHANSEN & CARRINGTON, 2001). Die Pflanzen der F2-Generation mit verringerten *AtMSBP3*-mRNA-Gehalten wurden zur Samenbildung ausgewählt. Diese Pflanzen können für Versuche entsprechend denen für die *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-„knock out“-Mutanten genutzt werden.

4.6.1 Phänotypische Auswirkungen bei der Anzucht der *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten auf Erde

Das Fehlen eines im Zuckerstoffwechsel involvierten Genes führt wahrscheinlich zu Veränderungen des Zuckerstatus der Zellen und in Folge dessen möglicherweise zu phänotypischen Änderungen. Die „knock out“-Mutanten wurden zunächst auf Erde angezogen um zu untersuchen, ob das Fehlen von *AtMSBP1* bzw. *AtMSBP2* zu auffälligen phänotypischen Effekten führt.

Bei der Anzucht der *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen auf Erde unter Kurztagsbedingungen zeigten sich zunächst keine signifikanten Unterschiede zu parallel angezogenen Wildtyppflanzen. Allerdings begannen die *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen ca. eine Woche früher mit der Blüte als *AtMSBP2::T-DNA*- und Wildtyppflanzen (Abb. 3.16). Dies könnte auf eine Rolle des *AtMSBP1* in den „Source“-Blättern bei der Induktion der Blüte hindeuten.

Die Metabolitengehalte können durch das Fehlen eines am Zuckertransport beteiligten Proteins verändert werden. Dies gilt für die Kohlenstoffgehalte, aber auch für den Chlorophyllgehalt der Blätter, der durch den Zuckergehalt beeinflusst werden kann.

Die Messungen der Metabolitengehalte der Blätter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten und den Wildtyppflanzen. So waren die Chlorophyllgehalte in den drei Genotypen annähernd gleich (Abb. 3.17), ebenso wie die Stärkegehalte (Abb. 3.21). Die Glukose-, Fruktose- und Saccharosegehalte waren in den „knock out“-Mutanten nur leicht reduziert im Vergleich mit den Wildtyppflanzen (Abb. 3.18 - 3.20). In der Summe heißt dies, dass das Fehlen der MSBP-Proteine keinen signifikanten Einfluss auf die Metabolitengehalte der „Source“-Blätter zu haben scheint. Die MSBP-Proteine sind somit nicht substantiell am Fluss der Kohlenhydrate in der Zelle beteiligt.

4.6.2 Untersuchungen zur Beteiligung der MSBP-Proteine am Transport von Glukose in Plastiden

Die Aufnahmeversuchen an isolierten Chloroplasten aus *AtMSBP1::T-DNA*- und Wildtyppflanzen zeigten keinen Unterschied bei den ¹⁴C-Glukoseaufnahmeraten und unterstützen so die Annahme, dass *AtMSBP1* nicht signifikant am Glukosetransport in den Plastiden beteiligt ist (Abb. 3.22). Bei der Inkubation der Chloroplasten mit ¹⁴C-Glukose für drei Sekunden befand sich die Aufnahmereaktion noch im linearen Bereich (SCHÄFER et al., 1977; WEBER et al., 2000).

Dieses Ergebnis passt zur nachgewiesenen Lokalisierung des *AtMSBP1* in der äußeren Envelopemembran der Plastiden. Da die äußere Envelopemembran der Plastiden für Zucker frei permeable ist und wahrscheinlich kein Zuckerkonzentrationsunterschied zwischen dem Zytosol und dem Intermembranraum der Plastidenmembranen existiert, wäre eine signifikante Beteiligung der MSBPs an den Zuckertransportraten der Chloroplasten überraschend gewesen.

Zusammenfassend zeigen die Beobachtungen, dass MSBP-Proteine wahrscheinlich nicht als Zuckertransporter im herkömmlichen Sinn fungieren. Dies wird zum einen unterstützt durch die Ergebnisse im Hefesystem, die zeigten, dass die Expression der MSBP-Proteine dort stark beeinträchtigt wird und kein Zuckertransport nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte kein Unterschied beim Glukosetransport zwischen isolierten Chloroplasten aus Wildtyp- und *AtMSBP1::T-DNA*-„knock out“-Pflanzen ermittelt werden. Zum anderen zeigten die *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten bei der Anzucht auf Erde im Phänotyp und bei den Zucker- und Chlorophyllgehalten keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyppflanzen. Lediglich der Beginn der Blühphase war bei den *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen früher.

Da die Funktion der MSBP-Proteine damit wahrscheinlich nicht der Transport von Zuckern ist, wäre eine Rolle im Zuckersensing möglich. Für diese Funktion ist ein Zuckertransport in signifikanten Mengen nicht nötig, da z. B. auch die Zuckersensoren SNF3 und RGT2 der Hefe keinen signifikanten Transport von Zuckern aufweisen. Die nun folgenden Ergebnisse unterstützen die vermutete Beteiligung der MSBP-Proteine am Zuckersensing der Pflanzen.

4.6.3 Phänotypische Auswirkungen bei der Anzucht der *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten auf erhöhten Zuckerkonzentrationen

Bei der Anzucht von Pflanzen auf steigenden Zuckerkonzentrationen wird das Wachstum und die Entwicklung bei höheren Zuckerkonzentrationen gestört bzw. verhindert (JANG et al., 1997). Während der Keimung und der frühen Samenentwicklung können Zucker die Nährstoffmobilisierung, die Verlängerung des Hypokotyls, das Ergrünen der Kotyledonen und die Triebentwicklung unterdrücken (ROLLAND et al., 2002) Hohe Zuckerakkumulationen während der frühen Keimlingsentwicklung stellen unerwünschte Wachstumsbedingungen während entscheidender Entwicklungsperioden da, die in einem reversiblen Entwicklungsstopp als Schutzmechanismus resultieren (LOPEZ-MOLINA et al., 2001).

Durch das veränderte Wachstum bei der Anzucht auf zuckerhaltigen Medien wurden bereits verschiedene Mutanten identifiziert, die verstärkt oder abgeschwächt auf Zucker reagieren und dadurch zur Aufklärung der Signalling- und Sensingwege für Zucker in Pflanzen beitragen. Um zu untersuchen, ob auch die *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-„knock out“-Mutanten auf erhöhte Zuckergehalte reagieren, wurden sie daher mit steigenden Zuckerkonzentrationen in Sterilkultur angezogen.

Bei der Anzucht der „knock out“-Mutanten auf steigenden Glukose-, Fruktose- und Saccharosekonzentrationen zeigte sich deutlich eine Störung des Wachstums und der Entwicklung bei höheren Zuckerkonzentrationen. Vergleicht man das Wachstum der „knock out“- mit dem der Wildtyppflanzen, reagierten die „knock out“-Mutanten deutlich sensitiver. Die empfindlichere Reaktion auf steigende Zuckerkonzentrationen spiegelte sich signifikant wieder durch eine verringerte Keimungseffizienz, die Abnahme der durchschnittlichen Zahl der Blätter und einer Verringerung der durchschnittlichen Größe der Pflanzen (Abb. 3.23 - 3.25 und 3.28 - 3.30). Besonders deutlich wurde dieser Effekt bei den Monosacchariden Glukose und Fruktose (Abb. 3.24 und 3.25). Diese Effekte waren bei den *AtMSBP2::T-DNA*-Pflanzen noch stärker ausgeprägt als bei den *AtMSBP1::T-DNA*-Pflanzen. Dies könnte auf eine

stärkere Rolle des *AtMSBP2* als des *AtMSBP1* in den frühen Entwicklungsphasen der Keimlinge zurückgeführt werden.

Um auszuschließen, dass die sensitivere Reaktion der „knock out“-Mutanten auf osmotische Effekte bei den Anzuchtversuchen zurückzuführen waren, wurden die Pflanzen auf unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen angezogen. Dieser Zuckeralkohol wird von *Arabidopsis*-Pflanzen kaum als Zuckerquelle genutzt, erhöht aber analog zu Glukose oder Fruktose das osmotische Potential im Medium. Bei diesen Versuchen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede beim Wachstum der *AtMSBP1::T-DNA*-, *AtMSBP2::T-DNA*- und Wildtyppflanzen (Abb. 3.26). Somit wurde die Spezifität der empfindlicheren Reaktionen der „knock out“-Mutanten auf steigende Zuckergehalte bestätigt. Da beide *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten verstärkt sensitiv auf hohe Zuckerkonzentrationen reagierten, kann diese Reaktion auf das Fehlen der *MSBP*-Gene zurückgeführt werden.

4.6.4 Phänotypische Auswirkungen bei der Anzucht der *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten auf erhöhten Konzentrationen des Zuckeranalogons 3-O-Methylglukose

Die sensitivere Reaktion der „knock out“-Mutanten auf erhöhte Zuckerkonzentrationen im Vergleich zu Wildtyppflanzen spricht für eine Beteiligung der *MSBP*-Proteine am Zuckersensing der Pflanzen. Die empfindlichere Reaktion ist aber insofern überraschend, da bei dem Fehlen eines Sensors, oder auch eines Transporters, eine abgeschwächte Reaktion auf Zucker zu erwarten ist. So zeigen „knock out“-Mutanten für Monosaccharidtransporter mit Funktionen als Zuckersensoren in Hefen und Mäusen eine verminderte Reaktion auf die Applikation von Zuckern, das heißt, die Zuckerperzeption ist deutlich abgeschwächt (ÖZCAN et al. 1996a, 1996b; GUILLAM et al. 1997; JOHNSTON 1999). Die erhöhte Reaktion der *AtMSBP::T-DNA*-„knock out“-Mutanten ist daher vermutlich auf eine bisher nicht beschriebene Form des pflanzlichen Zuckersensing zurückzuführen.

3-O-Methylglukose ist ein Hexosederivat, das von der im pflanzlichen Zuckersensing involvierten Hexokinase nur zu einem geringen Prozentsatz als Substrat verwendet und nicht von der Zelle als Zucker genutzt wird (CORTÉS et al., 2003). Daher wird diese Substanz oftmals genutzt, um ein „Hexokinase-unabhängiges“ Zuckersensing festzustellen (XIAO et al., 2000; CORTÉS et al., 2003). Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit veränderten Hexokinasegehalten zeigten keine Unterschiede bei der Anzucht auf

3-O-Methylglukose im Vergleich mit Wildtyppflanzen (JANG et al., 1997). Um zu untersuchen, ob die vermutete Rolle der MSBP-Proteine beim Zuckersensing von der Aktivität der Hexokinase abhängt, wurden die Pflanzen auf Medien mit steigenden Konzentrationen des Hexoseanalog 3-O-Methylglukose angezogen.

Die „knock out“-Pflanzen zeigten auch bei der Anzucht auf hohen 3-O-Methylglukosekonzentrationen eine stärkere Hemmung im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Abb. 3.27). Somit reagierten die „knock out“-Mutanten unabhängig von der Hexokinase sensitiver auf dieses Zuckeranalog. Auch diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass die MSBP-Proteine am pflanzlichen Zuckersensing beteiligt sind.

4.6.5 Untersuchungen zuckersensitiver Gene in „Source“-Blättern

Der Zuckerstatus und der Zuckerfluss beeinflussen verschiedene zuckersensitive Gene um eine zelluläre Anpassung an die Veränderungen der Nährstoffverfügbarkeit und die Kontrolle der Ressourcenverteilung zwischen den Geweben und Organen zu gewährleisten. Die Gene für die Photosynthese, für die Reservemobilisierung und für Exportprozesse werden bei der Abnahme von Zuckern hoch reguliert („Famine“-Gene). Dagegen induziert die Zunahme von Zuckern die Gene für die Speicherung von Kohlenstoffen und Proteinen und für verschiedenen Neusynthesen („Feast“-Gene) (KOCH, 1996).

Die auf phänotypischer Ebene verstärkte empfindliche Antwort der „knock out“-Pflanzen auf die Erhöhung der Zuckerkonzentration im Medium lässt vermuten, dass in diesen Mutanten auch die Expression zuckersensitiver Gene verändert ist. Da die mehrwöchige Anzucht der „knock out“- und Wildtyppflanzen auf zuckerhaltigen Agarmedien in Sterilkultur zu einer starken phänotypischen Hemmung führt, konnten Artefakte bezüglich der zuckersensitiven Genexpression durch pleiotrope metabolische Änderungen nicht ausgeschlossen werden. Für die Untersuchung der zuckerbeeinflussten Gene auf mRNA-Ebene bei erhöhten Zuckerkonzentrationen wurden deshalb Blattscheiben aus von auf Erde angezogenen Pflanzen für die Inkubation mit unterschiedlichen Zuckern genutzt, da bei der Anzucht auf Erde keine signifikanten phänotypischen Unterschiede zwischen den „knock out“- und den Wildtyppflanzen festgestellt werden konnten (Kap. 3.6.1 und 3.6.2).

Die mRNA-Gehalte der getesteten zuckersensitiven Gene *CAB* (*Chlorophyll_{a/b} Binding Protein*), *PC* (*Plastocyanin*) und *NR* (*Nitratreduktase*) waren in den „Source“-Blättern der *AtMSBP1::T-DNA*-, *AtMSBP2::T-DNA*- und Wildtyppflanzen ähnlich hoch (Abb. 3.32). Die vergleichbaren mRNA-Gehalte der zuckersensitiven Gene

bestätigten somit auch die Messungen der Metabolitengehalte (Abb. 3.17-3.21). In „Source“-Blättern scheinen unter Kurztagsverhältnissen Bedingungen vorzuliegen, die zu keinem signifikanten Einfluss der MSBP-Proteine führen.

Das verwendete Testsystem wurde anhand von Blattscheiben aus „Source“-Blättern von im Kurztag angezogenen Wildtyppflanzen überprüft, die mit steigenden Glukosekonzentrationen inkubiert wurden (NEUHAUS & STITT, 1989). Die zuckersensitiven Gene *CAB* und *NR* zeigten die erwarteten Reaktionen auf mRNA-Ebene (Abb. 3.31). Somit erwies sich unser System für die Untersuchung der zuckerinduzierten Effekte bei den „knock out“-Mutanten als geeignet. Für die folgenden Versuche wurde eine Zuckerkonzentration von 100 mM ausgewählt, da bei dieser Zuckerkonzentration beide Gene eine deutliche mRNA-Akkumulation zeigten. Zu den gestesteten Zuckern gehörten Saccharose, Glukose, Fruktose und Sorbitol. Als Sonden wurden die cDNAs der durch Zucker reprimierten Gene für das *Chlorophyll_{a/b} Binding Protein (CAB)* und für *Plastocyanin (PC)*, sowie die zuckerinduzierte *Nitratreduktase (NR)* (KOCH, 1996) genutzt.

4.6.6 Untersuchungen zuckersensitiver Gene bei erhöhten Zuckerkonzentrationen in „Source“-Blättern aus „knock out“-Pflanzen

Nach 24 Stunden Dunkelinkubation im Wasser waren die mRNA-Gehalte der *CAB*, des *PC* und der *NR* sehr niedrig (Abb. 3.32). Die niedrige Genexpression lässt sich vermutlich auf die Kohlenhydratverarmung der Blätter im Wasser zurückführen. Durch die Inkubation der Blattscheiben im Dunkeln wurde der Einfluss des Lichtes und der Photosynthese auf die Genexpression ausgeschlossen. Bei der Inkubation aller drei Genotypen mit dem als Kontrolle verwendeten Zuckeralkohol Sorbitol traten nur geringe Unterschiede bei der mRNA-Akkumulation zwischen Wildtyp- und „knock out“-Pflanzen auf (Abb. 3.32). Dieses Ergebnis korrelierte mit dem Ausbleiben sorbitolspezifischer Effekte auf den Phänotyp (Abb. 3.26). Der gesteigerte mRNA-Gehalt der *CAB* und des *PC* im Vergleich zur der Wasserprobe zeigten, das Sorbitol zu einem gewissen Maß als Zuckerquelle in der Blattscheiben genutzt werden kann. Der Zuckeralkohol wirkte somit förderlich auf die Gen-Expressionen, hatte aber keinen Effekt beim Zuckersensing.

Die zuckersensitiven Gene reagierten auf mRNA-Ebene auf die Applikation mit Saccharose, Glukose und Fruktose in den „Source“-Blättern der „knock out“-Mutanten deutlich empfindlicher als in denen der Wildtyppflanzen. Die mRNA der durch hohe Zuckerkonzentrationen gehemmte Gene *CAB* und *PC* akkumulierte in den

„knock out“-Mutanten deutlich schwächer als in den Wildtyppflanzen (Abb. 3.32), während die mRNA der zuckerinduzierten *NR* verstärkt akkumulierte. Dabei reagierten die *AtMSBP1::T-DNA*-Mutanten deutlich empfindlicher als die *AtMSBP2::T-DNA*-Mutanten.

Diese Ergebnisse auf molekularer Ebene unterstützen die bei der Anzucht auf zuckerhaltigen Medien gemachten Beobachtungen der erhöhten Sensitivität gegenüber der Zuckerapplikation bei den „knock out“- im Vergleich zu den Wildtyppflanzen. Trotz der unterschiedlich starken Reaktionen auf verschiedene Zucker zeigen die molekularen Antworten der zuckersensitiven Gene, dass die beobachteten Effekte auf das Fehlen der MSBP-Proteine zurückzuführen sind.

4.6.7 Einfluss der gewebespezifischen Expression der MSBP-Proteine auf die Stärke der zuckerbeeinflussten Reaktionen

Die Unterschiede der Reaktion der *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-Mutanten bezüglich der Expression der zuckersensitiven Gene können vielleicht auf einen Unterschied in der Substratspezifität der MSBP-Proteine zurückzuführen sein. Es ist aber auch denkbar, dass die Unterschiede in der Reaktion der *AtMSBP*-„knock out“-Mutanten auf die unterschiedliche Expression der beiden Isoformen im Blattgewebe zurückgeführt werden können. Dies wird unterstützt durch Versuche mit alten „Source“-Blättern, in denen Northern-Blot-Analysen nur in den *AtMSBP1::T-DNA*-Mutanten eine empfindlichere Reaktion auf Glukose und Fruktose bezüglich der zuckersensitiven Gene zeigten (Daten nicht gezeigt).

Dies passt zu der Beobachtung, dass die *AtMSBP1::T-DNA*-Mutanten früher mit dem Blühen beginnen (Abb. 3.16). Der *AtMSBP1* scheint in alten „Source“-Blättern eine entscheidende Rolle bei der Perzeption der Zuckerkonzentration zu spielen, die unter anderem den Blühbeginn der Pflanzen beeinflusst. Die Induktion der Blühphase hängt in vielen Pflanzen unter anderem von dem Zuckerstatus ab, der die Blühinduktion positiv oder negativ beeinflusst (OHTO et al, 2001). Da der *AtMSBP1* vor allem in „Source“-Blättern exprimiert wird (Abb. 3.6), könnte er am Signalling des Zuckerstatus in den Blättern beteiligt sein.

Da *AtMSBP2* hingegen relativ schwach in älteren Blättern transkribiert wurde (Abb. 3.6), hat er hier wahrscheinlich keine wichtige Funktion. Der *AtMSBP2* scheint hingegen eine starke Rolle bei der Keimung der Pflanzen zu spielen, da die *AtMSBP2::T-DNA*-Mutanten bei der Keimung auf hohen Zuckerkonzentrationen im Medium stärker reagierten als die *AtMSBP1::T-DNA*-Mutanten (Abb. 3.23 – 3.25).

Über die zeitliche und räumliche Expression der einzelnen *AtMSBP*-Isoformen werden die GUS-Promotor-Pflanzen genauere Aufschlüsse geben. Eine stark regulierte zeitliche und räumliche Genexpression der MSBP-Proteine konnte bereits in sich entwickelnden Gerstenkörnern nachgewiesen werden (WESCHKE et al., 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass auch in *Arabidopsis* die einzelnen MSBP-Isoformen sehr spezifische Expressionsmuster aufweisen.

Da Pflanzen, die keine MSBP-Proteine mehr enthalten, erwartungsgemäß deutliche Störungen beim Zuckersensing aufweisen, wurden die beiden „knock out“-Mutanten *AtMSBP1::T-DNA* und *AtMSBP2::T-DNA* bereits gekreuzt, um eine „knock out“-Mutante für beide Isoformen zu erhalten. Die F2-Generation dieser Kreuzung wird zur Zeit auf homozygote Doppelmutanten untersucht.

4.7 Strukturelle Besonderheiten der MSBP-Proteine im Vergleich mit anderen Zuckertransportern und sich daraus ableitende mögliche Funktionen

Die auffälligste Besonderheit der MSBP-Typ-Proteine ist der große zentrale hydrophile Loop der Proteine zwischen den transmembranen Helices 6 und 7, der 3 bis 5 mal so lang wie der klassischer Zuckertransporter ist (Abb. 3.1 und 3.2). Dieser Loop ist nur in den Mitgliedern der MSBP-Familie kürzer, die eine N-terminale Verlängerung aufweisen (Abb. 3.3; *OsMSBP1* und *SbMSBP1*). In keinem der herkömmlichen Zuckertransporter findet sich eine Sequenzverlängerung in diesem Umfang, außer bei Zuckertransportern, denen eine Rolle beim Zuckersensing zugesprochen wird.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben die beiden Zuckersensoren RGT2 und SNF3 eine 4 bis 6 mal so lange C-terminale Sequenzerweiterung wie die anderen Zuckertransporter (Özcan et al., 1996b), die wichtig für die Generation des Glukosesignals ist (WENDELL & BISSON, 1994; MARSHALL-CARLSON et al., 1990; ÖZCAN et al., 1998; COONS et al., 1997; VAGNOLI et al., 1998; ÖZCAN & JOHNSTON, 1999).

Der Saccharosetransporter *LeSUT2* aus Tomaten hat wie die Hefe-Sensoren RGT2 und SNF3 eine C-terminale zytoplasmatische Verlängerung. Ihm wurde als erstem pflanzlichen Transporter eine Rolle als putativer Zuckersensor zugesprochen (BARKER et al., 2000).

Der Zuckertransporter GLUT2 aus Säugetieren transportiert nicht nur Zucker, sondern signalisiert der Zelle auch die Verfügbarkeit externer Zucker. Dieses Sensing

erfolgt durch den verlängerten zentralen Loop des Transporters (THORENS et al., 1989, 2001; GUILLAM et al., 1997, 2000).

4.7.1 Analysen zur Funktion des zentralen MSBP-Loops

Der extrem verlängerte Loop spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Funktion der MSBP-Proteine. Im Falle des humanen Zuckertransporters GLUT2 wurde bereits die Beteiligung des zentralen Loops am Zuckersensing nachgewiesen, da ein *HsGLUT2*-Loop-GFP-Fusionsprotein im Kern akkumuliert (GUILLEMAIN et al., 2000). Diese Beobachtung wird auf eine Interaktion des *HsGLUT2*-Loops mit löslichen kernlokalisierten Faktoren zurückgeführt, die entsprechend ihrer Funktion beim Signalling zur Weiterleitung des Signals in den Kern wandern.

Um zu überprüfen, ob auch der *AtMSBP1*-Loop ähnlich mit löslichen Faktoren interagiert, wurde ein *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt transient in Tabakprotoplasten exprimiert. Die GFP-Fluoreszenz war im Zytosol und sehr stark im Kern lokalisiert (Abb. 3.33). Das *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt ist zu groß, um unspezifisch durch die Kernporen in den Kern zu gelangen (GÖRLICH & MATTAJ, 1996; VON ARMIN et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass auch der *AtMSBP1*-Loop mit löslichen Faktoren interagiert, die das *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt in den Kern „ziehen“. Da ein Teil des Fusionskonstruktes noch im Zytosol verblieben war, lässt sich möglicherweise eine Interaktion des *AtMSBP1*-Loops mit unterschiedlichen Faktoren zurückführen, die je nach den vorliegenden Bedingungen entweder im Kern oder im Zytosol lokalisiert sind, oder es lag ein großer Überschuss des *AtMSBP1*-Loops gegenüber möglichen Bindepartnern vor.

Ein weiteres Indiz für die Beteiligung des MSBP-Loops an der Funktion des Proteins liegt in der Beobachtung, dass es noch nicht möglich war transgene Pflanzen herzustellen, die den *AtMSBP1*-Loop im Zytosol verstärkt exprimieren. Es könnte daran liegen, dass die Überexpression des Loops im Zytosol zur permanenten Bindung eines Interaktionspartners führen würde, was in einer extremen Störung des Zuckersensing resultieren könnte.

4.7.2 Analysen der aspartatreichen Domäne im zentralen Loop der MSBPs

Mitten im großen hydrophilen Loop des *AtMSBP1* befindet sich eine außergewöhnliche aspartatreiche Region. In dieser liegen 11 Aspartatreste zwischen den Aminosäuren 355 – 374 (Abb. 3.3, Tab. 3.5) Auch die anderen MSBP-Proteine haben eine analoge negativ geladene Domäne (Tab. 3.3, 3.5).

Aspartatreiche Regionen konnten auch in einigen Proteinen identifiziert werden, die an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (Tab. 3.5). Zu diesen Proteinen gehört SNF4, eine Untereinheit des am Zuckersignalling beteiligten „SNF1-Komplexes“ aus Hefe (CELENZA & CARLSON, 1989a, 1989b; HARDIE et al. 1998; JOHNSTON, 1999), der an der *SNF1*-Gen-Regulation beteiligte Transkriptionsfaktor SIP4 aus Hefe (LESAGE et al., 1996), die zellteilungsaktiven MAP-Kinasen ANP1-3 aus *Arabidopsis* (NISHIHAMA et al., 1997) und BCK1 aus Hefe, ein Homolog der Protein-Kinase C (LEE & LEVIN, 1991).

Um zu überprüfen, ob die zentrale, negativ geladene aspartatreiche Region eine Rolle bei der Interaktion der MSBP-Proteine mit anderen Proteinen spielt, sind Versuche mit einem *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstrukt ohne diese Domäne geplant. Wenn die aspartatreiche Region an den Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist, sollte keine Akkumulation des GFP-Fusionsproteins im Kern stattfinden, da die Bindung zu möglichen Interaktionspartnern gestört wäre.

4.8 Modell für die Funktion der MSBPs

Die „knock out“-Mutanten der Zuckersensoren SNF3 und RGT2 in Hefen und des GLUT2 im Menschen zeigen eine verminderte molekulare Reaktion auf die Applikation von Zuckern, das heißt, die Zuckerperzeption ist deutlich abgeschwächt (ÖZCAN et al., 1996a, 1996b; GUILLAM et al., 1997; JOHNSTON, 1999). Im Gegensatz dazu reagieren die „knock out“-Mutanten *AtMSBP1::T-DNA* und *AtMSBP2::T-DNA* im Vergleich zu den Wildtyppflanzen auf die Erhöhung des Zuckergehaltes mit einer verstärkten Reaktion auf phänotypischer und molekularer Ebene. Dies zeigt zum einen die Rolle der MSBP-Proteine beim Zuckersensing der Pflanzen, deutet aber andererseits auf einen neuartigen, bisher für Pflanzen, aber auch für andere Eukaryoten, nicht beschriebenen Mechanismus des Zuckersensing hin.

4.8.1 Lokalisation der MSBP-Proteine in der Plastidenmembran

Für Pflanzen ist ein sehr differenziertes intrazelluläres Zuckerperzeptionssystem von großer Wichtigkeit. Im Zytosol fließen verschiedenen Zuckerflüsse zusammen und erfordern hier eine genaue Erfassung des Zuckerstatus. Zucker gelangen durch den aktiven Transport über plasmamembranlokalisierte Zuckertransporter die Zelle oder durch symplastischen Transport durch die Plasmodesmata. Zucker werden aber auch in den autotrophen Zellen endogen durch die Photosynthese hergestellt. Im Zytosol findet z. B. das „Hexokinase-abhängige“ Zuckersensing statt, da die Überexpression

einer zytosolischen Hexokinase zu verstärktem Sensing führt (JANG et al., 1997; XIAO et al., 2000). Sollte der MSBP eine Funktion im Zuckersensing der Zellen haben, wäre eine Lokalisierung der MSBP-Proteine in der äußeren Plastidenmembran für eine Interaktion mit im Zytosol lokalisierten Komponenten der Signalling- und Sensing-Wege von Vorteil. Darüber hinaus ist die äußere Plastidenmembran wahrscheinlich für Zucker permeabel, so dass auf beiden Seiten der Membran die gleiche Zuckerkonzentration vorliegt. Dies wäre anderes bei einer Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum oder auch den Vakuolen, an deren Membranen Zuckerkonzentrationsunterschiede bestehen. Zusätzliche regulatorische Elemente müssten dafür sorgen, dass nur an der zytosolischen Seite die Konzentration der Zucker perzeptiert wird.

4.8.2 Interaktion der MSBP-Proteine mit anderen Zuckersensoren

Das plastidenmembranlokalisierte MSBP-Protein könnte mit anderen Zuckersensoren der Pflanzenzelle interagieren. Das Zusammenspiel der MSBP-Proteine mit der zytosolischen Hexokinase, der schon lange eine Rolle beim Zuckersensing von Hexosen zugeordnet wird (JANG & SHEEN, 1994; XIAO et al., 2000), ist sehr wahrscheinlich. Die starke sensitive Reaktion der „knock out“-Mutanten auf die Hexosen Glukose und Fruktose bestätigt die Verknüpfung der Funktion der MSBP-Proteine mit dem „Hexokinase-abhängigen“ Zuckersensing.

Weiterhin ist eine Verbindung der MSBP-Proteine mit dem Zuckersensing der postulierten, bisher aber noch nicht identifizierten, plasmamembranlokalisierten Monosaccharidsensoren möglich.

Darüber hinaus scheinen die MSBP-Proteine auch mit dem Sensing des Disaccharides Saccharose verknüpft zu sein, da die „knock out“-Mutanten auf molekularer Ebene eine starke Antwort auf die Applikation mit Saccharose zeigten. Ein potentieller Saccharosesensor könnte der plasmamembranlokalisierte *LeSUT2* sein (BARKER et al., 2000). Die nachgewiesene Koexpression von zellwandgebundenen Invertasen und den MSBP-Proteinen der Gerste (WESCHKE et al., 2003) könnte aber auch darauf hinweisen, dass die Saccharose indirekt durch die Hydrolyse zu Glukose und Fruktose auf die MSBP-Proteine wirkt.

4.8.3 Modell zum Mechanismus der Signalweiterleitung

Die Interaktion der MSBP-Proteine mit anderen Zuckersensoren erfolgt wahrscheinlich nicht direkt, sondern durch einen oder mehrere Interaktionspartner. Die MSBP-Proteine könnten einen proteinogenen Faktor binden, der eine

vermittelnde Rolle beim Zuckersensing spielen könnte. Die Bindung könnte an dem zentralen Loop der MSBP-Proteine erfolgen, der wie bei anderen Zuckertransportern vermutlich in das Zytosol orientiert ist (SAUER & BÜTTNER, 2000; WEBER et al., 2000). Bei der Bindung von Zuckern an die MSBP-Proteine wird dieser proteinogene Faktor freigelassen und kann das durch weitere Sensoren ausgelöste Zuckersensing verstärken (Abb. 4.1).

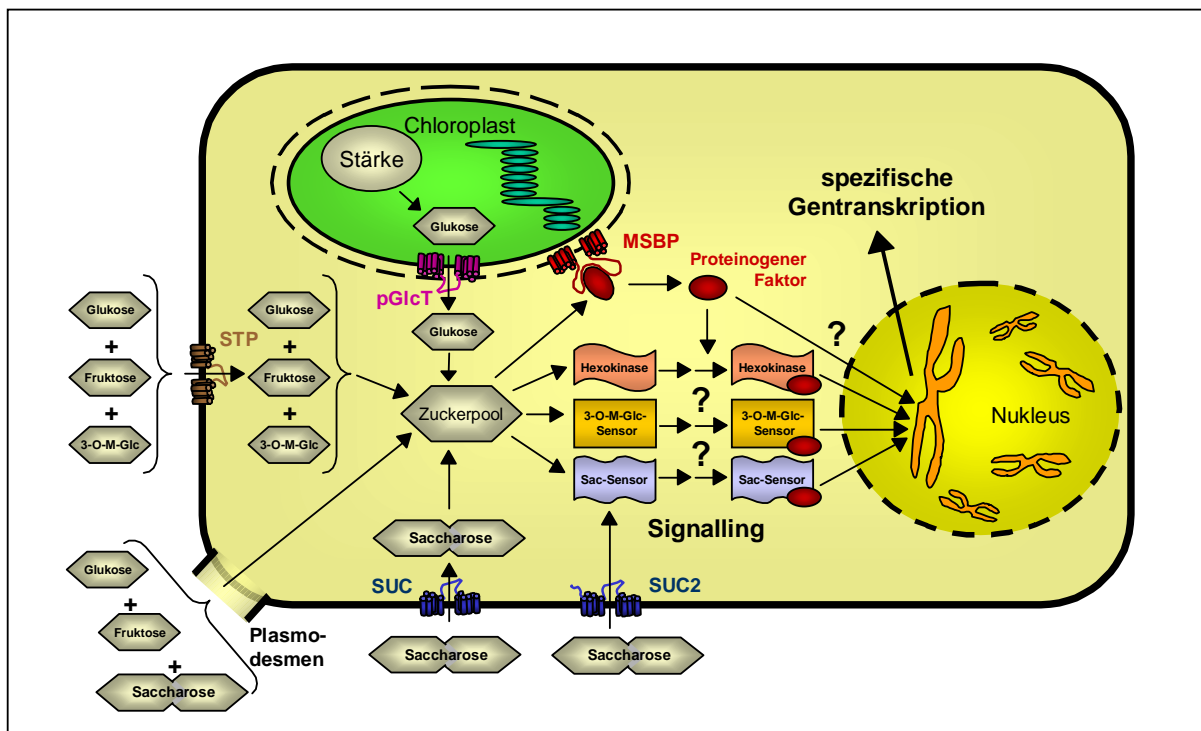


Abbildung 4.1: Modell zur Funktion der MSBP-Proteine in der Pflanzenzelle. MSBP, Monosaccharid Binding Protein; STP, Monosaccharidtransporter; pGlcT, plastidärer Glukosetranslokator; SUC, Saccharosetransporter; SUC2, putativer Saccharosensensor; 3-O-M-Glc, 3-O-Methylglukose; Hexokinase, „Hexokinase-abhängiges“ Sensing; 3-O-M-Glc-Sensor, „Hexokinase-unabhängiges“ Sensing; Sac-Sensor, Saccharosensing.

In den „knock out“-Mutanten könnte dieser Faktor nicht gebunden werden und läge frei vor. Er könnte im Zytosol mit den anderen Zuckersensoren interagieren oder im Kern als Transkriptionsfaktor wirken. Ein solcher Faktor könnte die Akkumulation des *A*MSBP1-Loop-GFP-Fusionsproteins im Kern der transient transformierten Tabakprotoplasten bewirkt haben. So sind auch die sensitiveren Reaktionen der „knock out“-Mutanten zu erklären, da in ihren Zellen die Zuckerkonzentration als höher wahrgenommen würden als tatsächlich vorhanden und ein entsprechendes Signal weitergegeben würde.

Ein ähnliches System, wie das hier für die MSBP-Proteine postulierte, kommt in der Tat in den Hepatozyten (Leberzellen) der Säugetiere vor. Ein kernmembranständiges

regulatorisches Hexokinase-Bindeprotein (GGRP) bindet eine im Zuckersensing involvierte Hexokinase (HXK). Die Bildung des HXK-GGRP-Komplexes unterdrückt die Sensorfunktion der Hexokinase. Die Hexokinase wird freigelassen, wenn an GGRP Zucker binden, in Form des Fruktose-1-Phosphates, welches von einer spezifischen Fruktokinase gebildet wird (VAN SCHAFTINGEN et al., 1997). Die freie Hexokinase kann die intrazelluläre Monosaccharidkonzentration so dann perzipieren (IGLESIA DE LA et al. 2000).

Bei den MSBP-Proteinen führt wahrscheinlich die Bindung von Glukose oder Fruktose zur Freilassung des postulierten Interaktionspartners. Diese Annahme lässt sich auf die Ähnlichkeit der MSBP-Proteine zu anderen Zuckertransportern, wie dem SsGTR aus *Synechocystis*, zurückführen. Da an der äußeren Plastidenmembran keine Zuckerkonzentrationsunterschiede vorliegen, ist der Transport von Zuckern vermutlich nicht das entscheidende Kriterium für die Stabilität bzw. die Auflösung der Bindung des proteinogenen Faktors, sondern das Binden von Zuckern an sich. Dies konnte auch für die Hefesensoren SNF3 und RGT2 gezeigt werden. Auch sie transportieren keine Zucker in signifikanten Mengen und es konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden, dass die Bindung von Zuckern an sich wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung und in Folge dessen zur Weiterleitung des Signals führt (ÖZCAN et al., 1996a).

4.8.4 Identität des postulierten proteinogenen Faktors

Die Identität des postulierten proteinogenen Faktors liegt noch im Dunkeln, aber verschiedene bisher identifizierte Proteine, denen eine Rolle im Zuckersensing der Pflanzen zugeschrieben wird, könnten mit den MSBP-Proteinen interagieren. Eine direkte Interaktion der MSBPs mit den zytosolischen Hexokinasen kann aber eher ausgeschlossen werden, da die „knock out“-Mutanten nicht nur „Hexokinase-abhängiges“, sondern auch „Hexokinase-unabhängiges“ Sensing zeigten. Das „Hexokinase-unabhängige“ Sensing wurde durch die sensitivere Reaktion der „knock out“-Mutanten auf das Hexoseanalog 3-O-Methylglukose bestätigt, dessen Auswirkungen beim Zuckersensing schon lange auf neuartige unbekannte Sensoren in Pflanzen hindeuten (MARTIN et al., 1997; ROITSCH, 1999). Durch die Auswirkung der MSBP-Proteine auf beide „Sensingwege“, und auch auf das Saccharosesensing, scheint der postulierte proteinogene Bindepartner der MSBP-Proteine eher ein im Zuckersensing „down stream“ angesiedelter Faktor zu sein.

Potentielle Interaktionspartner der MSBP-Proteine könnten Transkriptionsfaktoren sein oder auch Komponenten des „Snf1-Kinase-Komplexes“, die wie die MSBP-Proteine eine aspartatreiche Domäne aufweisen. In Hefen und anderen Eukaryoten konnten Komponenten des „Snf1-Kinase-Komplexes“, wie der SNF1-Kinase, SNF4 und SIP4, wichtige Rollen beim Sensing und Signalling der Zucker zugeordnet werden (HARDIE et al., 1998; JOHNSTON, 1999). Auch in Pflanzen wurden SNF1-verwandte-Proteinkinasen (SnRKs) identifiziert. Für sie werden ebenfalls verschiedene Rollen beim Kohlenstoffwechsel und Zuckersignalling postuliert (HALFORD et al., 1992; MURANAKA et al., 1994; HALFORD & HARDIE, 1998; HARDIE et al., 1998; LAKATOS et al., 1999; BOULY et al., 1999).

Hefezellen sind durch verschiedene sich überlappende Wege der Zuckerperzeption zur Feinabstimmung der Genexpression entsprechend der Glukosegehalte in der Lage. Die Situation in Pflanzen ist noch viel komplizierter, da sie selber Kohlenhydrate durch die Photosynthese produzieren können und daher noch eine genaue Koordination zwischen den „Source“- und den „Sink“-Gewebe nötig ist. Im pflanzlichen System könnten die MSBP-Proteine eine Art internen Regulator darstellen, der die Signale der unterschiedlichen Zuckersensoren durch einen noch unbekanntem proteinogenen Faktor miteinander koordiniert und so der Zelle eine fein regulierte Antwort ermöglicht.

Ausblick

Für die heterologe Expression des *AtMSBP1* steht die *Synechocystis 6803*-Deletionsmutante des Glukose/H⁺-Symporters GTR (*ALG1*) zu Verfügung. Durch die Klonierung der Kanamycinresistenz kurz hinter das Stopcodon des *SsGTRs* soll die Rekombination der Fusionskonstrukte in das Genom verbessert werden.

Die zelluläre Lokalisation der *AtMSBP2*- und *AtMSBP*-Proteine wird in Kürze durch die transiente Transformation von GFP-Fusionskonstrukten ermittelt.

Die genaue Lokalisation und zeitliche Expression der einzelnen Isoformen der MSBPs in *Arabidopsis* sollen durch Promotor-GUS-Pflanzen untersucht werden. Es liegen inzwischen transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit einem *AtMSBP3*-Promotor-GUS-Konstrukt vor. Die F2-Generation steht für erste Analysen mittels spezifischer Färbereaktionen bezüglich der Aktivität des *AtMSBP3*-Promotors zur Verfügung. Die *AtMSBP1*- und *AtMSBP2*-Promotoren werden zur Zeit durch PCR amplifiziert und in den GUS-Vektor pGPTV kloniert, um dann transgene Pflanzen herstellen zu können.

Da bisher für den *AtMSBP3* keine „knock out“-Mutanten identifiziert werden konnten, werden transgene Pflanzen mit einem *AtMSBP3*-„RNAi“-Konstrukt für Versuche bezüglich der Funktion des *AtMSBP3* genutzt. Die Pflanzen zeigten in der F2-Generation bereits verringerte *AtMSBP3*-mRNA-Gehalte und liegen inzwischen in der F3-Generation vor.

Die beiden *AtMSBP1::T-DNA*- und *AtMSBP2::T-DNA*-„knock out“-Mutanten wurden gekreuzt, um eine „knock out“-Mutante für beide Isoformen zu erhalten. Die F2-Generation wird zur Zeit auf homozygote Doppelmutanten untersucht. Eine weitere Kreuzung mit den *AtMSBP3*-„RNAi“-Pflanzen wäre zur Erzeugung einer Mutante ohne *AtMSBP*-Proteine denkbar.

Um Aufschluss über die Funktionen des großen zentralen *AtMSBP1*-Loops zu gewinnen, wurden unter anderem transgene „Sense“-Pflanzen erzeugt, die erhöhte Gehalte des *AtMSBP1*-Loops im Plastiden besitzen. Die F2-Generation dieser Pflanzen steht inzwischen für erste Funktionsanalysen zur Verfügung. Es konnten bisher aber noch keine transgenen „Sense“-Pflanzen mit einer zytoplasmatischen Lokalisierung des *AtMSBP1*-Loops erzeugt werden.

Mit Hilfe eines *AtMSBP1*-Loop-GFP-Fusionskonstruktes ohne die aspartatreiche Domäne sollen Aufschlüsse darüber gewonnen werden, ob die aspartatreiche Domäne möglicherweise durch Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle für die Funktion der MSBP-Proteine spielt.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die molekulare und biochemische Charakterisierung des neuartigen Proteins *AtMSBP1* (*Arabidopsis thaliana* Monosaccharid Binding Protein 1) aus der Familie der Zuckertransporter. Dieses Protein weist sowohl strukturelle, als auch funktionelle Besonderheiten im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Zuckertransportern aus *Arabidopsis thaliana* auf.

Die MSBP-Proteine stellen eine eigene Gruppe innerhalb der Monosaccharidtransporter der Pflanzen dar. In *Arabidopsis thaliana* konnten drei Isoformen des MSBP-Typs identifiziert werden und weitere Homologe in verschiedenen Spezies der Angiospermen. Die MSBP-Proteine haben wie andere Zuckertransporter 12 transmembrane Helices, die zwischen Helix 6 und 7 durch einen großen zentralen Loop miteinander verbunden sind. Dieser Loop ist bei den MSBP-Proteinen 4 bis 5 mal so lang wie bei anderen Zuckertransportern. Die MSBP-Proteine weisen mehr Ähnlichkeit zu bakteriellen als zu plasmamembranständigen pflanzlichen Monosaccharidtransportern auf.

Für den *AtMSBP1* konnte kein Transport von Zuckern im Hefesystem gezeigt werden. Allerdings war kein eindeutiger Nachweis der heterologen Expression in unterschiedlichen Hefesystemen oder einer *Synechocystis*-Mutante ohne Zuckertransporter möglich.

Die Isoformen der *AtMSBP*-Proteine konnten auf mRNA-Ebene in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden und zeigen ein spezifisches Expressionsmuster. Der *AtMSBP1* ist vor allem in „Source“-Blättern lokalisiert, während *AtMSBP2* und 3 vor allem in „Sink“-Gewebe nachzuweisen sind.

Der *AtMSBP1* ist in der äußeren Plastidenmembran lokalisiert, trägt dort aber nicht signifikant zum Glukosetransport bei.

AtMSBP1::T-DNA- und *AtMSBP2::T-DNA*-„knock out“-Mutanten zeigen bei der Anzucht auf Erde keine signifikanten phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Bei erhöhten Konzentrationen verschiedener Zucker zeigen aber die „knock out“-Mutanten auf morphologischer und molekularer Ebene einen sensitiveren Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Die Ergebnisse lassen auf eine Verknüpfung der MSBP-Proteine mit den „Zuckersensing-Wegen“ der Pflanzen schließen.

Mit den gewonnenen Ergebnissen wurde ein Modell für die Funktion der MSBP-Proteine erstellt. Die MSBP-Proteine binden vermutlich einen noch unbekanntem proteinogenen Faktor. Dieser wird freigesetzt, wenn Zucker an das MSBP-Protein binden und kann dann mit anderen Zuckersensoren interagieren und so die Expression von zuckersensitiven Genen beeinflussen.

Der große zentrale hydrophile Loop spielt für die Funktion der MSBP-Proteine wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Auch andere membranständige Zuckersensoren weisen deutliche Sequenzerweiterungen auf wie z. B. die Zuckersensoren SNF3 und RGT2 aus der Hefe. Bei dem menschlichen Zuckersensor GLUT2 wurde für den zentralen Loop eine Funktion beim Zuckersensing nachgewiesen.

Eine besondere Funktion könnte die negativ geladene aspartatreiche Domäne im zentralen Loop der MSBP-Proteine spielen. Diese kommt auch in anderen Proteinen vor die an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind.

Der MSBP als eine Art interner Regulator stellt einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der komplexen Vorgänge des Zuckersensing in Pflanzen dar. Im pflanzlichen System könnten mittels des noch unbekanntem proteinogenen Faktors, der an die MSBP-Proteine bindet, die Signale der unterschiedlichen Zuckersensoren miteinander koordiniert werden und so der Zelle eine fein regulierte Antwort auf Zucker ermöglichen.

6. Literatur

- Aloni, B., Daie, J., Wyse, R.E. (1996). Enhancement of [^{14}C] sucrose export from source leaves of *Vicia faba* by gibberellic acid. *Plant Physiol.* 82, 962-67.
- Aoshima, H., Yamada, M., Sauer, N., Komor, E. & Schobert, C. (1993). Heterologous expression of the proton/hexose cotransporter from *Chlorella* in *Xenopus* oocytes and its characterization with respect to sugar specificity, pH and membrane potential. *J. Plant Physiol.* 141, 293-297.
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Baldwin, S.A. (1993). Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 17-49.
- Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M. & Frommer, W.B. (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12, 1153-1164.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. & Masterson, R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* 20, 1195-1197.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. & Lejeune, P. (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5, 1147-1155.
- Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. & Lewis, D.A. (1993). Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259-308.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Boles, E. & Hollenberg, C.P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85-111.
- Bölter, B., May, T. & Soll, J. (1998). A protein import receptor in pea chloroplasts, Toc86, is only a proteolytic fragment of a larger polypeptide. *FEBS Lett.* 441, 59-62.
- Boorer, K.J., Loo, D.D.F. & Wright, E.M. (1994). Steady-state and presteady-state kinetics of the H^+ /hexose cotransporter (STP1) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269, 20417-20424.
- Boorer, K.J., Loo, D.D.F., Frommer, W.B. & Wright, E.M. (1996). Transport mechanisms of the cloned potato H^+ /sucrose cotransporter StSUT1. *J. Biol. Chem.* 271, 25139-25144.
- Bouché-Pillon, S., Fleurat-Lessard, P., Fromont, J.-C., Serrano, R. & Bonnemain, J.-L. (1994). Immunolocalisation of the plasma membrane H^+ -ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading. *Plant Physiol.* 105, 691-697.
- Bouly, J.-P., Gissot, L., Lessard, P., Keis, M., Thomas, M. (1999). *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN α 1: an SNF1-like protein kinase. *Plant J.* 18, 541-50.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bugos, R.C. & Thom, M. (1993). Glucose transporter cDNAs from sugarcane. *Plant Physiol.* 103, 1469-1470.

- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). XL-1 Blue: A high efficiency plasmid transformation rec A *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Bürkle, L., Hibbert, J.M., Quick, W.P., Kühn, C., Hirner, B. & Frommer, W.B. (1998). The H⁺-sucrose co-transporter NtSUC1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol.* 118, 59-68.
- Büttner, M., Truernit, E., Baier, K., Scholz-Starke, J., Sontheim, M., Lauterrbach, C., Huß, V.A.R., Sauer, N. (1999). AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosacchharide-H⁺ symporter of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 23, 175-184.
- Büttner, M., Truernit, E., Baier, K., Scholz-Starke, J., Sontheim, M., Lauterbach, C., Huss, V.A.R. & Sauer, N. (2000). AtSTP3, a green leaf-specific, low affinity monosaccharide-H⁺ symporter of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 23, 1365-3040.
- Büttner, M. & Sauer, N. (2000). Monsaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 263-274.
- Bush, D.R. (1990). Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiol.* 93, 1590-1596.
- Bush, D.R. (1993). Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 513-542.
- Celenza, J.L. & Carlson, M. (1989a). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5034-5044.
- Celenza, J.L. & Carlson, M. (1989b). Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5045-5054.
- Cereghino, G.P. & Scheffler, I.E. (1996). Genetic analysis of glucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus mRNA turnover. *EMBO J.* 15, 363-374.
- Chen, Y. & Tye, B.K. (1995). The yeast Mcm1 protein is regulated posttranscriptionally by the flux of glycolysis. *Mol. Cell Biol.* 15, 4631-9.
- Cheng, C.L., Acedo, G.N., Cristinsin, M., Conkling, M.A. (1992). Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1861-1864.
- Chiou, T.J. & Bush, D.R. (1996). Molecular cloning, immunochemical localization to the vacuole, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiol.* 110, 511-520.
- Chrispeels, M.J., Crawford, N.M. & Schroeder, J.I. (1999). Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cell. *Plant Cell.* 11, 661-675.
- Chuang, C.-F. & Meyerowitz, E.M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4985-4990.
- Church, G.M. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7624-7628.

- Cline, K., Werner-Washburne, M., Andrews, J. & Keegstra, K. (1981). Thermolysin is a suitable protease for probing the surface of intact pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 75, 675-678.
- Clough, S. & Bent, A. (1997). Simplifies Arabidopsis Transformation Protocol. <http://www.cropsci.uiuc.edu/~bent/protocol.ht>
- Coons, D.M., Vagnoli, P., Bisson, L.F. (1997). The c-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: SNF3 functions in glucose recognition. *Yeast* 13, 9-20.
- Corbesier, L., Lejeune, P. & Bernier, G. (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206, 131-137.
- Cortés, S., Gromova, M., Evrard, A., Roby, C., Heyraud, A., Rolin, D.B., Raymond, P. & Brouquisse, R.M. (2003). In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol.* 131, 824-837.
- Criqui, M.C., Durr, A., Parmentier, Y., Marbach, J., Fleck, J., Jamet, E. (1992). How are photosynthetic genes repressed in freshly-isolated mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*? *Plant Physiol. Biochem.* 30, 597-601.
- Cséke, C. & Buchanan, B.B. (1986). Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 853, 43-63.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Levine, A., Giller, Yu. Ratner, K. and Granot, D. (1999) Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence. *Plant Cell*, 11, 1253-1266.
- Damm, B., Schmidt, R. & Willmitzer, L. (1989). Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 217, 6-12.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep, version two. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21.
- Delrot, S. & Bonnemain, J.L. (1985). Mechanism and control of phloem transport. *Physiol. Veg.* 23, 199-220.
- Delrot, S., Atanassova, R. & Maurousset, L. (2000). Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 281-306.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Höner, C.B. & Hollenberg, C.P. (1991). An efficient transformation procedure enabling longterm storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7, 691-692.
- Ehness, R. & Roitsch, T. (1997). Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant J.* 11, 539-548.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E. & Roitsch, T. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9, 1825-1841.
- Entian, K.D. (1980). Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 178, 633-637.
- Epstein, P., Boschero, A.C., Atwater, I., Cai, X. & Overbeek, P.A. (1992). Expression of yeast hexokinase in pancreatic beta cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12038-12042.

- Eschrich, W. (1989). Phloem unloading of photoassimilates. In: Transport of Photoassimilates; Baker, D.A. & Milburn, J.A. (Hrsg.). Longman Scientific & Technical, Essex, pp. 206-263.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny inference package) manual, version 3.5c (Univ. Washington, Seattle, Dept. Genetics).
- Felsenstein, J. Phylip (2002). (Phylogeny Inference Package) Version 3.6 a. Distributed by the author. Seattle, Washington, USA, University of Washington, Department of Genetics.
- Fernández, R., Herrero, P., Fernández, E., Fernández, M.T., López-Boado, Y.S. & Moreno, F. (1988). Autophosphorylation of yeast hexokinase PII. J. Gen. Microbiol. 134, 2493-2498.
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., Goodman, H.M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. Plant Cell 10, 1043-54.
- Flügge, U.I. & Heldt, H.W. (1977). Specific labelling of a protein involved in phosphate transport of chloroplasts by pyridoxal-5'-phosphate. FEBS Lett. 82, 29-33.
- Flügge, U.I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F. & Eckerskorn, C. (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleic acid sequence of a full length cDNA clone. EMBO J. 8, 39-46.
- Flügge, U.I. (1999). Phosphate translocators in plastids. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 27-45.
- Gahrtz, M., Stolz, J. & Sauer, N. (1994). A phloem-specific sucrose H⁺ symporter from *plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. Plant J. 6, 697-706.
- Gahrtz, M., Schmelzer, E., Stolz, J. & Sauer, N. (1996). Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *plantago major* L. is induced during seed development. Plant J. 9, 93-100.
- Gamalei, Y.V. (1985). Characteristics of phloem loading in woody and herbaceous plants. Fiziol Rastenii 32, 866-875.
- Gamalei, Y.V. (1989). Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs: A taxonomic review. Trees 3, 96-110.
- Gancedo, C. & Gancedo, M. (1985). Phosphorylation of 3-O-methyl-glucose and catabolite repression in yeast. Eur. J. Biochem. 148, 593-597.
- Geigenberger, P., Stamme, C., Tjaden, J., Schulze, A., Quick, W.P., Betsche, T., Kersting, H.J. & Neuhaus, H.E. (2001). Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic potato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. Plant Physiol. 125, 1667-1678.
- Getz, H.P., Knauer, D. & Willenbrink, J. (1987). Transport of sugars across the plasma membrane of beetroot protoplasts. Planta 171, 185-196.
- Gibson, S.T. & Graham, I.A. (1999). Another player joins the complex field of sugar regulated gene expression in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4746-48.
- Gibson, S.J. (2000). Plant sugar-response pathways. Part of a regulatory web. Plant Physiol. 124, 1532-1539.
- Gleave, A.P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into plant genome. Plant Molecular Biology 20, 1203-1207.

- Gogarten, J.P. & Bentrup, F.W. (1989). Substrate specificity of the hexose carrier in the plasma membrane of *Chenopodium* suspension cells probes by transmembrane exchange diffusion. *Planta* 178, 52-60.
- Görlich, D. & Mattaj, I.W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518.
- Graham, I.A., Denby, K.J. & Leaver, C.J. (1994a). Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6, 761-772.
- Graham, I.A., Baker, C.J., Leaver, C.J. (1994b). Analysis of the cucumber malate synthase gene promotor by transient expression and gel retardation assays. *Plant J.* 6, 893-902.
- Grebenok, R.J., Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.-H., Afonso, C.L., Haldeman-Carrington, J.C., Galbraith, D.W. (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J.* 11, 573-586.
- Griffith, J.K., Barker, M.E., Rouch, D.A. (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opinions Cell Biol.* 4, 684-695.
- Guillam, M.-T., Hümmeler, E., Schaerer, E., Wu, J.-Y. & Birnbaum, M.J. (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat. Gen.* 17, 327-330.
- Guillemain, G., Loizeau, M., Pincon-Raymond, M., Girard, J. & Leturque, A. (2000). The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signalling in hepatic cells. *J. Cell Science* 113, 841-847.
- Halford, N.G., Vincente-Carbajosa, J., Sabelli, P.A., Shewry, P.R., Hannappel, U., Kreis, M. (1992). Molecular analysis of a barley multigene family homologous to the yeast protein kinase gene *SNF1*. *Plant J.* 2, 791-797.
- Halford, N.G. & Hardie, D.G. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37, 735-748.
- Halford, N.G., Purcell, P., Hardie, D.G. (1999). Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends Plant Sci.* 4, 117-120.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hardie, D.G., Carling, D. & Carlson, M. (1998). The AMP-activated/Snf1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eucaryotic cell. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 821-855.
- Harrington, G.N., Franceschi, V.R., Offler, C.E., Patrick, J.W., Harper, J.F., Frommer, W.B., Tegeder, M. & Hitz, W.D. (1997). Cell specific expression of three genes involved in plasma membrane sucrose transport in developing *Vicia faba* seed. *Protoplasma* 197, 160-173.
- Harrison, M.J. (1996). A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Plant J.* 9, 491-503.
- Hayes, P.M., Offler, C.E. & Patick, J.W. (1985). Cellular structures, plasma membrane surface areas and plasmodesmatal frequencies of the stem of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to radial photosynthate transfer. *Ann. Bot.* 56, 125-138.
- Hediger, M.A. (1994). Structure, function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes. *J. Exp. Biol.* 196, 15-49.
- Henderson, P.J.F. (1991). Sugar transport proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 590-601.

- Henderson, P.J.F. (1993). The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 708-721.
- Henderson, P.J., Roberts, P.E., Martin, G.E., Seamon, K.B., Walmsley, A.R., Rutherford, N.G., Varela, M.F., Griffith, J.K. (1993). Homologous sugar-transport proteins in microbes and man. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 1002-6.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W.B., Métraux, J.-P. & Sonnewald, U. (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8, 793-803.
- Hirose, T., Imaizumi, N., Scofield, G.N., Furbank, R.T. & Ohsugi, R. (1997). cDNA cloning and tissue-specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 38, 1389-1396.
- Ho, L.C. & Baker, D.A. (1982). Regulation of loading and unloading in long distance transport systems. *Physiol. Plant.* 56, 225-230.
- Höfgen, R. & Willmitzer, K. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* 16, 9877.
- Hua, J. & Meyerowitz, E.M. (1998). Ethylene response are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94, 261-71.
- Huijser, C., Kortsee, A., Pego, J.V., Wisman, E., Weisbeck, P. & Smeekens, S.C.M. (2000). The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*. Involvement of abscisic acid in sugar response. *Plant J.* 23, 577-585.
- Humphreys, T.E. (1988) Phloem transport - with emphasis on loading and unloading. In: *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*, Baker, D.A. & Hall, J.L. (Hrsg.) Harlow, UK: Longman, pp 305-345.
- Hurth, M. (2002). Physiologische Untersuchungen eines putativen Na⁺-Dikarbonsäure-Cotransporters aus *Arabidopsis thaliana* (L.). Diplomarbeit Universität Kaiserslautern.
- Iglesia de la, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J.J. & Agius, L. (2000). The role of the regulatory protein of glukokinase in the glucose sensory mechanisms of the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 275, 10597-10603.
- Imalu, A., Truernit, E., Sauer, N. (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 11, 309-322.
- Island, M.D. & Kadner, R.J. (1993). Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. *J. Bacteriol.* 175, 5028-5034.
- Jang, J.C. & Sheen, J. (1994). Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6, 1665-1679.
- Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L. & Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9, 5-19.
- Jiang, H., Medintz, I. & Michels, C.A. (1997). Two glucose sensing/signaling pathways stimulate glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *Mol. Biol. Cell.* 8, 1293-1304.
- Johansen, L.K. & Carrington, J.C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-Mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126, 930-938.

- Johnston, M. (1999). Feasting, fasting, and fermenting. *Trends Genet.* 15, 29-33.
- Juergensen, K., Scholz-Starke, J., Sauer, N., Hess, P., van Bel, A.J.E. & Grundler, F.M.W. (2003). The companion cell-specific *Arabidopsis* disaccharid carrier AtSUC2 is expressed in nematode-induced syncytia. *Plant Physiol.* 131, 61-69.
- Joyard, J., Grossman, A., Bartlett, S.G., Douce, R. & Chua, N.-H. (1982). Characterization of envelope membrane polypeptides from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 257, 1095-1101.
- Keegstra, K. & Yousif, A.E. (1986). Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes. *Meth. Enzymol.* 118, 316-325.
- Klein, D. & Stitt, M. (1998). Effects of 2-deoxyglucose on the expression of RBCS and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell suspension cultures. *Planta* 205, 223-234.
- Knop, C., Voitsekhovskaja, O., Lohaus, G. (2001). Sucrose transporters in two members of the *Scrophulariaceae* with different types of transport sugar. *Planta* 213, 80-91.
- Koch, K.E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540.
- Koncz, C. & Schell, J. (1986). The promotor of T_{-L} DNA gens controls the chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kost, B., Spielhofer, P. & Chua, N.-H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J.* 16, 393-401.
- Kovallik, K.V. (1994). From endosymbionts to chloroplasts: Evidence for a single prokaryotic/eukaryotic endocytobiosis. *Endocytobiosis and Cell Research* 10, 137-140.
- Kragler, F., Monzer, J.K., Xoconostle-Cázares, B. & Lucas, W.J. (1998). Cell-to-cell transport of proteins: Requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J.* 15, 367-381.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C., Stitt, M. (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the "sink regulation" of photosynthesis? *Plant J.* 3, 817-828.
- Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166, 283-292.
- Kühn, C., Quick, W.P., Schulz, A., Sonnewald, U. & Frommer, W.B. (1996). Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ.* 19, 1115-1123.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoire, R. & Frommer, W.B. (1997). Localisation and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements indicate macromolecular trafficking. *Science* 275, 1298-1300.
- Kühn, C., Hajirezaei, M.-R., Fernie, A.R., Roessner-Turnali, U., Czechowski, T., Hirner, B. & Frommer, W.B. (2003). The sucrose transporter StSUC1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol.* 131, 102-131.
- Kyte, J.K. & R.F. Doolittle (1982). A simple method for the displaying the character of proteins *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lakatos, L., Klein, M., Hofgen, R., Banfalvi, Z. (1999). Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J.* 17, 569-74.

- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. & Ward, J.M. (1999). The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11, 707-726.
- Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lazorowitz, S.R. & Beachy, R.N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11, 535-548.
- Lee, K. & Levin, D.E. (1991). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* 12, 172-182.
- Lemoire, R., Kühn, C., Thiele, N., Delrot, S. & Frommer, W.B. (1996). Antisense inhibition of the sucrose transporter: Effects on amount of carrier and sucrose transport activity. *Plant Cell Environ.* 19, 1124-1131.
- Lemoire, R., Bürkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kühn, C., Regnacq, M., Gaillard, C., Delrot, S. & Frommer, W.B. (1999). Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett.* 454, 325-330.
- Lemoire, R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 246-262.
- Lesage, P., Yang, X., Carlson, M. (1996). Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C₆ zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1921-1928.
- Liang, H. & Gaber, R.F. (1996). A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by SNF3-regulated expression of HXT6. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953-1966.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S. & Chua, N.H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4782-4787.
- Lucas, W.D., Ding, B. & van der Schoot, C. (1993). Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* 125, 435-476.
- Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. & Hake, S. (1995). Selective trafficking of KNOTTED-1 homeodomain protein and its RNA through plasmodesmata. *Science* 270, 1980-1983.
- Ludwig, A., Stolz, J. & Sauer, N. (2000). Plant sucrose-H⁺ symporters mediate the transport of vitamin H. *Plant J.* 24, 503-509.
- Ma, H., Bloom, L.M., Zhu, Z., Walsh, C.T. & Botstein, D. (1989). The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5643-5649.
- Madore, M.A. & Webb, J.A. (1981). Leaf free space analysis and vein loading in *Cucurbita pepo*. *Can. J. Bot.* 59, 2550-2557.
- Magasanik, B. (1961). Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 249-256.
- Marger, M.D. & Saier, M.H.J. (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18, 13-20.

- Marshall-Carlson, L., Celenza, J.L., Laurent, B.C. & Carlson, M. (1990). Mutational analysis of the SNF3 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1105-1115.
- Martin, T., Hellman, H., Schmidt, R., Willmitzer, L. & Frommer, W.B. (1997). Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J.* 11, 53-62.
- Marty, F. (1999). Plant vakuoles. *Plant Cell* 11, 587-599.
- Matsukura, C.-A., Saitoh, T., Hirose, T., Ohsugi, R., Perata, P. & Yamaguchi, J. (2000). Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light. *Plant Physiol.* 124, 85-93.
- Maynard, J.W. & Lukas, W.J. (1982). Sucrose and glucose uptake in *Beta vulgaris* leaf tissue. A case for a general (apoplastic) retrieval system. *Plant Physiol.* 70, 1436-1443.
- Meyer, S., Melzer, M., Truernit, E., Hummer, C., Besenbeck, R., Stadler, R. & Sauer, N. (2000). *AtSUC3*, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J.* 24, 869-882.
- Minchin, P.E.H. & Thorpe, M.R. (1987). Measurement of unloading and reloading of photoassimilates within the stem of bean. *J. Exp. Bot.* 38, 211-220.
- Monroy, A.F. & Schwarzbach, S.D. (1984). Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2786-2790.
- Mueckler, M. (1993). Glucokinase, glucose sensing, and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 427-430.
- Muller, S., Boles, E., May, M., Zimmermann, F.K. (1995). Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 4517-4519.
- Müller-Röber, B., Kossmann, J., Hannah, L.C., Willmitzer, L. & Sonnewald, U. (1990). One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* 224, 136-146.
- Muranaka, T., Banno, H., Machida, Y. (1994). Characterization of tobacco protein-kinase npk5, a homolog of *Saccharomyces-cerevisiae snf1* that constitutively activates expression of the glucose-repressible *suc2* gene for secreted invertase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2958-2965.
- Murashige, F. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-496.
- Németh, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kalman, Z. (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1: a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 12,
- Neuhaus, H.E. & Stitt, M. (1989). Perturbation of photosynthesis in spinach leaf discs by low concentrations of methyl viologen. *Planta* 179, 51-60.
- Neuhaus H.E. (1990). Wechselwirkung zwischen Chloroplast und Zytoplasma während der Photosynthese. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Neuhaus, H. E., Thom, E., Möhlmann, T., Steup, M., Kampfenkel, K. (1997). Characterization of novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis*. *Plant J.* 11, 73-82.

- Neuhaus, H.E. & Wagner, R. (2000). Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 307-323.
- Newmann, T., De Bruin, F.J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., Mc Intosh, L., Ohlrogge, J.B., Raikel, N., Sommerville, S., Thomashow, M., Retzel, E. & Sommerville, C.R. (1994). Genes galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* clones. *Plant Physiol.* 106, 1241-1255.
- Nicholas, K. B. & Nicholas, H. B. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the authors.
- Nishihama, R., Banno, H., Kawahara, E., Irie, K. & Machida, Y. (1997). Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J.* 12, 39-48.
- Noiraud, N., Delrot, S., Lemoine, R. (2000). The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122, 1447-1456.
- Orlich, G. & Komor, E. (1989). Phloem transport. *Meth. Enzymol.* 174, 288-312.
- Oparka, K.J. & Turgeon, R. (1999). Sieve elements and companion cells – Traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* 11, 739-750.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa-Cruz, S., Roberts, L., Pradel, K.S., Imalu, A., Kotlitzky, G., Sauer, N., Epel, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non-specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97, 743-754.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T. & Nakamura, K. (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 252–261.
- Özcan, S. & Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enables yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564-1572.
- Özcan, S. & Johnston, M. (1996). Two different repressors collaborate to restrict expression of yeast glucose transporter genes HXT2 and HXT4 to low levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5536-5545.
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wöfl, S. & Johnston, M. (1996a). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1-5.
- Özcan, S., Leong, T. & Johnston, M. (1996b). Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6419-6426.
- Özcan, S., Dover, J. & Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signalling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 2566-2573.
- Özcan, S. & Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 554-569.
- Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12, 357-358.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. & Saier, M.H. Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1-34.

- Passonneau J.V. & Lowry O.H. (1993). *Enzymatic Analysis : A Practical Guide*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. & Jacobson, G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543-594.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.-D. & Prieto, J.A. (1998). Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2940-2948.
- Reinders, A., Schulze, W., Kühn, C., Barker, L., Schulz, A., Ward, J.M. & Frommer, W.B. (2002). Protein-Protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *Plant Cell* 14, 1567-1577.
- Rentsch, D., Boorer, K. & Frommer, W.B. (1998). Molecular biology of sucrose, amino acid and oligopeptide transporters at the plasma membrane of plant cells. *J. Membr. Biol.* 162, 177-190.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L. & Frommer, W.B. (1992). Isolation and characterisation of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11, 4705-4713.
- Riesmeier, J.W., Flügge, U.I., Schulz, B., Heineke, D., Heldt, H.W., Willmitzer, L. & Frommer, W.B. (1993). Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6160-6164.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L. & Frommer, W.B. (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J.* 13, 1-7.
- Rippka, R. & Herdman, M. (1992). *Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains in Axenic Culture, Catalogue and Taxonomic Handbook*. 103 pp. Institut Pasteur, Paris.
- Rocha-Sosa, M., Sonnenwald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. & Willmitzer, L. (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a patatin class I gene. *EMBO J.* 8, 23-29.
- Roitsch, T. & Tanner, W. (1994). Expression of a sugar-transporter gene family in a photoautotrophic suspension culture of *Chenopodium rubrum* L. *Planta*, 193, 365-371.
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 108, 285-294.
- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 198-206.
- Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11, 12-17.
- Rolland, F., Moore, B. & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14, 185-205.
- Rose, M., Albig, W. & Entian, K.-D. (1991). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *Eur. J. Biochem.* 199, 511-518.
- Saier, M.H. Jr. & Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol.* 13, 755-64.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory).

- Sauer, N & Tanner, W. (1989). The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. FEBS Lett. 259, 43-46.
- Sauer, N., Caspari, T., Klebl, F. & Tanner, W. (1990a). Functional expression of the *Chlorella* hexose transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7949-7952.
- Sauer, N., Friedländer, K. & Gräml-Wicke, U. (1990b). Primary structure, genomic organisation and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. EMBO J. 9, 3045-3050.
- Sauer, N. (1992). Proton-sugar co-transporters in plants. In: Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes, Cooke, D.T. & Clarkson, D.T. (Hrsg.) Plenum Press, New York, pp 67-75.
- Sauer, N. & Stadler, R. (1993). A sink-specific H⁺-monosaccharid co-transporter from *Nicotiana tabacum*: Cloning and heterologous expression in baker's yeast. Plant J. 4, 601-610.
- Sauer, N. & Stolz, J. (1994). Two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*. Expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. Plant J. 6, 67-77.
- Schäfer, G., Heber, U. & Heldt, H.W. (1977). Glucose transport into spinach chloroplasts. Plant Physiol. 60, 286-289.
- Schmetterer, G.R. (1990). Sequence conservation among the glucose transporter from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mamalian glucose transporters. Plant Mol. Biol. 14, 697-706.
- Schmitz, K., Cuypers, B. & Moll, M. (1987). Pathway of assimilate transfer between mesophyll cells and minor veins in leaves of *Cucumis melo* L.. Planta 171, 19-29.
- Schweizer, P., Pokorny, J. & Schulze-Lefert, P. & Dudler, R. (2000). Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. Plant J. 24, 895-903.
- Shakya, R. & Sturm, A. (1998). Characterisation of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. Plant Physiol. 118, 1473-1480.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagirl, F., Glazebrook, J., Law, M. & Goff, S.A. (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. Plant Cell 14, 2985-2994.
- Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell 2, 1027-1039.
- Sheen, J. (1994). Feedback-control of gene expression. Photosynth. Res. 39, 427-438.
- Sheen, J., Zhou, L. & Jang, J.C. (1999). Sugars as signalling molecules. Curr. Opin. Plant Biol. 2, 410-418.
- Sjölund, R.D. (1997). The phloem sieve element: A river runs through it. Plant Cell 9, 1137-1146.
- Slone, H.J., Buckhout, T.J. & Vanderwoude, W.J. (1991). Symport of proton and sucrose in plasma membrane vesicles isolated from spinach leaves. Plant Physiol. 96, 615-618.
- Smeekens, S. & Rook, F. (1997). Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. Plant Physiol. 115, 7-13.

- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49-81.
- Soll, J. & Tien, R. (1998). Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Mol. Biol.* 39, 191-207.
- Stadler, R., Brandner, J., Schulz, A., Gahrts, M. & Sauer, N. (1995b). Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *The Plant Cell* 7, 1545-1554.
- Stadler, R. & Sauer, N. (1996). The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* 109, 299-308.
- Stadler, R., Truernit, E., Gahrts, M. & Sauer, N. (1999). The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 19, 269-278.
- Stitt, M., Krapp, A., Klein, D., Röper-Schwarz, U., Paul, M. (1995). Do carbohydrates regulate photosynthesis and allocation by altering gene expression? See 104a, pp. 68-77.
- Stolz, J., Stadler, R., Opekarová, M. & Sauer, N. (1994). Functional reconstitution of the solubilized *Arabidopsis thaliana* STP1 monosaccharide-H⁺ symporter in lipid vesicles and purification of the histidine tagged protein from transgenic *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J.* 6, 225-233.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990). The use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185, 60-89.
- Stülke, J. & Hillen, W. (1998). Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 85, 583-92.
- Sturm, A. & Chrispeels, M.J. (1990). cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107-1119.
- Sze, H. Li, X. & Palmgren, M.G. (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11, 677-689.
- Tanner, W. & Caspari, T. (1996). Membrane transport carriers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 595-626.
- Tegeder, M., Wang, X.D., Frommer, W.B., Offler, C.E. & Patrick, J.W. (1999). Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J.* 18, 151-161.
- Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995). Trehalose synthase: Guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* 20, 3-10.
- Thom, E. (1996). Analyse des oxidativen Penthose-Phosphatwegs in verschiedenen Plastidentypen, Regulation und beteiligte Transportprozesse. Dissertation, Universität Osnabrück.
- Thomas, B.R. & Rodriguez, R.L. (1994). Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* 106, 1235-1239.
- Thomson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673-4680.

- Thorens, B., Sarkar, H.K., Kaback, H.R. & Lodish, H.F. (1989). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55, 281-290.
- Thorens, B. (2001). GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection. *Mol. Membr. Biol.* 18, 265-273.
- Thorneycroft, D., Sherson, S.M. & Smith, S.M. (2001). Using gene knock outs to investigate plant metabolism. *J. Exp. Bot.* 52, 1593-1601.
- Tjaden, J. (1996). Molekulare Analyse eines Proteins mit vermuteter Zuckertransportfunktion aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit Universität Osnabrück.
- Trentmann, O. (1998). Weiterführende Untersuchungen an einem Protein mit vermuteter Zuckertransportfunktion aus *Arabidopsis thaliana* L. Diplomarbeit Universität Osnabrück.
- Truernit, E. & Sauer, N. (1995). The promotor of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196, 564-570.
- Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J. & Sauer, N. (1996). The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharid transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *The Plant Cell* 8, 2169-2182.
- Truernit, E., Stadler, R., Baier, K. & Sauer, N. (1999). A male gametophyte-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Plant J.* 17, 191-201.
- Tubbe, A. & Buckhout, T.J. (1992). *In vitro* analysis of the H⁺-hexose symporter on the plasma membrane of sugarbeets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 99, 945-951.
- Tung, K.-S., Norbeck, L.L., Nolan, S.L., Atkinson, N.S. & Hopper, A.K. (1992). *SFN1*, a yeast gene involved inn RNA processing, is identical to *HEX2/REG1*, a negative regulator in glucose repression. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2673-2680.
- Ullmann, A. (1996). Catabolic repression: a story without end. *Res. Microbiol.* 147, 455-458.
- Ulrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. & Goodman, H.W. (1977). Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196, 1313-1316.
- Vagnoli, P., Coons, D.M. & Bisson, L.F. (1998). The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 31-36.
- Vallari R.C., Cook, W.J., Audino, D.C., Morgan, M.J., Jensen, D.E., Laudano, A.P., Denis, C.L. (1992). Glucose repression of the yeast ADH2 gene occurs through multiple mechanisms, including control of the protein synthesis of its transcriptional activator, ADR1. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1663-1673.
- van Bel, A.J.E. & Kempers, R. (1990). Symplastic isolation of the sieve element companion cell complex in the phloem of *Ricinus communis* and *Salix alba* stems. *Planta* 183, 69-76.
- van Bel, A.J.E. & Gamalei, Y.V. (1992). Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant Cell Environ.* 15, 265-270.
- van Bel, A.J.E., Amerlaan, A., van Dijk, A.A (1994). A three-step screening procedure to identify the mode of phloem loading in intact leaves: Evidence for symplastic and apoplastic phloem loading associated with the type of companion cell. *Planta* 192, 31-39.

- van Oosten, J.J., Gerbaud, A., Huijser, C., Dijkwel, P.P., Chua, N.-H., Smeekens, S.C.M. (1997). An *Arabidopsis* mutant showing reduced feedback inhibition of photosynthesis. *Plant J.* 12, 1011-20.
- van der Schoot, C. & van Bel, A.J.E. (1990). Mapping membrane potentials and dye coupling in internodal tissues of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Planta* 182, 9-21.
- van Schaftingen, E., Veiga-da-Cunha, M. & Niculescu, L. (1997). The regulatory protein of glucokinase. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 136-140.
- von Armin, A.G., Deng, X.-W., Stacey, M.G. (1998). Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 221, 35-43.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., van Montagu, M. & Schell, J. (1975). Charakterisation of different plaque-forming and defective template phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol.* 26, 33-48.
- Vreugdenhil, D. (1983). Abscisic acid inhibits phloem loading of sucrose. *Physiol. Plant.* 57, 463-67.
- Waegemann, K. & Soll, J. (1991). Characterisation of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1, 149-168.
- Waegemann, K. & Soll, J. (1995). Characterisation and isolation of the chloroplast protein import machinery. *Methods Cell Biol.* 50, 255-267.
- Walker, N.A., Patrick, J.W., Zhang, W. & Fieuw, S. (1995). Mechanism of photosynthate efflux from seed coats of *Phaseolus vulgaris*: A chemiosmotic analysis. *J. Exp. Bot.* 46, 539-549.
- Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud, F., Gould, G.W. (1998). Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* 23, 476-481.
- Ward, J., Kühn, C., Tegeder, M. & Frommer, W.B. (1998). Sucrose transport in plants. *Int. Rev. Cytol.* 178, 41-71.
- Weaver, J. (1995). Elektroporation protocols for microorganisms. *Methods in Mol. Biol.* 47, 1-26.
- Weber, A., Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C. & Flügge, U.I. (1995). The 2-oxoglutarate/malate translocator of the chloroplasts envelope membranes: Molecular cloning of a transporter containing 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochem.* 34, 2621-2627.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P. & Wobus, U. (1995). Seed coat-associated invertases of faba bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and celltype specific expression. *Plant Cell* 7, 1835-1846.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. & Wobus, U. (1997). A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterisation of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9, 895-908.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.E., Koffler, H., Hille, D., Groner, F., Hebbeker, U. & Flügge, U.I. (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12, 787-802.

- Weig, A., Franz, J., Sauer, N. & Komor, E. (1994). Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. *J. Plant Physiol.* 143, 178-183.
- Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis. A Laboratory Manual.* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B. & Ward, J.M. (2000). A new Subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in nucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12, 1345-1355.
- Wendell, D.L. & Bisson, L.F. (1994). Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.* 176, 3730-3737.
- Wendt, U.K., Wenderoth, I., Tegeler, A., Von Schaewen, A. (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 23, 723-33.
- Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neuborn, B., Weber, H. (2000). Sucrose transport into barley seeds: molecular characterisation of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J.* 21, 455-467.
- Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H. & Wobus, U. (2003). The role of invertase and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant Journal* 33, 395-411.
- Williams, L.E., Lemoine, R. & Sauer, N. (2000). Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *TIPS* 5 (7), 283-290.
- Wright, K. & Oparka, K.J. (1989). Sucrose uptake and partitioning in discs derived from source versus sink potato tubers. *Planta* 177, 237-244.
- Ylstra, B., Garrido, D., Busscher, J. & van Tunen, A.J. (1998). Hexose transport in growing *Petunia* pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiol.* 118, 113-125.
- Xiao, W., Sheen, J. & Jang, J.C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* 44, 451-461.
- Xoconostle-Càzares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R. & Lucas, W.J. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283, 94-98.
- Zamski, E. & Schaffner, A.A. (1996). *Photoassimilates, Distribution plants and Crops.* (New York: Decker).
- Zhou, J.J., Theodolou, F., Sauer, N., Sanders, D. & Miller, A.J. (1997). A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an *Arabidopsis* H⁺/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Membr. Biol.* 159, 113-125.
- Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L., Sheen, J. (1998). Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10294-99.
- Zimmermann, M.H. & Ziegler, H. (1975). List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In *Transport in plants, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 1. I. Phloem Transport*, M.H. Zimmermann and J.A. Milburn, eds (New York: Springer-Verlag), pp. 245-271.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc	„Accession“-Nummer
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	MAP-Kinase
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Acker-Schmalwand)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
<i>Bn</i>	<i>Brassica napus</i> (Raps)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
<i>Bv</i>	<i>Beta vulgaris</i> (Rübe)
C	Cytosin
ca.	circa
CAB	Photosystem II Typ I Chlorophyll a/b Bindeprotein (Lhb1B1)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
<i>Ck</i>	<i>Chlorella kessleri</i>
Clm	Chloramphenikol
CO ₂	Kohlendioxid
<i>Cr</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CTP	Cytidintriphosphat
d	desoxy
dATP	2'-Desoxyadenosinphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT _{red}	reduziertes Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i> , <i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EMBL	„European Molecular Biology Laboratory“
EST	„expressed sequence tag“
F6P	Fruktose-6-Phosphat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>G</i>	<i>Gossypium</i> (Baumwolle)
G	Guanin
g	Gramm
% (w/v)	Gewichtsprozent
<i>Gm</i>	<i>Glycine max</i> (Soja)
G3P	Glycerol-3-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTR	Glukosetransporter (<i>Synechocystis 6803</i>)
h	Stunde
<i>Ha</i>	<i>Helianthus annuus</i> (Sonnenblume)
HCl	Salzsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazino]-Ethansulfonsäure

His-tag	Histidin-Tag (engl. für Fortsatz, Anhang)
H ₂ O	Wasser
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
HUP	Hexose Uptake Protein
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare subsp vulgare</i> (Gerste)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
<i>in frame</i>	im Leseraster
J	Joule
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
kDA	Kilodalton
KH ₂ PO	Kaliumdihydrogenphosphat
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
λ (lambda)	Wellenlänge
<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Le</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> (Tomate)
<i>Ls</i>	<i>Lactuca sativa</i> (Kopfsalat)
μ	mikro
m	milli
M	Molar (mol/l)
<i>Mc</i>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (Eisblume)
MCS	„multiple cloning site“ (multiple Klonierungsstelle)
mg	Miligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
MOPS	2-(N-morpholino)Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
<i>Mt</i>	<i>Medicago truncatula</i> (Lucerne)
MSBP	Monosaccharid Binding Protein
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat), oxidierte Form
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat), reduzierte Form
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
<i>Np</i>	<i>Nostoc punctiforme</i>
NR	Nitratreduktase1 (NIA1)
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabak)
NTT	Nukleotid-Translokator
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i> (Reis)
PC	Plastocyanin
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PEP	Phosphoenolpyruvat
3-PGA	3-Phosphoglycerinsäure
pGlcT	plastidärer Glukosetransporter
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
P _i	anorganisches Phosphat
r	Resistenzgen
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonukleinas
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse PCR
RV	Restriktionsverdau
s, Sec	Sekunde(n)
<i>Sb</i>	<i>Sorghum bicolor</i> (Mohrenhirse)
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natrium-(„sodium“-)-dodecylphosphat
<i>Ss</i>	<i>Synechocystis sp (PCC6803)</i>
<i>St</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)
STP	Sugar Transport Protein
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i> (Weizen)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TIGR	„The Institute of Genomic Research“
TM	Transmembranhelix
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit (μmol Substrat pro Minute)
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	UDP-Glukose
UhpC	Glukose-6-Phosphat-Sensor des Uhp-Regulationssystems
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
<i>Zm</i>	<i>Zea mays</i> (Mais)

7.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.3 „Accession“-Nummern der verwendeten Gene bzw. Proteine

Name	“Accession“-Nummer	Name	“Accession“-Nummer
<i>At</i> MSBP1	Z50752	<i>Ss</i> GTR	X16472
<i>At</i> MSBP2	AJ532570	<i>Np</i> GTR	ZP_00106753
<i>At</i> MSBP3	AJ532571	<i>At</i> STP4	X66857
<i>Os</i> MSBP1	BAA85398	<i>Ck</i> HUP1	Y07520
<i>Os</i> MSBP2	AAG46115	<i>Ck</i> HUP2	X66855
<i>Sb</i> MSBP1	AAM94321	<i>Ck</i> HUP3	X75440
<i>Hv</i> STP1	CAD58958	<i>Hs</i> GLUT1	XM_046330
<i>Hv</i> STP2	CAD58959	<i>Hs</i> GLUT2	J0_3810
<i>Ha</i> MSBP1	TC2611	<i>Hs</i> GLUT3	XP_016498
<i>Gm</i> MSBP1	TC18511	<i>Hs</i> GLUT11	AJ271290
<i>Gm</i> MSBP2	TC143692	<i>Sc</i> HXT1	M82963
<i>Le</i> MSBP1	EST329751	<i>Sc</i> SNF3	J03246
<i>Ls</i> MSBP1	TC4258	<i>Sc</i> RGT2	Z74186
<i>Mc</i> MSBP1	TC3443	<i>Sc</i> GAL2	1360444
<i>Mt</i> MSBP1	TC60572	<i>Atp</i> GlcT	AF215855
<i>Mt</i> MSBP2	TC62314	<i>At</i> SUC1	X75365
<i>Sb</i> MSBP1	TC38328	<i>At</i> CAB (Lhb1B1)	CAA45789
<i>St</i> MSBP1	TC56316	<i>At</i> NR1 (NIA1)	CAA79494
<i>St</i> MSBP2	TC57243	<i>At</i> PC	M20937
<i>Ta</i> MSBP1	TC69593		
<i>Zm</i> MSBP1	TC158282		

7.4 Hydrophathieanalyse

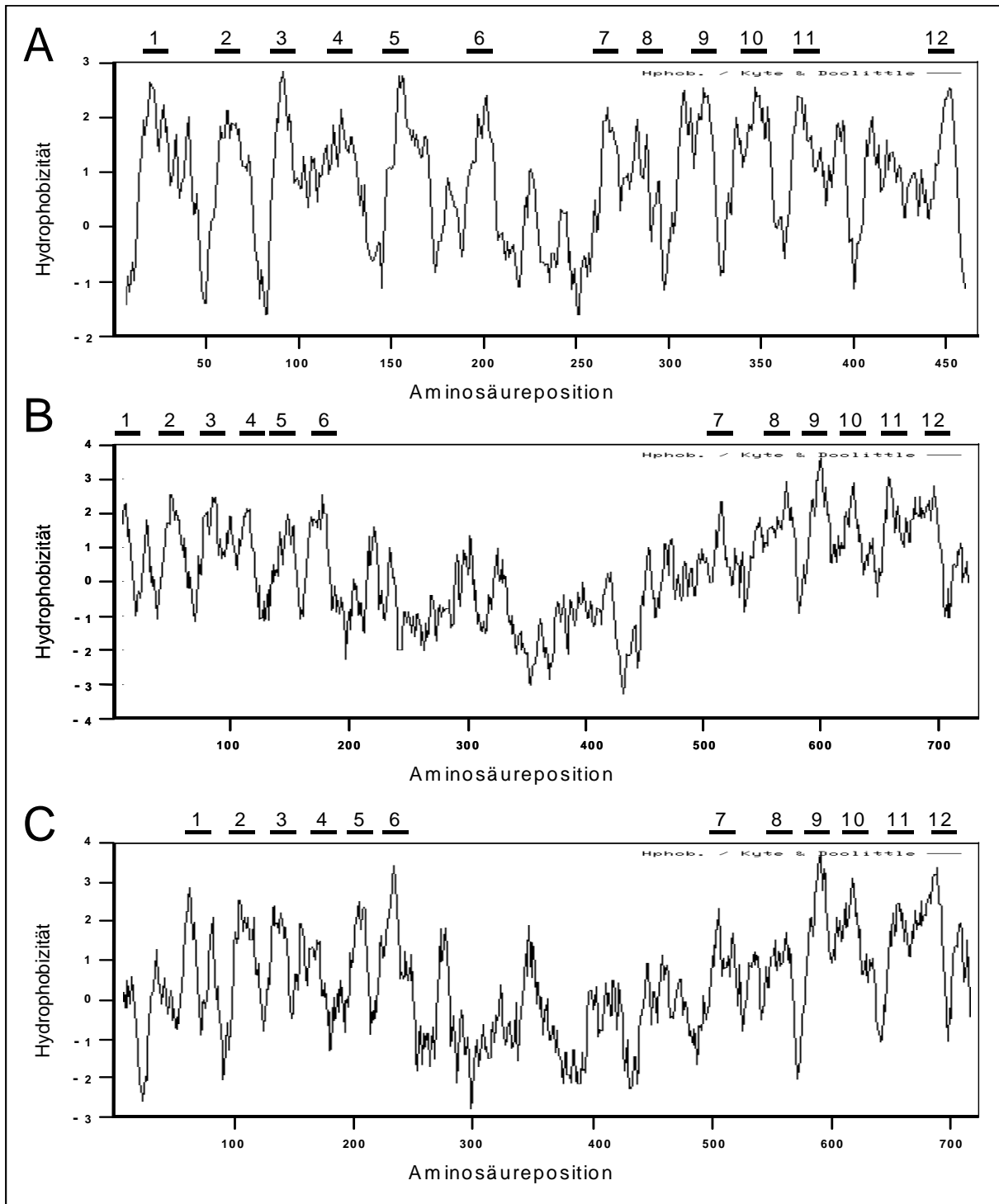


Abbildung 7.1: Hydrophathieanalyse der Aminosäuresequenz (nach KYTE & DOOLITTLE, 1982). Auf der x-Achse sind die Aminosäurepositionen aufgeführt, die y-Achse zeigt die Hydrophobizität der Aminosäuren (hydrophob = positiv). Mögliche Membranhelices sind durch Balken markiert und nummeriert. A: SsGTR, Glukosetransporter aus *Synechocystis 6803*; B: AtMSBP1, Monosaccharid Binding Protein 1 aus *Arabidopsis thaliana*; C: OsMSBP1, Monosaccharid Binding Protein 1 aus *Oryza sativa*.

AtMSBP1	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDYAFGA-OQASAPSKDI-----	: 734
AtMSBP2	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 729
AtMSBP3	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAASFLSDG-----	: 729
NtMSBP1	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 730
OsMSBP1	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 723
OsMSBP2	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 740
SbMSBP1	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 746
HvSTP1	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 743
HvSTP2	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 753
Mt_TC62314v	: -----	: -
Mt_TC60572	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 734
Mc_TC3443	: -----	: -
G_TC18511	: -----	: -
Ha_TC2611	: -----	: -
Gm_TC143692	: -----	: -
Le_EST329751	: -----	: -
Gm_BM143431	: -----	: -
St_TC56316	: -----	: -
Zm_TC15828	: -----	: -
St_TC57243	: -----	: -
Ls_TC4258	: -----	: -
Sb_TC38328	: -----	: -
Ta_TC69593	: GLAGVFGIYAVVCIISWIFVYMKVPETKGMPLVITDFFSVGARQDAIAKKE-----	: 358

Abbildung 7.2: Alignment der MSBPs untereinander. Dargestellt werden alle Klone, deren Sequenzabschnitte des großen hydrophilen Loops beinhalten. MSBP, Monosaccharid Binding Protein; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *G*, *Gossypium*; *Gm*, *Glycine max*; *Ha*, *Helianthus annuus*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp *vulgare*; *La*, *Lactuca sativa*; *Le*, *Lycopersicon esculentum*; *Mc*, *Mesembryanthemum crystallinum*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*; *Sb*, *Shorghum bicolor*; *St*, *Solanum tuberosum*; *Ta*, *Triticum aestivum*; *Zm*, *Zea mays*. Die Nummern geben die Positionen der Aminosäuren an. Zur Verdeutlichung der Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen werden die artifiziiell entstehenden Lücken durch Striche dargestellt. Die rot markierten Aminosäuren geben Beginn und Ende des hydrophilen Loops an. Die aspartatreiche Region wird durch die roten Striche angegeben.

7.6 Stammbaum der MSBPs

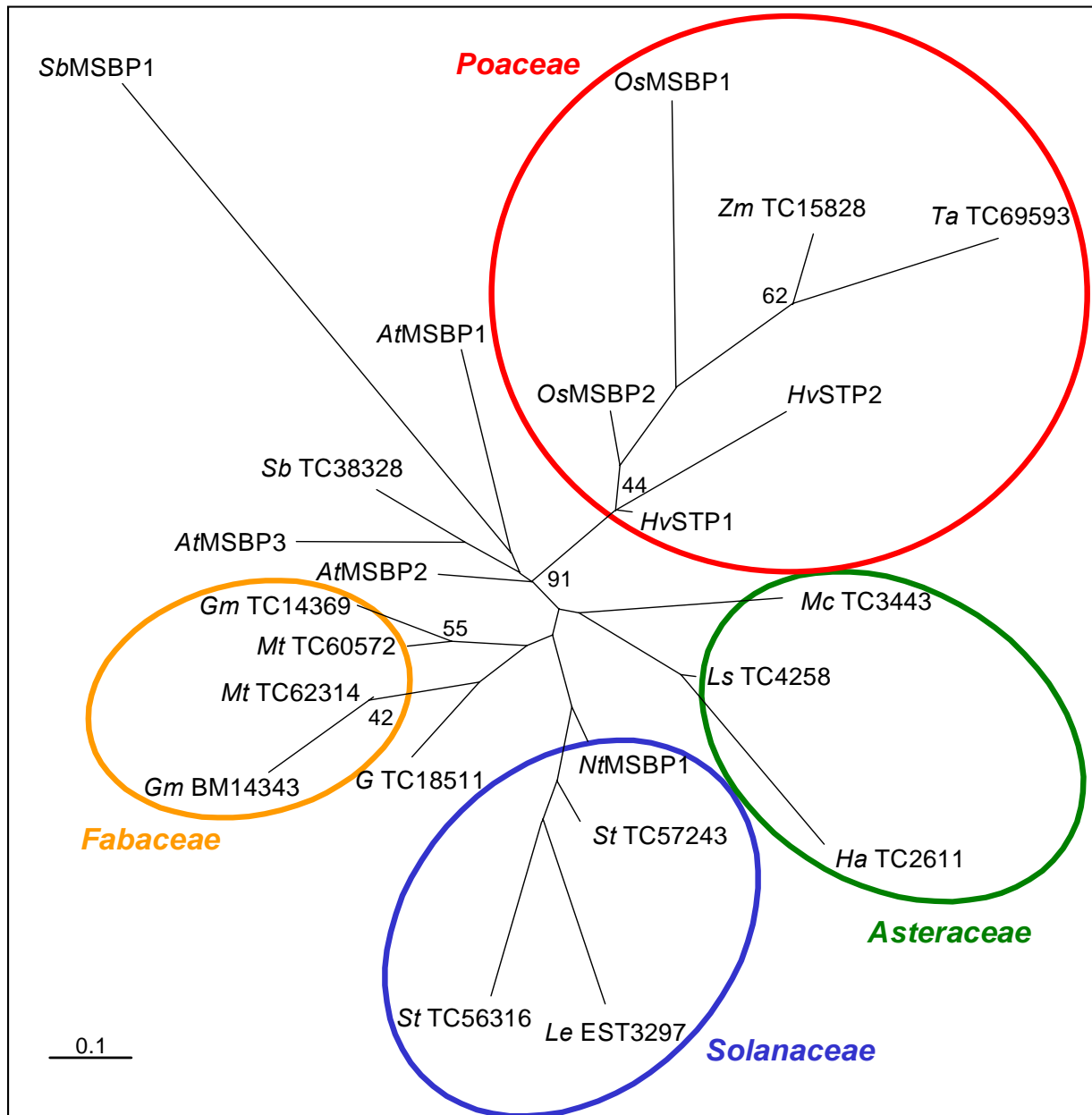


Abbildung 7.3: Wurzeloser Distanzstammbaum der MSBPs. Die Länge der Abstände zwischen den einzelnen Transportern gibt den zeitlichen Abstand der Veränderung der Aminosäuresequenzen an. Die Zahlen an den Abzweigungen geben an, in wie vielen von 100 berechneten Stammbäumen die Abzweigung auch vorhanden ist, Werte unter 40 werden dabei nicht angegeben. Die Gruppen einzelner MSBP-Proteine aus verschiedenen Organismen wurden umkreist. Dargestellt werden alle Klone, deren Sequenzabschnitte den großen hydrophilen Loop beinhalten. Die ersten beiden Buchstaben geben den Organismus an (*At*, *Arabidopsis thaliana*; *G*, *Gossypium*; *Gm*, *Glycine max*; *Ha*, *Helianthus annuus*; *Hv*, *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; *La*, *Lactuca sativa*; *Le*, *Lycopersicon esculentum*; *Mc*, *Mesembryanthemum crystallinum*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Nt*, *Nicotiana tabacum*; *Os*, *Oryza sativa*; *Sb*, *Shorghum bicolor*; *St*, *Solanum tuberosum*; *Ta*, *Triticum aestivum*; *Zm*, *Zea mays*).

7.7 Klonierungen

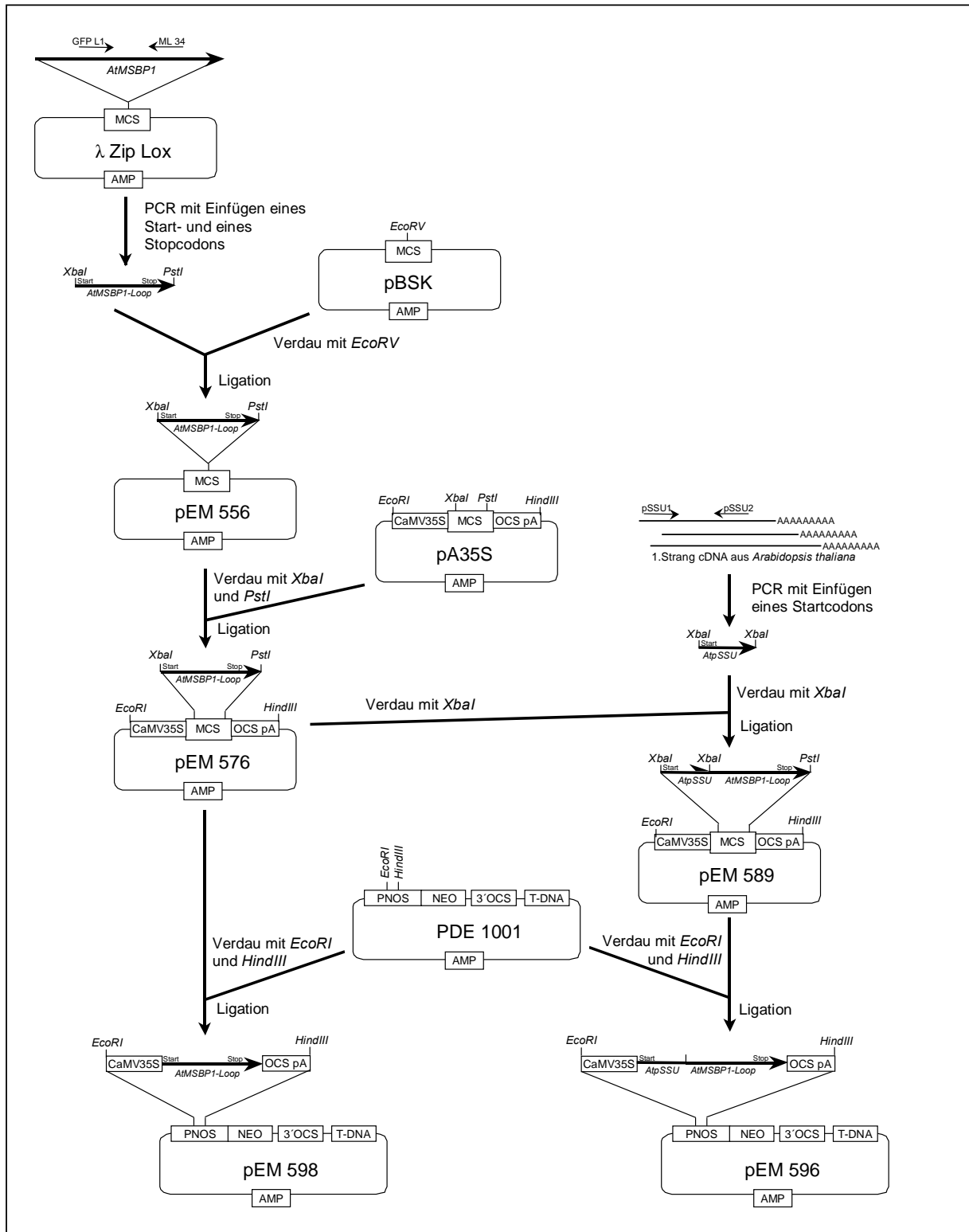


Abbildung 7.4: Klonierung der *AtMSBP1*-Loop-„Sense“-Pflanzen.

AMP, Ampicillinresistenz; MCS, Multiple Cloning Side; CaMV35S, Promotor; OCS pA, 3'OCS, Terminator ; PNOS, NOS-Promotor; *AtMSBP1*, Monosaccharid Binding Protein 1; *AtpSSU*, Leadersequenz der kleinen Untereinheit der RubisCO.

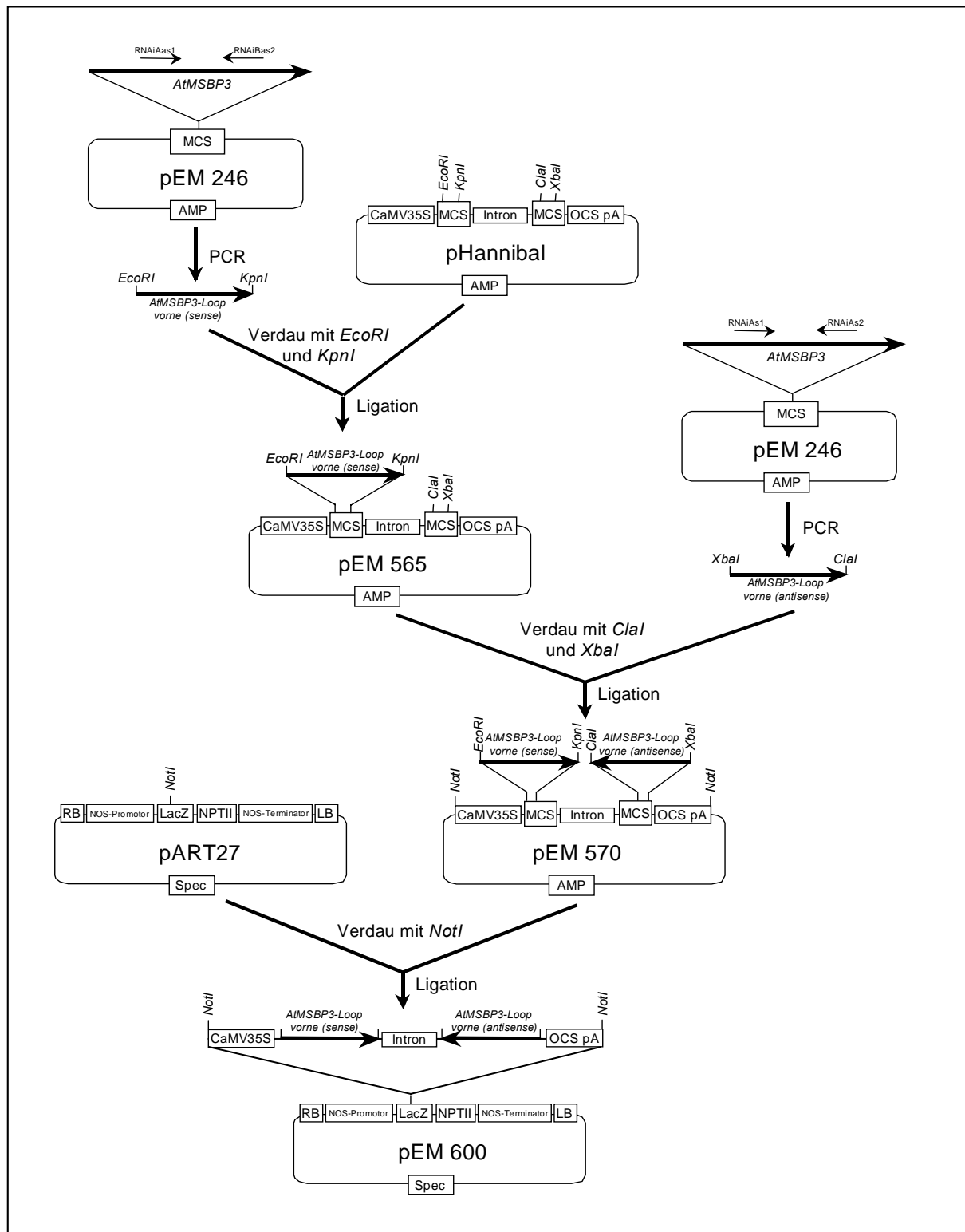


Abbildung 7.5: Klonierung des „RNAi“-Konstruktes für *AtMSBP3*.

AMP, Ampicillinresistenz; Spec, Spectomycinresistenz; bar, Phosphinothricin-Acetyl-Transferase; pAnos, Nopaline-Synthase; pAg7, Polyadenylierungsstelle des Gens; pNOS, NOS-Promotor; uidA, β -Glucuronidase-Gen; MCS, Multiple Cloning Side; CaMV35S, Promotor; OCS pA, 3'OCS, Terminator; PNOS, NOS-Promotor; *AtMSBP3*, Monosaccharid Binding Protein 3.

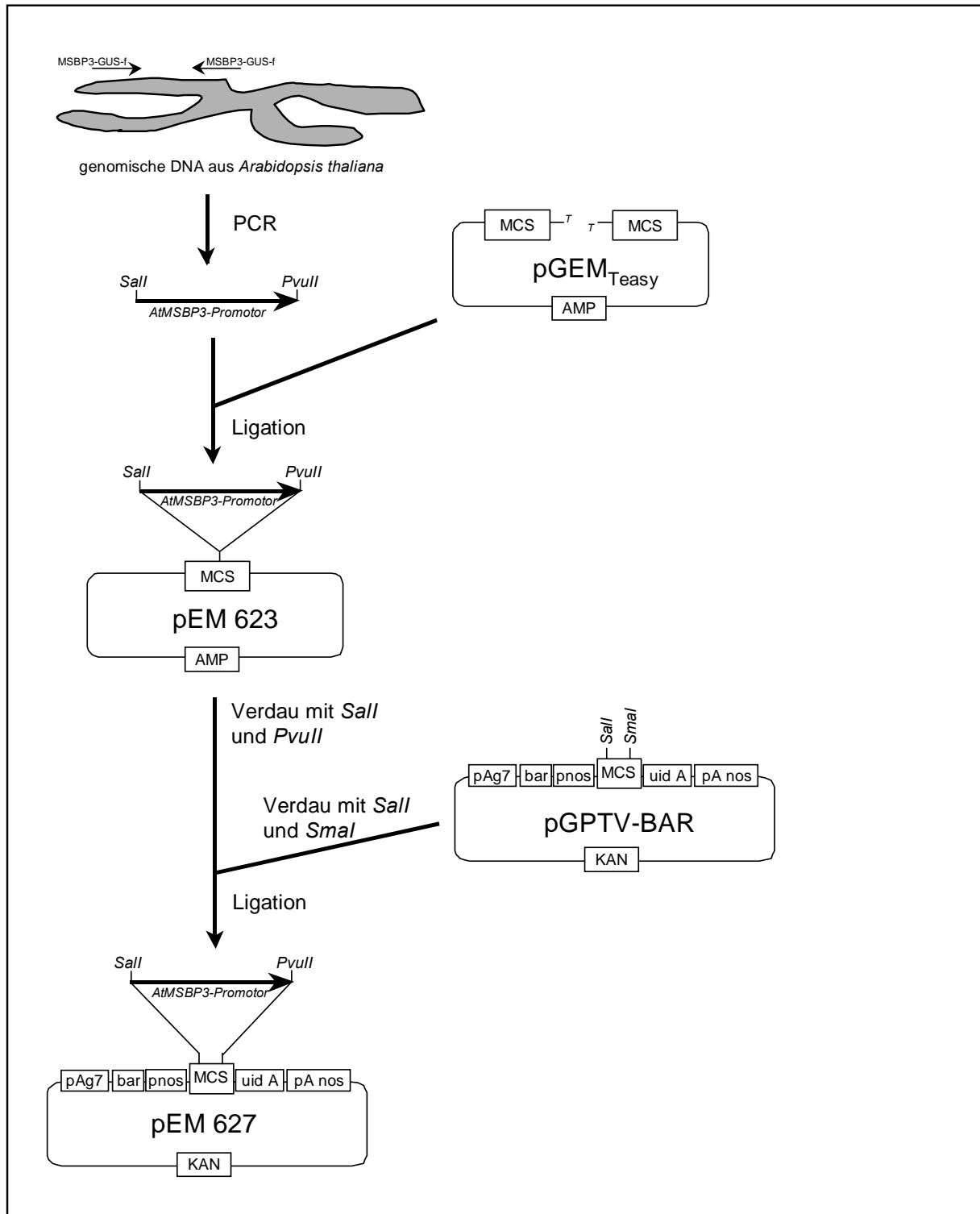


Abbildung 7.6: Klonierung des GUS-Fusionskonstruktes mit dem Promotor des *AtMSBP3*. AMP, Ampicillinresistenz; KAN, Kanamycinresistenz; bar, Phosphinothricin-Acetyl-Transferase; pAnos, Nopaline-Synthase; pAg7, Polyadenylierungsstelle des Gens; pNOS, NOS-Promotor; uidA, β -Glucuronidase-Gen; *AtMSBP3*, Monosaccharid Binding Protein 3.

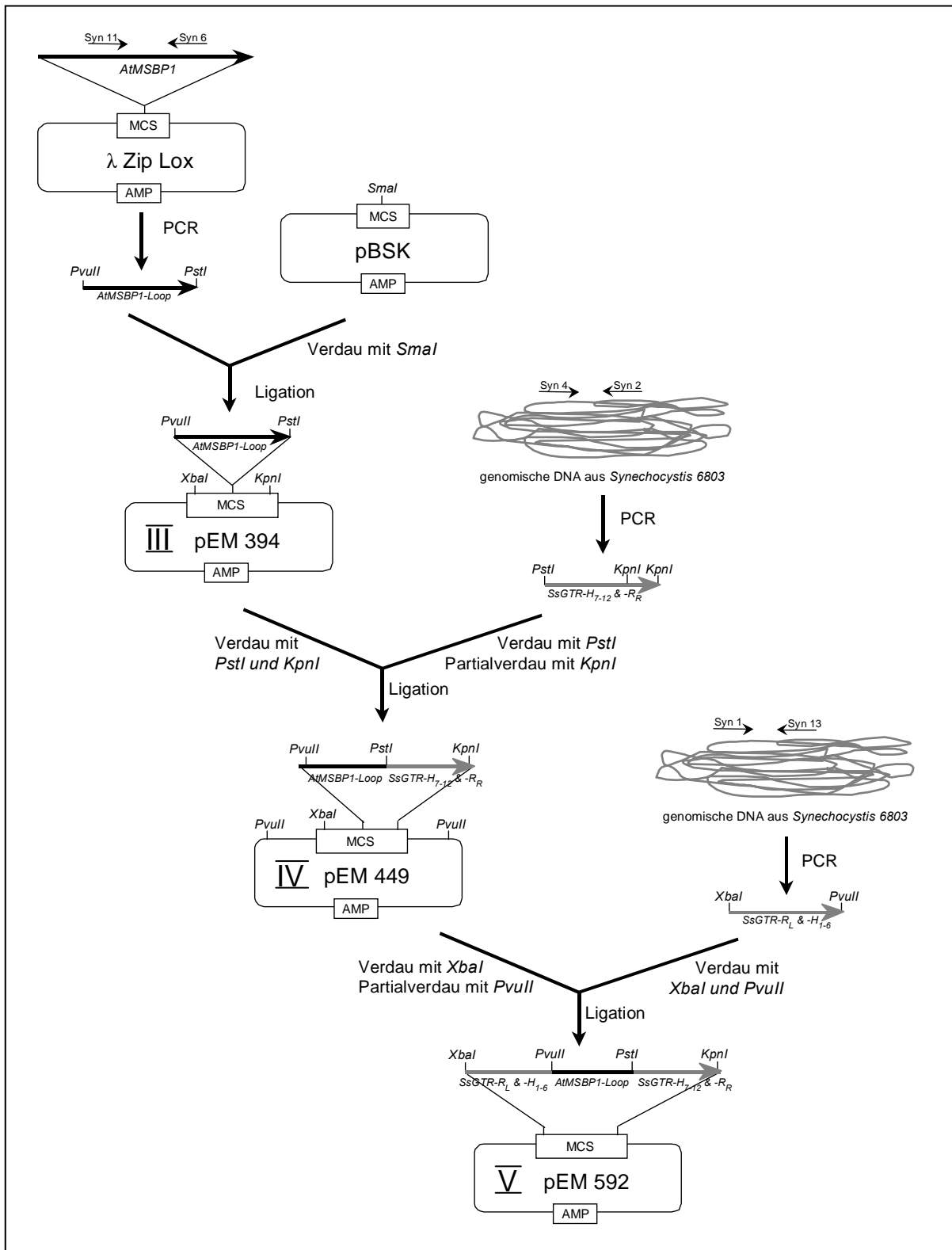


Abbildung 7.7.1: Klonierung des SsGTR-AtMSBP1-Fusionskonstruktes V (pEM 592). AMP, Ampicillinresistenz; MCS, Multiple Cloning Side; *SsGTR*, Glukose/H⁺-Symporter; *AtMSBP1*, Monosaccharid Binding Protein 1; R_L, Promotorbereich *SsGTR*; H₁₋₆, Helix 1-6; H₇₋₁₂, Helix, 7-12, R_R, Terminatorbereich *SsGTR*.

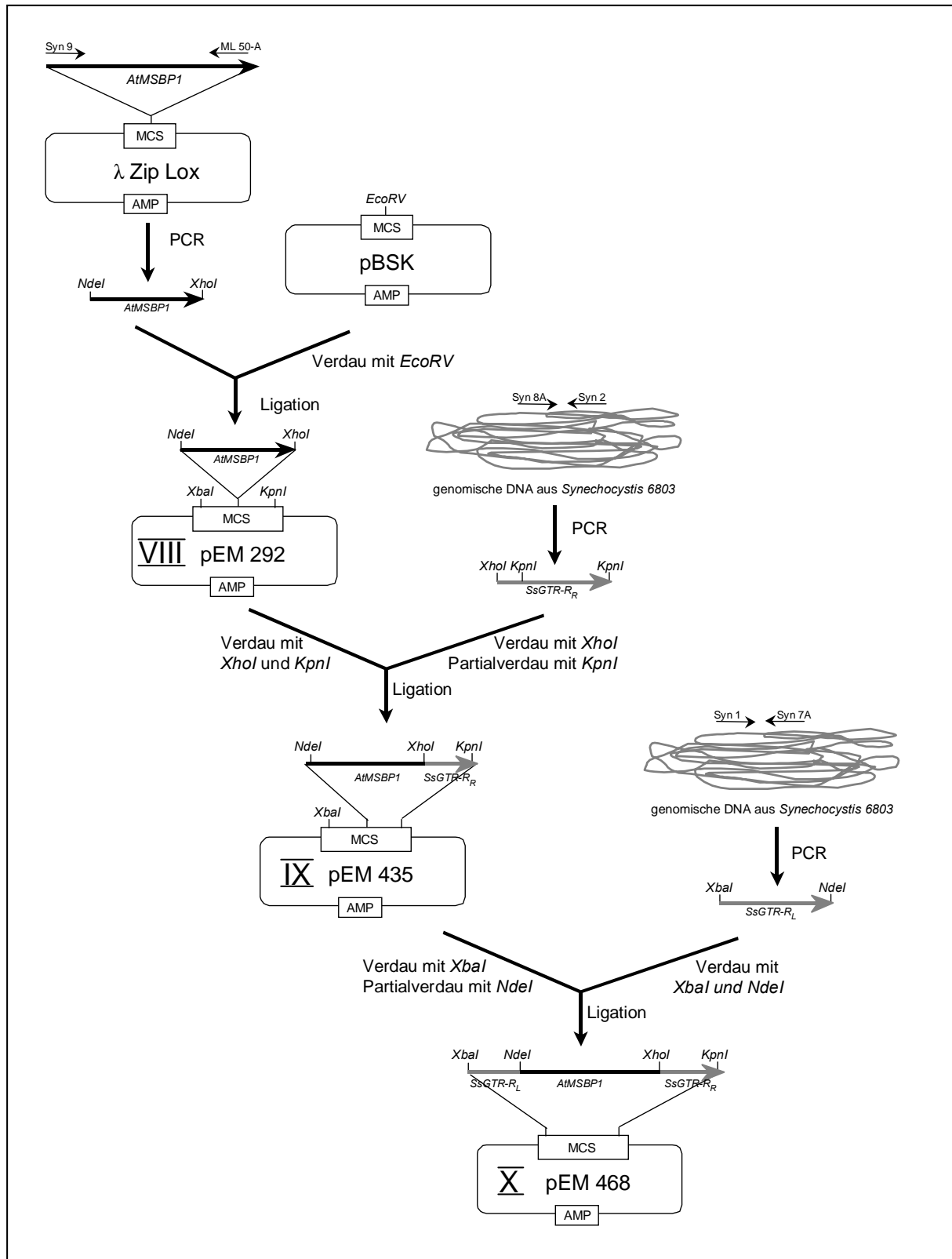


Abbildung 7.7.2: Klonierung des SsGTR-AtMSBP1-Fusionskonstruktes X (pEM 468). AMP, Ampicillinresistenz; MCS, Multiple Cloning Side; SsGTR, Glukose/H⁺-Symporter; *AtMSBP1*, Monosaccharid Binding Protein 1; R_L, Promotorbereich SsGTR; H₁₋₆, Helix 1-6; H₇₋₁₂, Helix, 7-12, R_R, Terminatorbereich SsGTR. Die Ampicillinresistenz wurde nachträglich durch eine Kanamycinresistenz ersetzt (pEM 587).

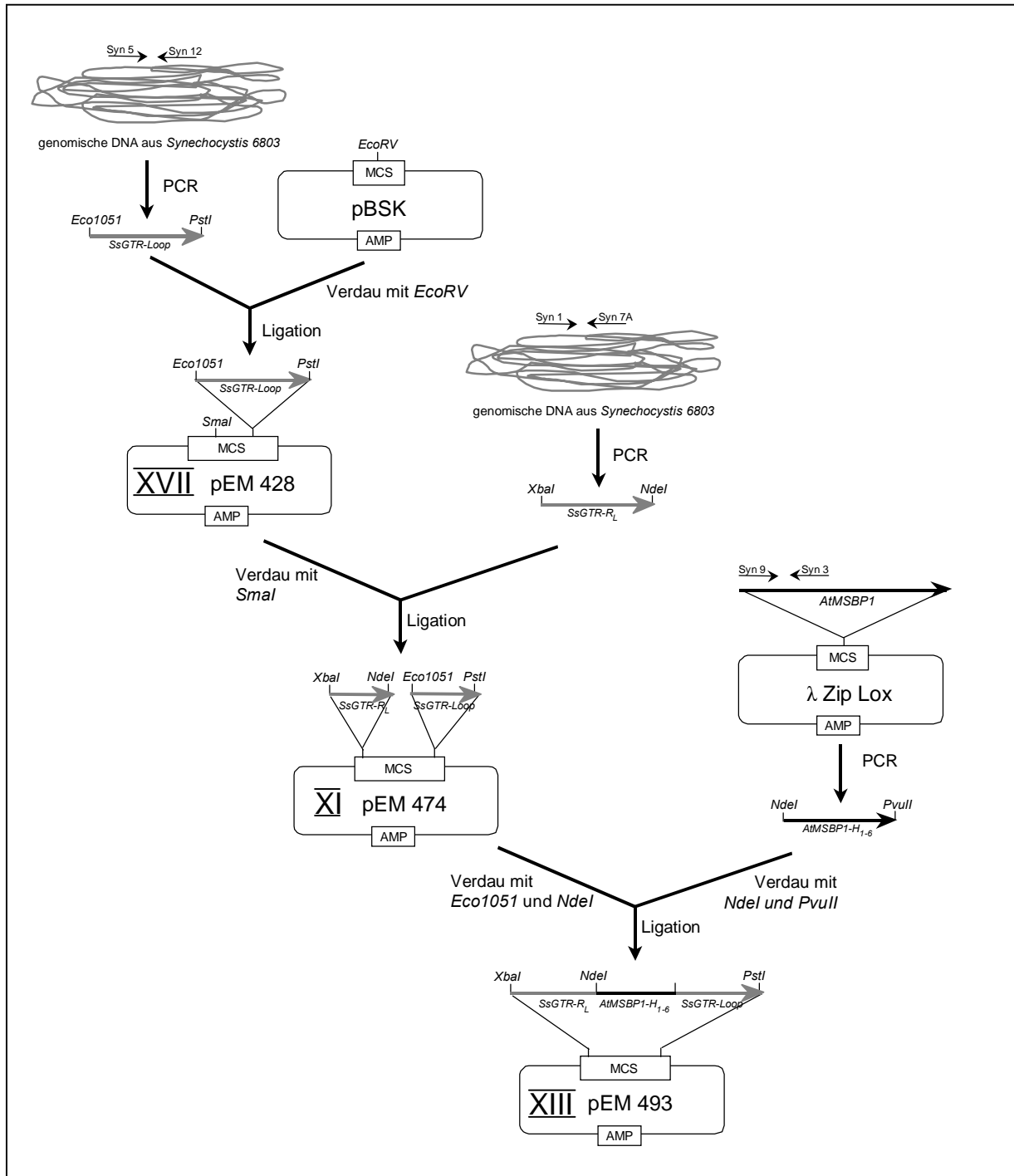


Abbildung 7.7.3: Klonierung des SsGTR-AtMSBP1-Fusionskonstruktes XVI (pEM 499), Teil 1. AMP, Ampicillinresistenz; MCS, Multiple Cloning Side; SsGTR, Glukose/H⁺-Symporter; *AtMSBP1*, Monosaccharid Binding Protein 1; R_L, Promotorbereich SsGTR; H₁₋₆, Helix 1-6; H₇₋₁₂, Helix, 7-12, R_R, Terminatorbereich SsGTR.

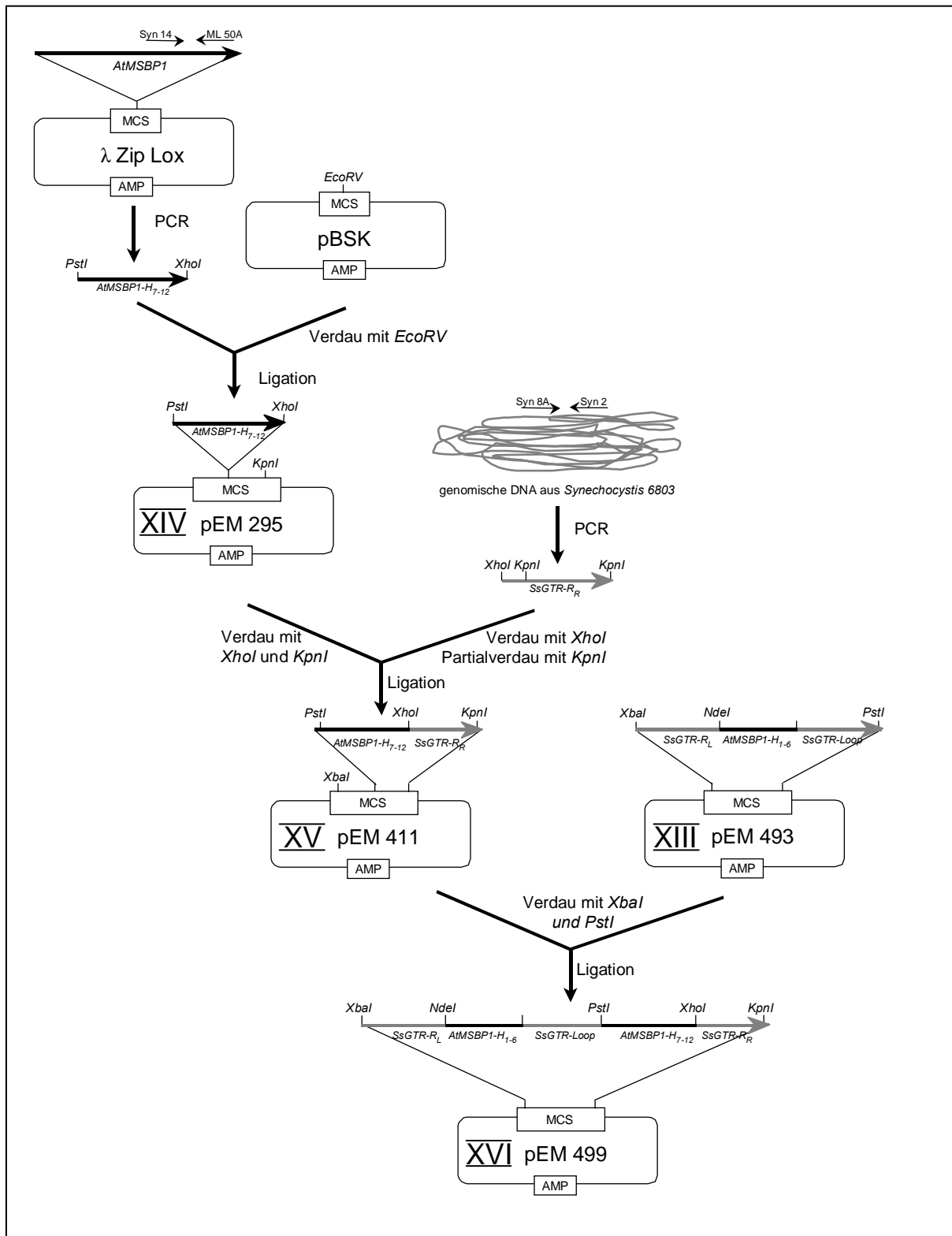


Abbildung 7.7.4: Klonierung des SsGTR-AtMSBP1-Fusionskonstruktes XVI (pEM 499), Teil 2. AMP, Ampicillinresistenz; MCS, Multiple Cloning Side; SsGTR, Glukose/H⁺-Symporter; *AtMSBP1*, Monosaccharid Binding Protein 1; R_L, Promotorbereich SsGTR; H₁₋₆, Helix 1-6; H₇₋₁₂, Helix, 7-12, R_R, Terminatorbereich SsGTR. Die Ampicillinresistenz wurde nachträglich durch eine Kanamycinresistenz ersetzt (pEM 580). Die Umklonierung in den Vektor pUC18 erfolgte über *XbaI/KpnI* (pEM 612).

Lebenslauf

Name: Claudia Stamme

Geburtsort: Celle

Geburtsdatum: 02.05.1974

Eltern: Elke und Hubert Stamme

Familienstand: ledig

Schulbesuche: 1980-1984 Grundschule Eschede
1984-1986 Orientierungsstufe Eschede
1986-1993 Hölty Gymnasium Celle
10. Mai 1993 Abitur

Studium: Oktober 1993-April 1999, Studium der Biologie an der Universität Osnabrück

Diplomarbeit: Mai 1998 - April 1998, Titel der Arbeit: „Identifizierung von zum ATP/ADP-Transporter homologen Membranproteinen“

Diplom: 20. April 1999

Promotion: Mai 1999 – März 2000 , Wissenschaftliche Angestellte der Universität Osnabrück, Abteilung Pflanzenphysiologie
April 2000 – März 2003 , Wissenschaftliche Angestellte der Universität Kaiserslautern, Abteilung Pflanzenphysiologie
Mai 1999 – heute, Bearbeitung des Themas: „Charakterisierung eines neuartigen Zuckertransporters aus *Arabidopsis thaliana*“

Publikationsliste

Geigenberger, P., Stamme, C., Tjaden, J., Schulze, A., Quick, W.P., Betsche, T., Kersting, H.J. & Neuhaus, H.E. (2001). Tuber physiology and properties of starch from tubers of transgenic potato plants with altered plastidic adenylate transporter activity. *Plant Physiol.* 125, 1667-1678.

Linka, N., Hurka, H., Lang, B.F., Burger, G., Winkler, H.H., Stamme, C., Urbany, C., Seil, I., Kusch, J. & Neuhaus, H.E. (2003). Phylogenetic relationships of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes. *Gene* 13, 27-35.

Stamme, C., Tjaden, J., Trentmann, O., Emmerlich, V. & Neuhaus, H.E. (2003). A plant monosaccharide transporter is involved in a novel form of eukaryotic sugar sensing. *Eingereicht.*

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus für die Betreuung und Unterstützung während meiner Dissertation bedanken.

Weiterhin möchte ich mich für Rat und Tat bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Baus 22 bedanken.

Besonderer Dank gilt den Kooperationspartnern:

Prof. Norbert Sauer (Universität Erlangen)

Prof. Jürgen Soll (Universität München)

Prof. Uwe Sonnewald (Gatersleben)

Prof. Georg Schmetterer (Wien)

Dr. Andreas Weber (Michigan State University)

Torrey Mesa Research Institute (TMRI, San Diego, CA, USA)

Ein großes DANKE an meine Freunde und Bekannte innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe für die stete Unterstützung.

Ganz viel Danke an meiner Familie.

Nicht zu vergessen: Eric. Danke für Alles ;-)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, 24. Juli 2003

Claudia Stamme