

Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften



**Funktionelle Charakterisierung des Retromer-
vermittelten Proteintransports
in Pflanzen**

Silke Niemes

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Silke Niemes
aus Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung:

**Funktionelle Charakterisierung des Retromer-
vermittelten Proteintransports
in Pflanzen**

Gutachter: Prof. Dr. David G. Robinson
Prof. Dr. Thomas Rausch

Teile dieser Arbeit wurden eingereicht bei:

Niemes, S., Langhans, M., Viotti, C., Scheuring, D., Yan, M.S.W., Jiang, L., Hillmer, S., Robinson, D.G., and Pimpl, P. (2009). Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant J.* In press. (DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04034.x)

Niemes, S., Labs, M., Scheuring, D., Krueger, F., Langhans, M., Jesenofsky, B., Robinson, D.G., and Pimpl, P. (2009). Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. *Plant J.* provisionally accepted.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ein besonderer Dank gilt Professor Dr. David G. Robinson für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, sowie die fortwährende Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit eines mehrwöchigen Forschungsaufenthaltes in Hongkong.

Herrn Professor Dr. Thomas Rausch danke ich für die Übernahme der Aufgaben des Zweitgutachters und die Anregungen zu dieser Arbeit.

Dr. Peter Pimpl möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung im Labor und die vielen anregenden Diskussionen danken. Auch für die vielen Freiräume zum eigenständigen wissenschaftlichen Arbeiten danke ich ihm.

I would like to thank Dr. Lorenzo Frigerio for the possibility to stay at his laboratory in Warwick and to learn how to do pulse-chase experiments.

I wish to thank Professor Dr. Liwen Jiang for the great time in Hong Kong. I also give my thanks to Melody and Keith for helping me with the experiments there.

Für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre möchten ich allen danken, die mit mir zusammen im Labor gearbeitet haben: Dr. Markus Langhans, David Scheuring, Julia Bubeck, Goretti Virgili Lopez, Andreas Loos, Godwin Dogbevia, Fabian Künzl, Erika Szakács, Lothar Blüm, Marco Becker, Michael Beez, Mathias Labs, Mats Blohm, Falco Krüger und insbesondere Barbara Jesenofsky und Steffi Gold, die das Labor in Ordnung und zusammen halten. Auch der Arbeitsgruppe Schumacher mit Professor Dr. Karin Schumacher, Julia Bubeck, Esther Görlich, Melanie Krebs, Christoph Neubert, Sandra Zimmermann, Anna Nestorova und Beate Schöfer möchte ich für die Anregungen während des gemeinsamen Arbeitsgruppenseminars und die gute Zusammenarbeit im Labor danken.

Ganz besonders möchte ich Dr. Markus Langhans für die Einführung in die Welt der konfokalen Mikroskopie danken. Dr. habil. Giselbert Hinz und Dr. Stefan Hillmer möchte ich für viele wertvolle Diskussionen danken. Der Elektronenmikroskopie-Fraktion Dr. Stefan Hillmer und v. a. Dr. Corrado Viotti danke ich für die vielen Lokalisierungen und den kurzen Einblick in die Elektronenmikroskopie.

Christina Larenz und Ines Stein danke ich für die gute und schnelle Abwicklung der vielen organisatorischen Angelegenheiten.

Vielen Dank auch an meine Eltern, meinen Opa, meine Schwester, den Rest der Familie und meine Freunde. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung auf dem Weg bis zur Promotion danken. Auch während der Promotion haben sie mir immer zur Seite gestanden, sich über gute Resultate zusammen mit mir gefreut und bei Enttäuschungen mit gelitten. Vor allem in der Schlussphase beim Verfassen der Arbeit war ich sehr glücklich über ihre Unterstützung. Auch meinem Großvater und meiner Schwester Kerstin möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und fürs Zuhören danken. Und zu guter Letzt danke ich meinem Verlobten Michael, der wohl am meisten unter meinen Launen in stressigen Phasen gelitten hat, sich aber dafür umso mehr über gelungene Versuche und publizierte Veröffentlichungen mit mir freuen konnte. Während der ganzen Promotion stand er immer an meiner Seite und hat mich unterstützt. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Das Endomembransystem.....	3
1.1.1	Das Endoplasmatische Retikulum	4
1.1.2	Der Golgi-Apparat.....	5
1.1.3	Die endosomalen Kompartimente.....	6
1.1.4	Die Vakuole	7
1.2	intrazellulärer Transport.....	8
1.2.1	Der sekretorische Transportweg.....	8
1.3	Der vakuoläre Sortierungsrezeptor BP80.....	12
1.4	Der Retromer-Komplex.....	14
1.5	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte, Materialien, Chemikalien, Enzyme und Kits	19
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	19
2.2.1	Bakterienstämme.....	19
2.2.2	Verwendete Plasmide.....	19
2.3	Desoxyoligonukleotide.....	20
2.4	Antikörper	21
2.4.1	Primärantikörper	21
2.4.2	Herstellung der Primärantikörper	22
2.4.3	Sekundärantikörper	22
2.5	Computeranalyse von DNA- und Proteinsequenzen	23
2.6	Pflanzenmaterial.....	23
2.6.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.6.2	Kultivierung von Tabakpflanzen im Gewächshaus.....	24
2.6.3	Kultivierung von sterilen Tabakpflanzen <i>in vitro</i>	24
2.6.4	Zellkultur.....	25
2.6.4.1	<i>Arabidopsis</i> -Suspensionszellkultur	25

2.6.4.2	BY-2 Suspensionszellkultur	26
2.7	Molekularbiologische Methoden	26
2.7.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.7.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.7.4	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	28
2.7.5	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	29
2.7.6	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.7.7	Sequenzierung von DNA	29
2.7.8	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen.....	30
2.7.9	Herstellung transformationskompetenter Bakterienstämme.....	30
2.7.10	Transformation transformationskompetenter Bakterienstämme_von <i>E. coli</i>	31
2.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.8.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	31
2.8.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	32
2.8.3	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	32
2.9	Plasmidkonstruktionen.....	33
2.9.1	Klonierung der Retromeruntereinheiten	33
2.9.2	Herstellung der SNX-Mutanten	36
2.9.3	Herstellung eines RNAi-Konstrukts.....	36
2.9.4	Klonierung der BP80-CNX-Konstrukte.....	37
2.9.5	Klonierung des BP80FL-Cerulean-Konstrukts	37
2.10	Zellbiologische Methoden	37
2.10.1	Herstellung von Protoplasten aus Tabakblättern.....	37
2.10.2	Herstellung von Protoplasten aus Suspensionskulturzellen	38
2.10.3	Transformation von Protoplasten durch Elektroporation	39
2.10.4	Ernten der Protoplasten und des Mediums	39
2.10.5	Messung der enzymatischen Aktivität.....	40
2.11	Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	41
2.11.1	Ammoniumsulfat-Fällung von Proteinen	41
2.11.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	41

2.11.3	Westernblot-Analyse (Immunoblot).....	43
2.12	Immunmarkierung.....	44
2.12.1	Immunmarkierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.12.2	Immunmarkierung von BY2-Suspensionskulturen	45
2.12.3	Immunmarkierung von BY2-Suspensionskulturen (abgewandeltes Protokoll)	46
2.13	Konfokale Mikroskopie.....	47
2.13.1	Probenvorbereitung	47
2.13.2	Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).....	47
3	Ergebnisse	50
3.1	Identifikation und strukturelle Charakterisierung der kleinen Retromeruntereinheit.....	50
3.2	Analyse der Antikörper gegen SNX1, SNX2a und VPS35	53
3.3	Lokalisierungsstudien pflanzlicher Sorting Nexine	55
3.3.1	Lokalisierung der Sorting Nexine in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	55
3.3.2	Lokalisierung der Sorting Nexine in Tabak-Protoplasten.....	56
3.3.3	Lokalisierung der Sorting Nexine in BY2-Zellen	57
3.3.4	Lokalisierung von endogenem SNX2a in <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
3.4	Lokalisierungsstudien der großen Retromeruntereinheit.....	61
3.5	Funktionelle Charakterisierung der Sorting Nexine	63
3.5.1	Einfluss der SNX-Mutanten auf den vakuolären Sortierungsrezeptor BP80	65
3.5.2	Einfluss der SNX-Mutanten auf das prävakuoläre Kompartiment.....	69
3.5.3	Einfluss der SNX-Mutanten auf den vakuolären Transportweg.....	71
3.5.4	Einfluss der Koexpression zweier SNX-Mutanten auf den vakuolären Sortierungsrezeptor BP80	75
3.5.5	Einfluss der Koexpression beider SNX-Mutanten auf den vakuolären Transportweg	82
3.6	Rezeptor-Liganden-Interaktion	85
3.6.1	Lokalisierung der BP80-Konstrukte.....	87
3.6.2	Funktionelle Charakterisierung der BP80-Konstrukte	88
3.6.3	BP80 bindet Liganden bereits im ER	91

3.7	Wildtyp BP80 hat keinen inhibierenden Effekt auf den COPII-vermittelten ER-Export.....	95
4	Diskussion	97
4.1	Lokalisierung des Retromer-Komplexes	97
4.2	Das Retromer-vermittelte Rezyklieren des VSRs findet am TGN statt	99
4.3	Die SNX-Mutanten verhindern das Anschwellen der PVCs durch Wortmannin	101
4.4	Der Transport vom TGN zur Vakuole ist VSR-unabhängig	102
4.5	Die Inhibierung der Retromer-Funktion beeinflusst den ER-Export des Rezeptors und dessen Liganden	103
4.6	Die kleine Retromer-Untereinheit in Pflanzen besteht aus einem Heterodimer	104
4.7	Die Rezeptor-Liganden-Interaktion findet bereits im ER statt.....	105
4.8	Das Retromer rezykliert den VSR zurück zum ER	107
5	Literaturverzeichnis.....	111
6	Anhang	122
6.1	Geräte	122
6.2	Verbrauchsmaterialien.....	123
6.3	Chemikalien.....	123
6.4	Enzyme und Kits.....	123
7	Symbole und Abkürzungen.....	124

Zusammenfassung

Das pflanzliche Retromer besteht aus einem großen Subkomplex aus den vakuolären Proteinsortierungsproteinen VPS26, VPS29 und VPS35 und einem kleinen Subkomplex, der sich vermutlich aus den Sorting Nexinen (SNX) SNX1, SNX2a und SNX2b zusammensetzt. Rezeptor-vermittelte Sortierungsprozesse im sekretorischen Transportweg eukaryontischer Zellen beruhen auf dem Mechanismus des Rezeptor-Rezyklierens, nachdem der Transport beendet wurde. In Pflanzen ist der vakuoläre Sortierungsrezeptor (VSR) BP80 an dem Transport von Molekülen zur lytischen Vakuole beteiligt. BP80 bindet vermutlich seine Liganden in dem Donor-Kompartiment *trans*-Golgi Netzwerk. Dieser Rezeptor-Liganden-Komplex wird danach mit Hilfe von Clathrin-Vesikeln zum prävakuolären Kompartiment (PVC) transportiert. Während die Liganden freigesetzt und zur lytischen Vakuole transportiert werden, wird der Rezeptor Retromer-vermittelt zurück zum TGN transportiert, um erneut Liganden transportieren zu können.

Zur Analyse des Retromer-vermittelten Rezyklierens der VSRs wurden die Retromer-Komponenten SNX1, SNX2a, VPS29 und VPS35 zunächst lokalisiert. Diese Retromer-Komponenten befanden sich ausschließlich am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN). Die Inhibierung der Retromer-Funktion durch die transiente Expression von SNX1- oder SNX2a-Mutanten führte zu einer Akkumulation des VSR BP80 im TGN. Quantitative Proteintransportuntersuchungen sowie konfokal-mikroskopische Analysen mit fluoreszierenden, vakuolären Markerproteinen zeigten, dass die Liganden unter diesen Bedingungen weiterhin die Vakuole erreichen konnten. Anhand dieser Ergebnisse erscheint das TGN als der Ort des Retromer-vermittelten Rezyklierens des VSRs. Außerdem ist der Transport zur lytischen Vakuole ab dem TGN Rezeptor-unabhängig und geschieht möglicherweise durch Reifung. Die komplette Hemmung der Retromer-Funktion entweder durch RNAi-„knock-down“ der SNXs oder durch Koexpression der SNX1- und SNX2a-Mutanten inhibierte spezifisch den ER-Export der VSRs und löslicher, vakuolärer Frachtmoleküle. Der COPII-vermittelte Transportweg wurde dabei nicht beeinflusst. Durch die Expression ER-verankerter BP80-Konstrukte konnte untersucht werden, ob die VSRs dazu in der Lage sind, ihre Liganden bereits im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zu binden. Diese Experimente führten zu einer Akkumulierung löslicher, vakuolärer Frachtmoleküle im ER. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Rezeptor-Liganden-Interaktion bereits im ER stattfindet und nicht erst im TGN. Darüber hinaus rezykliert Retromer die VSRs vermutlich vom TGN zurück zum ER.

Summary

Plant retromer consists of the large sub complex with the vacuolar protein sorting proteins VPS26, VPS29 and VPS35 and a small sub complex probably formed by Sorting Nexins (SNX) 1, SNX2a and SNX2b. Receptor-mediated sorting processes in the secretory pathway of eukaryotic cells rely on mechanisms to recycle the receptors after completion of transport. In plants, the vacuolar sorting receptor (VSR) BP80 is involved in trafficking of molecules to the lytic vacuole. BP80 is supposed to bind its ligands in the donor compartment (*trans*-Golgi network). The receptor-ligand complex is then transported to the prevacuolar compartment (PVC) in a clathrin-dependent manner. Whilst the ligands are released and transported to the lytic vacuole, the receptor is recycled back to the TGN in a retromer-dependent fashion for a further round of ligand transport.

To analyse retromer-mediated VSR recycling, first the retromer components SNX1, SNX2a, VPS29 and VPS35 were firstly localised. All retromer components were localised to the *trans*-Golgi network (TGN). Inhibition of retromer function by transient expression of SNX1 or SNX2a mutants leads to an accumulation of the VSR BP80 at the TGN. Quantitative protein transport studies as well as live cell imaging using fluorescent vacuolar cargo molecules revealed that the arrival of these VSR ligands at the vacuole is not affected under these conditions. Based on these findings, the TGN seems to be the point of retromer-mediated recycling of VSRs. Therefore, transport towards the lytic vacuole downstream of the TGN is receptor-independent and occurs via maturation. Complete inhibition of retromer function either by RNAi knock-down of SNXs or coexpression of mutants of SNX1/2a specifically inhibits the ER export of VSRs, as well as soluble vacuolar cargo molecules, but does not influence cargo molecules of the COPII-mediated transport route. The expression of ER-anchored VSR derivatives revealed, whether VSRs are capable of binding their ligands already in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), since these experiments resulted in an ER accumulation of soluble vacuolar cargo molecules. This demonstrates that the ER, rather than the TGN, is the location of the initial VSR-ligand interaction. Furthermore, retromer presumably recycles VSRs from the TGN back to the ER.

1 Einleitung

Alle Lebewesen bestehen aus Zellen, die durch Membranen von der Umgebung bzw. benachbarter Zellen im Zellverband abgegrenzt sind. Während Prokaryonten im Wesentlichen ohne Organellen und auch ohne Zellkern auskommen, besitzen Eukaryonten einen Zellkern und eine Vielzahl an Kompartimenten, die von Membranen umgeben sind. Die verschiedenen Kompartimente stellen unterschiedliche, funktionell getrennte Reaktionsräume dar, die einen spezifischen Satz an Enzymen und anderen Molekülen enthalten. Die Kompartimente stehen durch komplexe Transportvorgänge in Verbindung. Zudem findet auch ein Austausch mit der die Zelle umgebenden Umwelt durch Sekretion und Endozytose statt.

1.1 Das Endomembransystem

Alle eukaryontischen Zellen besitzen einen Zellkern, ein Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien, Golgi-Apparate, Ribosomen und Lysosomen. Zu den Besonderheiten des Transportsystems höherer Pflanzen zählen u. a. die Sekretion von Polysacchariden der Zellwand, die Bildung der Zellplatte während der Zellteilung und das Vorkommen spezieller Kompartimente wie einer der Plasmamembran aufgelagerte Zellwand, Plastiden und funktionell unterschiedliche Vakuolen (Jiang et al., 2001). Untereinander sind pflanzliche Zellen über Plasmodesmen, spezialisierte Kanäle in den Zellwänden, durch das Endomembransystem verbunden. Zur Aufrechterhaltung der komplexen Funktionen innerhalb der eukaryontischen Zelle muss ein kontinuierlicher und gezielter Transport von Proteinen, Lipiden, Hormonen und Stoffwechselmetaboliten zwischen den einzelnen Kompartimenten stattfinden.

Das Endomembransystem ist an zwei bedeutenden Transportwegen maßgeblich beteiligt - der Endozytose und dem sogenannten sekretorischen Transportweg. Die Endozytose bezeichnet den Transport extrazellulären Materials über die Plasmamembran in das Innere der Zelle durch Einstülpungen und Abschnüren von Teilen der Zellmembran unter Entstehung von Vesikeln. Der sekretorische Transportweg ist über das ER und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran bzw. über das prävakuoläre Kompartiment (PVC) zur Vakuole gerichtet. Der Transport zwischen den einzelnen Kompartimenten des Endomembransystems findet mittels kleiner Transportvesikel statt, die von der Membran des Donor-Kompartiments abknospen, um dann mit der Membran des Zielkompartiments zu fusionieren. Damit die strukturelle

und funktionelle Integrität der einzelnen Kompartimente erhalten bleibt, stehen sie in einem dynamischen Gleichgewicht von Stoffaufnahme und Stoffabgabe. Es besteht demnach ein Gleichgewicht zwischen vorwärts (anterograd) und rückwärts (retrograd) gerichteten Transportvorgängen.

1.1.1 Das Endoplasmatische Retikulum

Bei dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) handelt es sich um komplexes Membransystem, das sich von der Kernhülle bis in die kortikalen Regionen der Zelle erstreckt und in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt werden kann: Kernhülle, raues ER, glattes ER und transitorisches ER (Staehein, 1997). Durch die Plasmodesmata, eine Besonderheit der Pflanzenzelle, entsteht eine direkte Verbindung des Endomembransystems benachbarter Zellen und ermöglicht somit den Austausch von Proteinen im Zellverband (Haywood et al., 2002; Lucas and Wolf, 1993). Auch virale RNA kann sich auf diesem Weg bewegen (Hofmann et al., 2007). Die den Zellkern umgebende Kernhülle trennt den Zellkern und das Zytoplasma in verschiedene Reaktionsräume. Das raue Endoplasmatische Retikulum ist stark mit Ribosomen besetzt und ist der Ort der Synthese der Proteine, deren Translokation direkt in das Lumen des ER erfolgt. Als glattes ER bezeichnet man ribosomenfreie, verzweigte Bereiche des ER, an denen die Lipidsynthese stattfindet (Staehein, 1997). Der Bildungsort von Transportvesikeln, die Proteine und Lipide transportieren, ist das transitorische ER, das aber in höheren Pflanzen - basierend auf ultrastrukturellen Studien – noch nicht identifiziert worden ist (Robinson, 2007).

Der Eintritt neusynthetisierter Proteine in das Lumen des ER erfolgt in mehreren Schritten, beginnend mit dem kotranslationalen Eintritt. An das Signalpeptid des Proteins bindet dann ein zytosolischer Signal-Erkennungs-Partikel (SRP). Dieser Komplex wird durch die Interaktion mit dem SRP-Rezeptor zur ER-Membran gebracht (Meyer et al., 1982). In einem energieverbrauchenden Prozess wird das ungefaltete Protein durch die Translokationspore Sec61 in das Lumen des ER transportiert (Meyer et al., 1982; Walter and Blobel, 1981; Walter et al., 1981). Während der Membranpassage werden Signalsequenzen von Signalpeptidasen abgespalten und die Proteine zur weiteren Modifizierung in das Lumen des ER entlassen (Shelness and Blobel, 1990). Dort werden die Proteine mit Hilfe der Chaperone Bip (Munro and Pelham, 1986), Calnexin (Hebert et al., 1996; Hebert et al., 1995) und Calreticulin (Denecke et al., 1995) gefaltet. Diese Chaperone verhelfen den neusynthetisierten Proteinen so, ihre funktionelle, spezifische Konformation zu erreichen. Kleine Proteine wie z. B. die Ribonuklease können sich auch spontan falten. Falsch gefaltete Proteine werden durch einen Kontrollmechanismus erkannt, abgebaut und

zur Degradation zurück ins Zytosol transportiert (Brandizzi et al., 2003; Langhans et al., 2008; Vitale and Denecke, 1999). Dieser Abbau der Proteine geschieht in Säugern und Hefen über einen Prozess, der als ERAD (ER-associated protein degradation) bezeichnet wird. Auch in Pflanzen konnte ein Mechanismus entdeckt werden, der Proteine erkennt und degradiert (Brandizzi et al., 2003; Di Cola et al., 2001; Kostova and Wolf, 2003).

Nach abgeschlossener Modifikation und korrekter Faltung werden die meisten löslichen Proteine ohne ein spezifisches Sortierungssignal sekretiert. Proteine können das ER über den vesikulären COPII-Transport verlassen und werden zum Golgi-Apparat transportiert. ER-residente Proteine werden aktiv durch selektiven Ausschluss von dem COPII-Vesikel-Transport im ER zurückgehalten oder durch einen selektiven Rücktransport vom dem Golgi-Apparat über den COPI-vermittelten Transportweg zurück zum ER transportiert (Langhans et al., 2008; Vitale and Denecke, 1999). In Pflanzen fungieren sowohl die Aminosäuresequenzen HDEL als auch KDEL als Retentionssignal (Denecke et al., 1992; Napier et al., 1992).

1.1.2 Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterscheidet sich morphologisch und funktionell vom Golgi-Apparat der Hefen und Säuger (Robinson, 2007). In Säugerzellen sind die einzelnen Stapel des Golgi-Apparats durch verzweigte tubuläre Membranen miteinander verbunden, die ein den Zellkern umgebendes, komplexes Netzwerk bilden. Die Golgi-Stapel in Pflanzenzellen sind hingegen nicht miteinander verbunden und stellen unabhängige Einheiten dar, die unregelmäßig im Zytoplasma verteilt sind und eine hohe Mobilität entlang der Mikrofilamente und Mikrotubuli des Zytoskeletts aufweisen (Boevink et al., 1998; Brandizzi et al., 2003; Nebenfuhr et al., 1999). Am Golgi-Apparat lässt sich eine eindeutige Polarität feststellen, die ihn in einen *cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi unterteilt, dem sich das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) anschließt (Nebenfuhr and Staehelin, 2001). Diese Einteilung basiert auf der Zusammensetzung der Enzyme in den jeweiligen Zisternen. Der Golgi-Apparat besteht aus Stapeln flacher, membranumschlossener Hohlräume. Mehrere dieser Golgi-Zisternen bilden eine Funktionseinheit, die als Dictyosom bezeichnet werden. Die Anzahl der Zisternen je Dictyosom sowie die Anzahl der Dictyosomen einer Zelle variiert innerhalb verschiedener Pflanzenarten stark (Dupree and Sherrier, 1998). Der Golgi-Apparat spielt eine zentrale Rolle im sekretorischen Transportweg der eukaryontischen Zelle. Proteine werden hier prozessiert und für den Transport in die Zielkompartimente sortiert und verpackt (Farquhar and Palade, 1998). Die Sor-

tierung sekretorischer Vesikel, Synthese und Modifizierung von Elementen der Plasmamembran und die die Sortierung von lysosomalen Proteinen in Säugern sind Funktionen des Golgi-Apparats ebenso wie die Synthese und Sortierung von Zellwandpolysacchariden in Pflanzen.

1.1.3 Die endosomalen Kompartimente

Es gibt funktionell unterschiedliche endosomale Kompartimente, von denen einige charakteristische interne Vesikel besitzen und demnach als multivesikuläre Körper („multivesicular bodies“, MVBs) bezeichnet werden. Die Endosomen in Hefen und Säugern bestehen aus mehreren dynamischen Kompartimenten, die in Struktur und Funktion variabel sind (Gruenberg and Stenmark, 2004). Frühe Endosomen bestehen aus einem Netzwerk von Röhren, Zisternen und vesikulären Anteilen (Hopkins et al., 1990; Tooze and Hollinshead, 1991). Späte Endosomen entwickeln sich durch Abschnürung von Vesikeln in ihr eigenes Lumen zu multivesikulären Kompartimenten und sind so morphologisch von den frühen Endosomen unterscheidbar.

In Hefen werden in der Regel endozytierte Plasmamembranproteine zur Vakuole transportiert und dort abgebaut. Einige Proteine werden aber auch rezykliert, (Ziman et al., 1998). Degradativer Transport von Proteinen zur Vakuole erfolgt ausgehend von der Plasmamembran durch die Internalisierung in endozytische Vesikel und verläuft im Anschluss über frühe Endosomen und multivesikuläre, späte Endosomen zur Vakuole (Prescianotto-Baschong and Riezman, 1998; Singer-Krueger et al., 1993).

Das frühe Endosom fusioniert mit bestimmten Sortierungsvesikeln und reift dadurch zu einem späten Endosom. Das späte Endosom in Säugern und Hefen besteht aus mehreren dynamischen Kompartimenten, welche in Struktur, Zusammensetzung und Funktion variabel sind (Gruenberg and Stenmark, 2004). Das prävakuoläre Kompartiment (PVC) oder späte Endosom („late endosome“, LE) ist ein Organell, das auch als Schnittstelle zwischen der sekretorischen und der endozytotischen Transportroute auf dem Weg zum lytischen, respektive vakuolären Kompartiment (Lysosom oder Vakuole) angesehen wird. In Säugern und Hefen konnte gezeigt werden, dass es sich bei PVCs um intermediäre Kompartimente des biosynthetisch-sekretorischen Wegs zur Vakuole handelt, in denen der sekretorische und der endozytotische Weg zusammen laufen (Lemmon and Traub, 2000; Maxfield and McGraw, 2004). Aufgrund des durch die V-Typ-ATPase erzeugten niedrigen pH-Werts in diesen Kompartimenten dissoziieren Liganden von den vakuolären Sortierungsrezeptoren. Die Rezeptoren und fehlsortierte Proteine konzent-

rieren sich hierbei in den Ausstülpungen des Endosoms und werden durch Abschnüren kleiner Vesikel zurück zur Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat rezykliert. Dies konnte auch in Pflanzen gezeigt werden (Robinson et al., 1998). Der verbleibende Vesikel mit den Liganden, die sich im Lumen des Vesikels sammeln, verschmilzt mit Lysosomen bzw. mit der pflanzlichen Vakuole.

In Pflanzen werden endosomale und prävakuoläre Kompartimente im Allgemeinen als eine Zwischenstation auf dem Transportweg zur lytischen Vakuole angesehen. In Analogie zur Situation in tierischen Zellen erhalten diese Kompartimente durch einen Rezeptor-vermittelten Transportschritt Proteine vom Golgi-Apparat und leiten diese zu den Vakuolen weiter. Proteintransport von der Plasmamembran zu den frühen endosomalen Kompartimenten konnte auch in Pflanzen gezeigt werden (Geldner et al., 2003; Grebe et al., 2003; Ueda et al., 2001). Diese endozytotische Route hängt von dem BFA-sensitiven GNOM („guanine nucleotide exchange factor“), einem ARF-GEF, ab (Geldner et al., 2003). In Pflanzen übernimmt das *trans*-Golgi Netzwerk die Rolle eines frühen Endosoms (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007a; Lam et al., 2007b; Otegui and Spitzer, 2008; Robinson et al., 2008). Im Gegensatz zu Säugern stellen das TGN und das frühe Endosom („early endosom“, EE) in Pflanzen identische oder zumindest überlappende Kompartimente dar. Dadurch erscheint das TGN als vom Golgi-Apparat unabhängiges Kompartiment, das auch vom Golgi-Apparat getrennt auftreten kann (Foresti and Denecke, 2008). In Pflanzen konnte gezeigt werden, dass ein endozytotisches, multivesikuläres Kompartiment die Funktion eines prävakuolären Kompartiments ausübt (Tse et al., 2006). Durch die inneren Vesikel erscheint das PVC auf ultrastruktureller Ebene als multivesikuläres Kompartiment (MVB). Proteine, die degradiert werden sollen, werden in die inneren Vesikel des PVCs aufgenommen. Die Vesikelabschnürung findet nicht wie üblicherweise in Richtung des Zytosols, sondern in das PVC hinein statt (Hurley, 2008; Katzmann et al., 2002; Luzio et al., 2000). Die Bildung der inneren Vesikel wird u. a. durch die ESCRT-Komplexe (endosomal sorting complex required for transport) 0 - III initiiert (Hurley, 2008; Hurley and Emr, 2006).

1.1.4 Die Vakuole

In Pflanzen gibt es Proteinspeichervakuolen (PSV) und lytische Vakuolen (LV), die sich in Form, Größe, Funktion und Inhalt unterscheiden (Marty, 1999). Die beiden Vakuolentypen lassen sich durch TIPs (tonoplast intrinsic proteins), die spezifische integrale Membranproteine darstellen, unterscheiden. Die PSV wird durch die Isoform δ -TIP bzw. α -TIP, die lytische Vakuole durch γ -TIP charakterisiert (Jauh et al., 1999; Swanson et al., 1998). Vakuolen sind ähnlich wie Vesikel aufgebaut, stellen

aber deutlich größere, von dem Tonoplast, der Membran der Vakuole, umschlossene Räume dar. Die pflanzlichen Vakuolen erfüllen neben ihrer lytischen noch weitere Funktionen wie die Erhaltung des Turgordrucks, Lagerung von Gift- und Bitterstoffen oder Speicherfunktionen von Proteinen, Ionen und anderen Stoffwechselmetaboliten (Wink, 1993). Für eine Sortierung der Proteine zu den vakuolären Kompartimenten sind spezifische Sortierungssignale erforderlich (Hadlington and Denecke, 2000; Neuhaus and Rogers, 1998; Robinson et al., 1998). Proteine, die die lytische Vakuole erreichen sollen, werden mit Clathrin-beschichteten Vesikel mit Hilfe des vakuolären Sortierungsrezeptors befördert. Der Transport der Speicherproteine geschieht durch sogenannten „dense vesicles“ (DVs). DVs werden aufgrund ihres elektronendichten Inhalts in ultrastrukturellen Aufnahmen so bezeichnet. Die Bildung der DVs findet an den lateralen Enden der Golgi-Zisternen statt, die Sortierung in die DVs beginnt dabei bereits im *cis*-Golgi (Hillmer et al., 2001; Hinz et al., 1999; Hohl et al., 1996). In Kürbis werden Proteine, deren Zielort die Proteinspeichervakuole ist, über PAC-Vesikel (precursor accumulation vesicles) vom ER direkt zur Speichervakuole transportiert (Hara-Nishimura et al., 1998; Shimada et al., 2002).

1.2 intrazellulärer Transport

Zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktionalität muss eine Zelle Stoffe aufnehmen, abgeben und zwischen den einzelnen Kompartimenten transportieren. Die Proteine können auf drei verschiedene Arten transportiert werden: durch gerichteten Transport, Transmembrantransport und vesikulären Transport. Der gerichtete Transport findet zwischen den topologisch äquivalenten Kompartimenten des Zellkerns und des Zytosols statt. Beim Transmembrantransport werden Proteine durch membrangebundene Translokatoren aus dem Zytosol in topologisch andersartige Kompartimente befördert. Der Eintritt von Proteinen in das ER und der Proteintransport in die Plastiden und Mitochondrien werden durch diesen Mechanismus vermittelt. Der vesikuläre Transport von Proteinen und anderen Molekülen als Fracht zwischen den topologisch äquivalenten Kompartimenten des Endomembransystems wird durch kleine Vesikel bewerkstelligt.

1.2.1 Der sekretorische Transportweg

Der Transport und die Sortierung im sekretorischen Transportweg eukaryotischer Zellen ist ein komplexer Prozess. Der frühe sekretorische Weg ist der Transport vom ER zum Golgi-Apparat, als späten sekretorischen Weg bezeichnet man den

Transport ab dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran und in den Extrazellularraum oder zu den lytischen Kompartimenten (siehe Abb. 1.1). Die einzelnen Moleküle müssen dabei selektiv transportiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von verschiedenartigen Transportvesikeln (Robinson et al., 1998; Schekman and Orci, 1996).

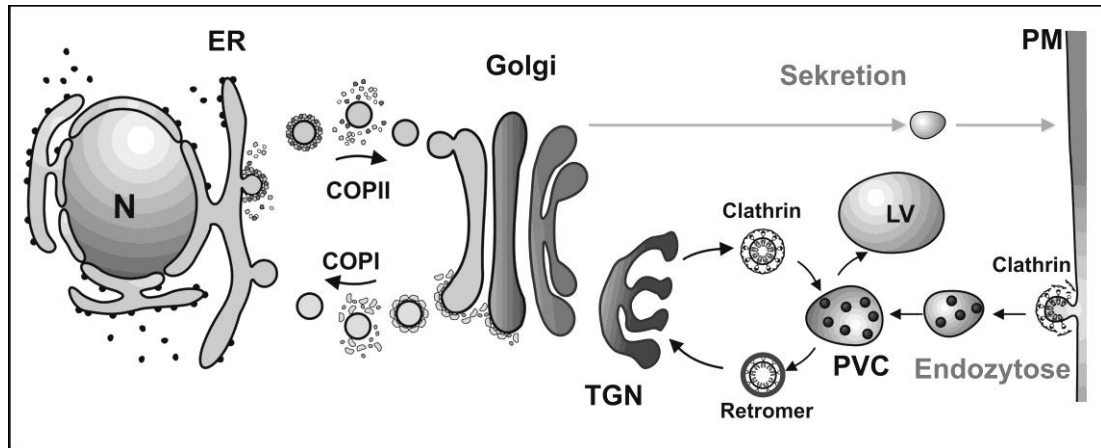


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Proteintransports des sekretorischen und des endozytotischen Transportweges in Pflanzen. Proteine, die die lytische Vakuole oder die Plasmamembran erreichen sollen, betreten den sekretorischen Transportweg am ER. In einem COPII-vermittelten Transport gelangen sie in den Golgi-Apparat. Proteine ohne Sortierungssignal werden sekretiert, Proteine mit Sortierungssignal werden zu ihrem Zielort transportiert – mit COPI-Vesikeln zurück zum ER, im Golgi-Apparat verbleibend, mit Clathrin-umgebenen Vesikeln weiter zu den endosomalen Kompartimenten oder weiter bis zur lytischen Vakuole. Durch Endozytose gelangen Proteine in das Innere der Zelle. (Nucleus (N), Endoplasmatisches Retikulum (ER), *trans*-Golgi Netzwerk (TGN), prävakuoläres Kompartiment (PVC), lytische Vakuole (LV), Plasmamembran (PM))

Es gibt mindestens fünf Klassen von Transportvesikeln im sekretorischen und endozytotischen Transportweg: COPI-, COPII-Vesikel, CCVs (Clathrin-coated vesicles), PAC-Vesikel und Retromer-Vesikel. Die COPII-Hüllproteine bestimmen den anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat, während der retrograde Transport vom Golgi-Apparat zurück zum ER mit Hilfe von COPI-Vesikeln bewerkstelligt wird. Mit Hüllproteinen vom Clathrin-Typ umgebene Vesikel sind zwischen der Plasmamembran und den endosomalen Kompartimenten sowie zwischen Golgi-Apparat/TGN und endosomalen Kompartimenten anzutreffen (Barlowe, 2003; Kirchhausen, 2000).

Die COPI/COPII-Vesikel haben eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihrer ultrastrukturellen Erscheinung und besitzen eine diffuse, unregelmäßige Proteinhülle (Antony

et al., 2001; Barlowe et al., 1994; Orci et al., 1986). Ausgehend vom ER werden die Proteine mit Hilfe von Transportvesikeln zum *cis*-Golgi transportiert (Salama et al., 1993). Die Hülle dieser COPII-Vesikel setzt sich aus drei Hauptbestandteilen zusammen, der GTPase Sar1 und den Proteinkomplexen Sec23/24 und Sec13/31 (Barlowe et al., 1994; Matsuoka et al., 1998). Um mit dem COPII-Vesikel anterograd transportiert werden zu können, müssen diese Proteine kein spezifisches Signal besitzen. Alle Proteine, die kein Sortierungssignal besitzen gelangen in den sogenannten „bulk-flow“ (Hauptstrom); sie werden vom ER durch den Golgi-Apparat transportiert und danach sekretiert (Chrispeels and von Schaewen, 1992; Denecke et al., 1992). Ein Abzweigen aus dem Hauptstrom ist nur möglich, wenn das jeweilige Protein ein Sortierungssignal besitzt (Pfeffer and Rothman, 1987). ER-Residente werden am Golgi-Apparat sortiert und durch COPI-Vesikel rezykliert, damit sie im ER angereichert werden können.

Der durch COPI-Vesikel vermittelte Transport wurde in Pflanzen funktionell nachgewiesen (Phillipson et al., 2001). Die COPI-Vesikel werden an den Enden der Golgi-Zisternen gebildet (Orci et al., 1986). Die Bildung des COPI-Vesikels wird durch die Rekrutierung der GTPase ARF1 (ADP-Ribosylierungs-Faktor) eingeleitet (Saalbach et al., 1991). Der zweite Hauptbestandteil ist der aus sieben Untereinheiten bestehende Coatomer-Komplex. Das Rezyklieren der Proteine zurück zum ER durch COPI-Vesikel steht im Gleichgewicht zu dem anterograden Transport, um zu gewährleisten, dass der Membranfluss zwischen den beiden Kompartimenten ausgeglichen bleibt (Lewis and Pelham, 1996). Während in Säugern das notwendige Signal zum Rücktransport löslicher Proteine die C-terminale Aminosäure-Sequenz HDEL (Munro and Pelham, 1987) und in Hefen die C-terminale Sequenz KDEL (Pelham, 1988) identifiziert wurde, fungieren in Pflanzen sowohl die Aminosäure-Sequenz HDEL als auch KDEL als Retentionssignal (Denecke et al., 1992; Napier et al., 1992). Der Rücktransport von Membranproteinen erfolgt jedoch durch eine Sequenz bestehend aus zwei Lysin (KKXX oder KXKXX; X steht für eine beliebige Aminosäure) in der zytoplasmatischen Domäne (Langhans et al., 2008), die auch als Retentionssignal für Membranproteine identifiziert wurde (Jackson et al., 1993; Nilsson et al., 1989).

Clathrin-beschichtete Vesikel (CCVs) vermitteln den selektiven Proteintransport vom *trans*-Golgi bzw. TGN zu den multivesikulären, prävakuolären Kompartimenten (PVCs) und sind jedoch auch am endozytotischen Transport beteiligt (Barlowe, 1998; Rothman and Wieland, 1996; Sanderfoot and Raikhel, 1999; Sanderfoot and Raikhel, 2001; Schekman and Orci, 1996). Die Proteinhülle Clathrin-beschichteter Vesikel (CCVs) besteht aus zwei Hauptkomponenten, dem Clathrin-

Gerüst und den Adaptor-Komplexen, die das Bindeglied zwischen dem Clathrin-Gerüst und den Membranproteinen darstellen. Die Adaptor-Komplexe AP-1 und AP-2 sind aus je vier Adaptinen aufgebaut. Während sich AP-1 aus den Untereinheiten β_1 , γ , μ_1 und σ_1 zusammensetzt, besteht AP-2 aus den Adaptinen β_2 , α , μ_2 und σ_2 . Diese heterotetrameren Proteinkomplexe befinden sich im Zytosol. Die β -Adaptine der Adaptor-Komplexe enthalten die Clathrin-Bindungsstelle (Schroeder and Ungewickell, 1991). Die Interaktion mit den Membranproteinen erfolgt hingegen durch das α - bzw. γ -Adaptin. Die σ - und μ -Adaptine sind sowohl an der korrekten Assemblierung der Komplexe als auch an der Erkennung der Membranrezeptoren beteiligt (Page and Robinson, 1995). Die CCVs mit dem AP-1 Komplex werden am TGN und/oder an Endosomen gebildet, während die CCVs mit AP-2 an der Plasmamembran entstehen (Brodsky et al., 2001; Kirchhausen, 2000; Robinson and Bonifacino, 2001).

Dem Vesikeltransport liegt ein dreistufiger Mechanismus zugrunde (Rothman and Wieland, 1996). Zuerst assemblieren die Hüllproteine an die Membran, und dies führt zu einer Wölbung der Membran des Donor-Kompartiments. Nach der Anreicherung der Frachtmoleküle durch Interaktion einzelner Komponenten der Hüllproteine mit Membranproteinen und löslicher Proteinen mit den entsprechenden Rezeptoren kommt es zuerst zur Bildung und Ablösung eines Transportvesikels. Nach der Dissoziation der Hüllproteine lagert sich der Vesikel in einem zweiten Schritt an die Zielmembran an. Im dritten Schritt erfolgen die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran und die anschließende Freigabe der Fracht in das Zielkompartiment (Kirchhausen, 2000; Robinson and Hinz, 1999). Die Koordination des vesikulären Transports innerhalb der Zelle bedarf starker Regulation durch Kontrollmechanismen der Einzelkomponenten des Vesikeltransports. Dabei sind die korrekte Zuordnung der jeweiligen Transportvesikel zu den richtigen Zielkompartimenten und auch der Ablauf der eigentlichen Fusion von Bedeutung. Die Bildung eines Vesikels im ersten Schritt ist durch die Wechselwirkung der Rab-GTPasen, Tethering-Faktoren und GEFs (GDP/GTP exchange factor; GDP/GPP-austauschende Proteine), die die Hüllproteine rekrutieren, koordiniert (Lupashin and Sztul, 2005; Rutherford and Moore, 2002; Sogaard et al., 1994; Whyte and Munro, 2002). Bei dem dritten Schritt des Vesikeltransport, der Fusion des Vesikels, sind die Interaktion sogenannter SNAREs (**S**oluble **N**SF (**N**-ethylmaleimide-**s**ensitive **f**actor) **a**ttachment **p**rotein **r**eceptor) mit anderen SNAREs, mit dem SNAP (**S**oluble **N**SF **a**ttachment **p**rotein) und NSF-Proteinen, für die Spezifität der Fusion entscheidend (Hong, 2005; Lipka et al., 2007; McNew et al., 2000; Robinson et al., 1998; Sanderfoot and Raikhel, 1999;

Sollner et al., 1993). Zusammenfassend wird die Transportspezifität hauptsächlich durch Rab-GTPasen, den Tethering-Faktor und die SNAREs gewährleistet.

1.3 Der vakuoläre Sortierungsrezeptor BP80

Der Transport zum Lysosomen in Säugern oder zur Vakuole in Hefen ist selektiv und abhängig von einem Rezeptor. Spezifische Sortierungssignale in löslichen, sauren Hydrolasen interagieren mit einem Rezeptor in der Membran des *trans*-Golgi oder des TGN (Rouille et al., 2000). Der Rezeptor-Liganden-Komplex wird anschließend in CCVs (clathrin-coated vesicles) rekrutiert und danach zum Endosom transportiert. Nach Erreichen des Endosoms wird der Rezeptor rezykliert, während der Ligand zum lytischen Kompartiment weiter transportiert wird. In Säugern handelt es sich bei dem TGN-Rezeptor um den Mannosyl 6-Phosphat Rezeptor (MPR, Braulke and Bonifacino, 2008), in Hefen ist es das Vps10p (vacuolar protein sorting protein 10p, Bowers and Stevens, 2005). Die Effizienz des Transports zum lytischen Kompartiment wird durch das Rezyklieren des Rezeptors von einem angesäuerten, intermediären Kompartiment gewährleistet, an dem die Frachtmoleküle von den Rezeptoren dissoziieren (Seaman, 2005). Während der anterograde Transport des Rezeptor-Liganden-Komplex durch Interaktion von Clathrin-Adaptoren mit einem Dileucin-Motif in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors vermittelt wird (Abazeed and Fuller, 2008; Doray et al., 2007), ist für den retrograden Transport in Hefen und in Säugern ein anderer zytosolischer Coat verantwortlich, der als Retromer bezeichnet wird und auch eine andere Domäne des Rezeptors erkennt (Bonifacino and Rojas, 2006; Burda et al., 2002; Seaman, 2005; Seaman, 2007).

In Pflanzen existieren verschiedene Typen von Vakuolen, die Proteinspeichervakuole und die lytische Vakuole. Daher werden unterschiedliche Klassen von vakuolären Sortierungs-Rezeptoren (VSRs) zur Erkennung und Sortierung der Speicherproteine zur Proteinspeichervakuole (PSV) oder lösliche Hydrolasen, die die lytische Vakuole (LV) erreichen sollen, benötigt. Die Sortierung vakuolärer Proteine in Pflanzen erfolgt hierbei durch Sortierungssignale, die aus ihrer Aminosäuresequenz resultieren. Es existieren drei Kategorien von pflanzlichen vakuolären Sortierungssignalen („vacuolar sorting signal“; VSS): das Sequenzspezifische VSS (ssVSS), das C-terminale VSS (ctVSS) und das strukturelle VSS („physical structure VSS“; psVSS). Man unterscheidet je nach Lage des Sequenzspezifischen vakuolären Sortierungssignal zwischen N- und C-terminalem ssVSS (Holwerda et al., 1992; Matsuoka et al., 1990). Während die meisten N-terminalen ssVSS eine gemeinsame Aminosäuresequenz (NPIRL) aufzeigen (Matsuoka and Nakamura, 1999), gibt es innerhalb des C-terminalen ssVSS dagegen keine

Konsensussequenz (Brown et al., 2003; Cao et al., 2000). Das Sortierungssignal kann sich aber auch - wie z. B. bei Ricin - innerhalb der Proteinsequenz befinden (Frigerio et al., 2001).

Die Proteine der RMR-Proteinfamilie („lumenal **R**eceptor homology domain, trans **M**embrane domain and **R**ing-H2 motif in the cytoplasmic tail protein) sind für die Sortierung der Proteine, die die PSV erreichen sollen, verantwortlich (Hillmer et al., 2001; Hinz et al., 2007; Park et al., 2007; Park et al., 2005), während die BP80-Familie in den Transport zur lytischen Vakuole involviert ist (Park et al., 2007; Robinson et al., 2005; Vitale and Hinz, 2005). Das bindende Protein („binding protein“; BP) hat eine molekulare Masse von 80 kDa und wird daher als „BP80“ bezeichnet. BP80 ist ein Typ I integrales Membranprotein, das eine Transmembran-Domäne (TMD) enthält und einen kurzen zytosolischen Schwanz (cytosolic tail; CT) besitzt. Die VSRs vom BP80-Typ sind in ihrer Funktion mit dem MPR in Säugern bzw. dem Vps10p in Hefen aufgrund mehrerer Beobachtungen vergleichbar. Das BP80 als Protein, das das vakuoläre Sortierungssignal NPIR bindet, wurde in einer Fraktion bestehend aus CCVs identifiziert (Kirsch et al., 1994). Des Weiteren konnten die BP80-Rezeptoren auf ultrastruktureller Ebene immunologisch im TGN lokalisiert werden (Hinz et al., 2007). VSRs besitzen ein Tyrosinmotif (YXX Φ) in der zytosolischen Domäne von BP80, das mit dem μ -Adaptin *in vitro* interagiert (Happel et al., 2004).

Außerdem wurde gezeigt, dass das pflanzliche Retromer mit dem VSR *in vitro* interagiert (Oliviusson et al., 2006), zusätzlich zur Lokalisierung am TGN auch am prävakuolären Kompartiment zu finden ist (Jaillais et al., 2008; Oliviusson et al., 2006; Yamazaki et al., 2008) und wahrscheinlich den VSR von dort aus zurück zum TGN rezykliert (Foresti and Denecke, 2008). Es wird vermutet, dass in Pflanzen der VSR im Golgi/TGN mit seinen Liganden interagiert und über CCVs zum PVC transportiert wird. Nachdem die Liganden durch die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich im PVC freigesetzt wurden, werden sie weiter zur lytischen Vakuole gebracht, während der Rezeptor Retromer-vermittelt zurück zum TGN rezykliert wird (Abb. 1.2).

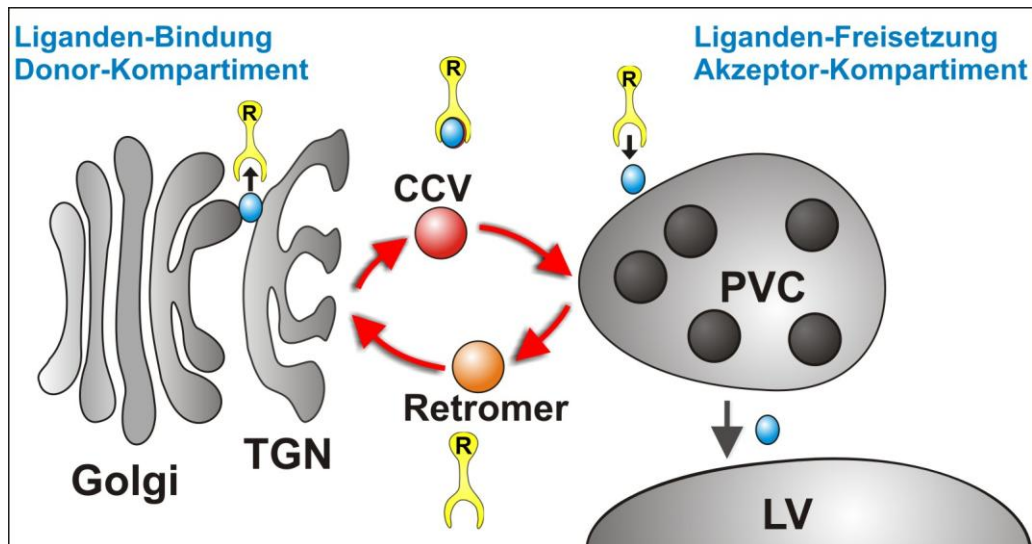


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des BP80-vermittelten Proteintransports in Pflanzen. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor (R) im Golgi/TGN wird der Rezeptor-Liganden-Komplex durch CCVs zum PVC transportiert. Nach Freisetzung des Liganden rezykliert der Rezeptor Retromer-vermittelt zurück zum TGN. (*trans*-Golgi Netzwerk (TGN), prä-vakuoläres Kompartiment (PVC), „clathrin-coated vesicle“ (CCV), lytische Vakuole (LV))

Der in Hefen für das Rezyklieren der Rezeptoren vom PVC zurück zum TGN verantwortliche Retromer-Komplex besteht aus verschiedenen vakuolären Proteinsortierungsproteinen („vacuolar protein sorting protein“; VPSp;). Der anterograde Transport zum PVC ist direkt abhängig vom Funktionieren des Retromer-vermittelten Rezyklierens der vakuolären Sortierungsrezeptoren (Seaman, 2005).

1.4 Der Retromer-Komplex

Der Retromer-Komplex ist ein zytosolischer Komplex, der aus zwei Subkomplexen besteht. Die große Untereinheit setzt sich aus den drei Proteinen Vps26p, Vps29p und Vps35p zusammen (Bonifacino and Hurley, 2008; Collins et al., 2008; Verges et al., 2007). Die Interaktion mit dem Rezeptor erfolgt über Vps35p (Hierro et al., 2007; Seaman et al., 1998). Das Retromer in Hefen besteht aus der großen heterotrimeren Untereinheit und einer kleinen heterodimeren Untereinheit aus den beiden Proteinen Vps5p und Vps17p (Horazdovsky et al., 1997) (siehe Abb. 1.3).

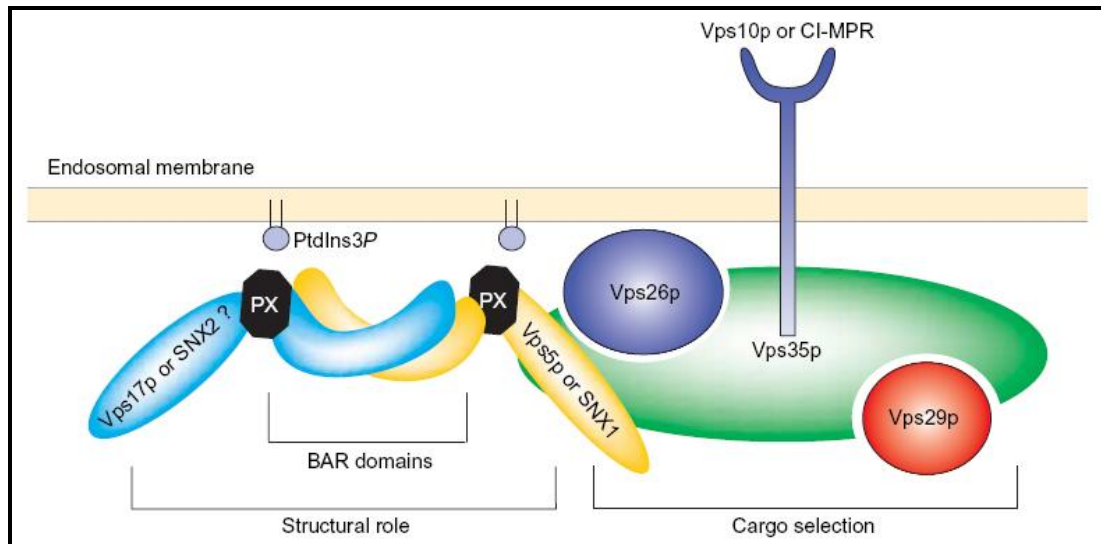


Abb. 1.3: Der Retromer-Komplex und seine Interaktionen. Die große Retromeruntereinheit (Vps26p, Vps29p und Vps35p) ist über Vps35p für die Selektion des Rezeptors verantwortlich, während der kleinen Untereinheit bestehend aus Vps17p und Vps5 eine strukturelle Funktion zukommt. Die Proteine der kleinen Untereinheit besitzen eine PX-Domäne, mit der sie mit PtdIns3P der endosomalen Membran interagieren können, und BAR-Domänen, die miteinander interagieren. (Seaman, 2004)

Homologe der Proteine der großen Retromer-Untereinheit konnten sowohl in Säugern (Haft et al., 2000) als auch in Pflanzen (Oliviusson et al., 2006) identifiziert werden. Die große Retromer-Untereinheit wurde in BY2-Zellen an einem multivesikulären prävakuolären Kompartiment (PVC), das in Pflanzen das späte Endosom repräsentiert, lokalisiert (Oliviusson et al., 2006; Yamazaki et al., 2008). Hinweise auf die Beteiligung des Retromers an der Sortierung vakuolärer Speicherproteine konnten nachgewiesen werden (Shimada et al., 2006; Yamazaki et al., 2008). Auch eine mögliche Rolle des VPS29 am Zyklisieren des PIN Auxin-Efflux-Transporters zwischen der Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten wird vermutet (Jaillais et al., 2007). PIN-Proteine kontrollieren die Verteilung des Phytohormons Auxin, das die Zellteilung und Zellausdehnung in Primärwurzeln reguliert (Blilou et al., 2005).

In Säugern stellen SNX1 und SNX2 Homologe des Vps5p dar, während SNX5 und SNX6 vermutlich die Rolle des Vps17p übernehmen (Rojas et al., 2007; Wassmer et al., 2007). In Säugern erfüllen demnach Vertreter der Sorting Nexin Familie die Rolle von Vps5p und Vps17p (Verges et al., 2007; Worby and Dixon, 2002).

Sequenzanalysen in einer *Arabidopsis*-Genom-Datenbank ergaben, dass für Vps17 kein Sequenzhomolog in *Arabidopsis* existiert, für Vps5p jedoch liegen drei

homologe Sequenzen vor. Die drei Vps5-Homologe sind die Sorting Nexine SNX1, SNX2a und SNX2b. Es wird angenommen, dass die kleine Retromer-Untereinheit aus diesen drei Sorting Nexinen besteht (Jaillais et al., 2006; Phan et al., 2008; Vanoosthuysse et al., 2003). Sorting Nexine sind eine Familie von Proteinen, der eine Beteiligung an Abbauvorgängen der Rezeptoren und am Membrantransport innerhalb der Zelle zugeschrieben wird. SNX1 und SNX2 sind Orthologe des Vps5p in Hefen, das in den Transport von Endosomen zurück zum *trans*-Golgi-Netzwerk eingebunden ist (Seaman, 2004). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Membran-assoziierte VPS35 mit dem vakuolären Sortierungsrezeptor VSR1 interagiert (Oliviusson et al., 2006). Ob diese Interaktion jedoch tatsächlich die Voraussetzung für das Rezyklieren des Rezeptors ist, muss noch bewiesen werden. Das pflanzliche Retromer könnte man sich nach heutigem Wissensstand wie in Abbildung 1.4 gezeigt vorstellen. Die große Untereinheit ist ähnlich der in Hefen. Als Bestandteile der kleinen Retromer-Untereinheit kommen SNX1, SNX2a und SNX2b in Frage.

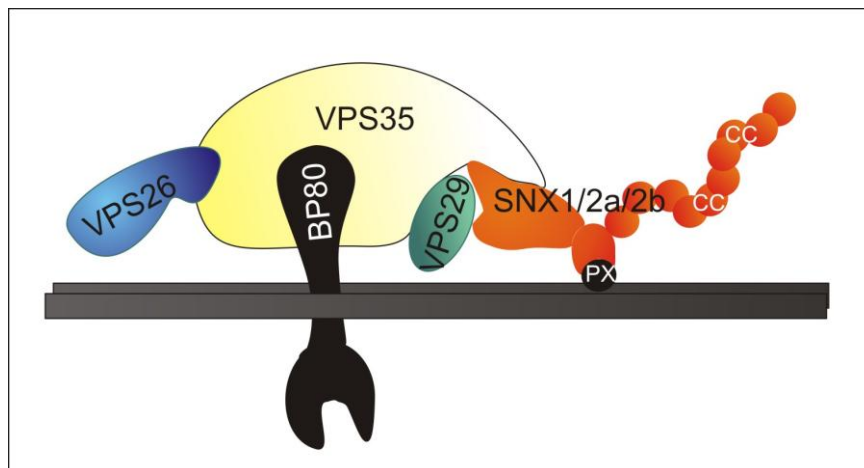


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des pflanzlichen Retromers mit dem Heterotrimer bestehend aus VPS35, VPS29 und VPS26 und den möglichen Sorting Nexinen mit PX-Domäne und CC-Domänen (vacuolar protein sorting protein (VPSp), binding protein 80 kDa (BP80), Sorting Nexin (SNX), phox homology domain (PX), coiled coil domain (CC))

Während die große Untereinheit über Vps35p für die Selektion der Fracht wie z. B. Rezeptoren zuständig ist, schreibt man der kleinen Untereinheit aus Vps5p und Vps17p jedoch eine strukturelle Funktion zu (Seaman, 2005). Vps29p verfügt über eine Phosphodiesterase-Falte, die eine Interaktion mit Vps35p ermöglicht und das kontrollierende Element im Zusammenfügen der großen Retromeruntereinheit darstellt (Collins et al., 2005; Wang et al., 2005). Vps35p besitzt eine hufeisenförmige

Tasche an seinem C-Terminus, in der Vps29p sitzt (Hierro et al., 2007). Vps26p interagiert mit Vps35p über seine C-terminale Domäne (Collins et al., 2008; Shi et al., 2006) und erhöht die Bindung zwischen Vps35p/Vps29p und der Membran (Reddy and Seaman, 2001). Die Bindung von Vps26p an Vps35p/Vps29p und damit die Bildung des trimeren Retromer-Subkomplexes ermöglicht zudem die Anlagerung von Vps5p und Vps17p (Pfeffer, 2001; Seaman, 2005).

Vps17p und Vps5p besitzen jeweils eine „Phox homology“ (PX) Domäne, die mit Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns-3P) oder aber auch anderen Phosphoinositiden der Membran interagieren kann (Carlton et al., 2005b; Rojas et al., 2007). Des Weiteren besitzen sie BAR-Domänen, die durch Interaktion ihrer „coiled-coil“ (CC) Domänen in ihrer C-terminalen Region eine Dimerisierung der beiden vakuolären Proteinsortierungsproteine ermöglichen (Cozier et al., 2002; Seaman and Williams, 2002). Durch diese Dimerisierung wird der der Membran zugewandte Teil der BAR-Domänen positiv geladen und an die Membran angelagert (Gallop and McMahon, 2005). Dies führt zu einer Ausstülpung der Membran und damit zur Vesikelabknospung (Seaman and Williams, 2002).

1.5 Zielsetzung

Die Effizienz von Rezeptor-vermittelten Sortierungsprozessen im sekretorischen Transportweg eukaryotischer Zellen beruht auf dem Prinzip des Rezyklierens von Rezeptoren nach Beenden des Transportes zum Akzeptor-Kompartiment. Im Falle des vakuolären Sortierungsrezeptors ist demzufolge der Retromer-Komplex essenziell. Zur Analyse des retromer-vermittelten VSR-Transports sollen die Sorting Nexine SNX1 und SNX2a der kleinen Retromeruntereinheit in transienter Genexpression und mittels Immunmarkierung in *Arabidopsis thaliana* und Tabak zunächst lokalisiert werden. Dies erfordert die Herstellung von Antikörpern gegen die beiden Sorting Nexine sowie von XFP-Fusionsproteinen.

Aufschluss über die Funktion und Beteiligung der Sorting Nexine am Rezeptor-vermittelten Transport geben soll eine Inhibierung der Funktion des Retromers durch verschiedene dominant-negative SNX-Mutanten oder durch ein RNAi-Konstrukt, das alle SNXs inhibiert. Proteinbiochemische Analysen mit den sekretierten und vakuolären Reportern und konfokal-mikroskopische Analysen mit Markern für verschiedene Kompartimente des sekretorischen Transportweges in Koexpression mit den SNX-Mutanten und dem RNAi-Konstrukt sollen ihren möglichen Einfluss auf Transportvorgänge in der Zelle aufzeigen. Des Weiteren soll das Kompartiment, in dem die Interak-

tion von BP80 und seinen Liganden stattfindet, identifiziert werden. Hierzu wurde ein „*in vivo* binding assay“ entwickelt, der auf unterschiedlichen BP80-Konstrukten basiert, die eine luminaire Bindungsdomäne des BP80 und die Transmembran-Domäne des ER-Residenten Calnexin besteht. Dadurch soll gezeigt werden, ob eine Bindung der Liganden bereits im ER stattfinden kann.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es den Mechanismus des vakuolären Proteintransports in Pflanzenzellen zu analysieren und die kleine Untereinheit des Retromer-Komplexes strukturell und funktionell zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien, Chemikalien, Enzyme und Kits

Eine detaillierte Auflistung der genutzten Geräte, Materialien, Chemikalien, Enzyme und Kits befindet sich im Anhang (6.1 – 6.4). Die verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anderweitig aufgeführt mit dem Reinheitsgrad pro analysis (p.a.) von den Firmen Applichem (Darmstadt), Amersham Bioscience (Freiburg), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Enzyme wie alkalische Phosphatase (CIAP), DNA-Polymerasen (Phusion, TAQ-Polymerase), Ribonuklease A, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und Größenmarker von DNA und Proteinen wurden von den Firmen MBI Fermentas (Heidelberg), Biocat (Heidelberg), Sigma Aldrich (Taufkirchen), Amersham Bioscience (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Roche (Mannheim), Finnzymes (Espoo, Finnland), Serva und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Das Cereal α -amylase assay-Kit und Macerozym R10, sowie Zellulase R10 wurden von Megazyme (Irland) bzw. Yakult (Japan) bezogen. Das Midipred Kit Wizard Plus stammte von Promega (Mannheim) und das DNA-Aufreinigungskit NucleoSpin Extract II von Macherey-Nagel (Düren). ECL-Filme wurden von Amersham Bioscience (Freiburg) bezogen. Nitrocellulosemembranen stammten von der Firma Pall (Dreieich).

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

2.2.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm MC 1061 genutzt (Casadaban and Cohen, 1980).

2.2.2 Verwendete Plasmide

Der von Dr. Jürgen Denecke (University of Leeds) modifizierte pUC18-Vektor pAmy wurde zur Klonierung der durch PCR-Amplifikation gewonnenen Gene bzw. Fragmente und zur transienten Genexpression in *Arabidopsis*- und Tabakprotoplasten verwendet. Dieser pflanzliche Expressionsvektor besitzt einen 35S-CMV-Promotor, 3'-nos-Terminator und eine Ampicillinresistenz-kassette.

2.3 Desoxyoligonukleotide

Alle Desoxyoligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) synthetisiert. Tabelle 2.1 zeigt die in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Desoxyoligonukleotide. Die Sequenzen der Desoxyoligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die hervorgehobenen Nukleotide zeigen die Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym.

Tabelle 2.1: Oligonukleotidsequenzen

	Oligonukleotide (sense / antisense)
SNX1 <i>NcoI</i> / <i>XbaI</i>	GTTGTC CCATGG AGAGCACGGA / TTTGTC TCTAGAC AGAATAAGAAG
SNX1-ΔCC <i>NcoI</i> / <i>BamHI</i>	GTTGTC CCATGG AGAGCACGGA / AACCT GGATCC TACATTGTCTCTTCATC
SNX1-ΔN <i>NcoI</i> / <i>BamHI</i>	AAGAGA CCATGG ACAGATTCAGG / TAGTTT GGATCC TAGACAGAATAAGAA
SNX1-mKate <i>NcoI</i> / <i>NotI</i>	GTTGTC CCATGG AGAGCACGGA / TTAGTT GCGGCCG CCGACAGAATAAGAAGC
-mKate <i>NotI</i> / <i>BamHI</i>	CACCGG GCGGCCG CCATGGTGTCTAAGGGCGAAGA / AGTCGC GGATCC TTAATTAAGTTTGTGCCCCAGTT
SNX1-Cerulean <i>NcoI</i> / <i>NotI</i>	GTTGTC CCATGG AGAGCACGGA / TTAGTT GCGGCCG CCGACAGAATAAGAAGC
-Cerulean <i>NotI</i> / <i>BamHI</i>	CGATAT GCGGCCG CCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGA / ACATG GGATCC CTACTTGTACAGCTCGTCCAT
SNX2a <i>NheI</i> / <i>Sall</i>	AGAGAA GCTAGC ATGATGGGCTCAGAG / ATTCTG GTCGAC TTAGCTGCTCTGCTTCTC
SNX2a-ΔCC <i>NheI</i> / <i>Sall</i>	AGAGAA GCTAGC ATGATGGGCTCAGAG / ACTCAT GTCGAC TCACAACCTCCCTTGAC
SNX2a-ΔN <i>NheI</i> / <i>Sall</i>	GATTAC GCTAGC ATGACTGTATCTAACC / ATTCTG GTCGAC TTAGCTGCTCTGCTTCTC
SNX2a-GFP <i>NheI</i> / <i>NotI</i>	AGAGAA GCTAGC ATGATGGGCTCAGAG / TTTCTG GCGGCCG CCGCTGCTCTGCTTCTC
-GFP <i>NotI</i> / <i>BamHI</i>	AGGAG GCGGCCG CCATGGTGTAGCAAGGGC / TCGCG GGATCC TTACTTGTACAGCTC

SNX2b <i>NcoI / BamHI</i>	GATTTA CCATGG ATGATGGGCTCAGAGAATGACGAAGAGTCCCAT / TGTGCT GGATCC TTAAGAGCTCTCTCTAT
SNXCCRNAi	
CC sense <i>NheI / NcoI</i>	GCAGAT GCTAGC AGTGCTTTACTGACA / GAAGTC CCATGG CCTTTCTCTGTCCAA
CC antisense <i>NotI / BglII</i>	ATGAAG GCGGCCG CCTTTCTCTGTCCAA / AAACGT AGATCT TTATCACGAAATGACTGT
loop <i>NcoI / NotI</i>	AAATAA CCATGG TCTTTTTTCTTTTA / TTCCCA GCGGCCG CAATCCAAATGTAAG
VPS26 <i>NcoI / BamHI</i>	ATCTT CCATGG ATGAATTATCTTCTTG / GTCTT GGATCC ATCAAGATGTCTCT
VPS29 <i>NheI / BamHI</i>	GAAAGT GCTAGC ATGGTGCTGGTATTG / CTGTTA GGATCC TACGGACCAGAGCT
VPS29- Cerulean <i>NheI / NotI</i>	CTCTCT GCTAGC ATGGTGCTGGTATTG / GATCTG GCGGCCG CGTACGGACCAGAGCT
VPS35 <i>NcoI / BamHI</i>	CTCTAG CCATGG AATACCTTGAC / CAAGAA GGATCC TATTCAAACCATTC

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Die für die Peptidsynthese gewählten Peptide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) designed und hergestellt. Die Peptide sind so gewählt, dass die Antikörper gegen SNX1 und SNX2a spezifisch für das jeweilige Sorting Nexin sind, während der Antikörper gegen VPS35 alle drei Isoformen VPS35 a, b und c erkennen sollte. Die verwendeten Peptidantikörper und die für deren Herstellung verwendeten Peptidsequenzen zeigt die folgende Auflistung. Alle Antikörper wurden dabei mittels Doppelpeptidstrategie kreiert.

- Polyklonaler Peptidantikörper aus Kaninchen und Meerschweinchen gegen SNX1 aus *Arabidopsis thaliana*; Antigene: ISGSMQAPRSPSSH und VITKTNLPEYQGPEK; Verdünnung 1:1000 im Westernblot, 1:50 für Immunmarkierung

- Polyklonaler Peptidantikörper aus Kaninchen gegen SNX2a aus *Arabidopsis thaliana*; Antigene: CLGVDGGDHPLKISDV und CEDFRSSFSSKPISSD; Verdünnung 1:2500 im Westernblot, 1:200 für Immunmarkierung
- Polyklonaler Peptidantikörper aus Kaninchen und Meerschweinchen gegen VPS35 (alle Homologe a, b und c) aus *Arabidopsis thaliana*; Antigene: CMLSELRTSKLSPQKY und EKQEKERNELRDLVGC; Verdünnung 1:1000 im Westernblot, 1:50 für Immunmarkierung

Des Weiteren wurden folgende bereits publizierte Antikörper verwendet:

- Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen VPS29 aus *Arabidopsis thaliana*; Verdünnung 1:1000 im Westernblot, 1:100 für Immunmarkierung; (Oliviusson et al., 2006)
- Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das green fluorescent protein (GFP) aus *Aequorea victoria*; Verdünnung 1:2500 im Westernblot; (Tse et al., 2004)
- Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen den vakuolären Sortierungsrezeptor VSR_{At-1} BP80 aus *Arabidopsis thaliana*; Verdünnung 1:1000 im Westernblot, 1:100 für Immunmarkierung; (Tse et al., 2004)

2.4.2 Herstellung der Primärantikörper

Nachdem die Antiseren der Kaninchen und Meerschweinchen vor der Immunisierung mittels SDS-Page und Westernblot (siehe 2.11.2 und 2.11.3) keine Immunantwort auf *Arabidopsis* oder Tabak gezeigt haben, wurden diese von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) immunisiert. Die Antiseren wurden nach jeder Blutentnahme (nach 38, 66, 87 und 122 Tagen) auf eine Immunantwort gegen endogenes sowie überexprimiertes SNX1 bzw. VPS35 in *Arabidopsis*- oder Tabak-Protoplasten mittels SDS-Page und Westernblot untersucht. Bei einem negativen Ergebnis wurde das Tier erneut immunisiert. Nachdem eine Immunantwort erreicht worden war, wurde dem Kaninchen bzw. Meerschweinchen das Blut entnommen, und die Antiseren gegen die jeweiligen Peptide aufgereinigt. Bei dem Antikörper gegen SNX2a wurde keine Aufreinigung durchgeführt, sondern das Antiserum direkt verwendet. Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei -20 °C.

2.4.3 Sekundärantikörper

- Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:15000; Sigma (Deisenhofen)

- Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Meerschweinchen IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:15000; Sigma (Deisenhofen)
- Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen, Alexa-Fluor™ 405 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen, Alexa-Fluor™ 546 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen, Alexa-Fluor™ 568 (Invitrogen, Oregon, USA)
- Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Meerschweinchen, Alexa-Fluor™ 546 (Invitrogen, Karlsruhe)

2.5 Computeranalyse von DNA- und Proteinsequenzen

Die Protein- und DNA-Sequenzen sowie die entsprechenden „Gene Accession Numbers“ der einzelnen Retromerbestandteile in *Arabidopsis thaliana* wurden unter der URL-Adresse www.ncbi.nlm.nih.gov ermittelt.

Die DNA- und Proteinsequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programmes BLAST in der *Arabidopsis*-Genom-Datenbank TAIR, ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) und PROSITE zur Domänensuche (<http://www.expasy.ch/prosite>) durchgeführt.

2.6 Pflanzenmaterial

Für diese Arbeit wurden *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen sowie Zellkulturen aus deren Wurzelzellen verwendet.

2.6.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana Wildtyp *Columbia-0* (*Col-0*) sowie die transgenen Linien VHA-a1-GFP (Dettmer et al., 2006), ST-YFP/VHA-a1-GFP (Dettmer et al., 2006) und Ara7-GFP (Ueda et al., 2004) wurden auf Anzuchtmedium bei 22° C und 16 h Licht kultiviert. Nach 5 Tagen Wachstum wurden die Wurzeln für konfokal-mikroskopische Untersuchungen geerntet.

Anzuchtmedium: 0,5 g/l MES

4,3 g/l MS medium basal salt mixture (Duchefa Biochemie, Harlem, Niederlande; M0221.0050)
2 % (w/v) Saccharose
0,5 % Agar
In ddH₂O. pH 5,7 mit KOH eingestellt.

2.6.2 Kultivierung von Tabakpflanzen im Gewächshaus

Die Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* var. SR1 wurde im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 24° C) kultiviert.

2.6.3 Kultivierung von sterilen Tabakpflanzen *in vitro*

Als Ausgangsmaterial für die transiente Genexpression wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Ökotyp SR1) unter sterilen Bedingungen in einem klimatisierten Raum mit konstanten Bedingungen (16 h Licht, 25° C) in Gläsern der Firma Weck (Wehr) kultiviert. Die Anzuchtgläser wurden zuvor über Nacht bei 200° C sterilisiert.

Die Tabaksamen wurden vor der Aussaat in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml 12 %-iger Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert und ca. 15 min stark geschüttelt. Alle folgenden Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank. Die Tabaksamen wurden dreimal mit autoklaviertem ddH₂O gewaschen und danach auf festem MS-Medium ausgesät, und die Keimlinge nach zwei Wochen Wachstum und ausreichender Wurzelbildung in Aufzuchtgläser vereinzelt. Nach 6-8 Wochen wurden die Blätter dieser Tabakpflanzen zur Isolation von Protoplasten eingesetzt (siehe 2.10.1).

Die Tabakpflanzen konnten nach der Ernte der Blätter noch durch Sprossstecklinge vermehrt werden. Hierzu wurde die Sprossachse mit einem scharfen Skalpell kurz unterhalb der obersten beiden Blätter durchtrennt und die Blattstiele 2 mm oberhalb der Achselknospen entfernt. Die so entstandenen Stecklinge wurden mit einer Pinzette in das Nährmedium eines Anzuchtglases überführt und bis zur Blätternte 4-6 Wochen unter den oben genannten Bedingungen angezogen.

Anzuchtmedium: 0,5 g/l MES
 4,3 g/l MS Medium-Salzmixtur (aus Macro elements, Micro elements und Fe EDTA)
 2 % (w/v) Saccharose
 8 g/l Bacto-Agar
 In ddH₂O. pH 5,7 mit KOH eingestellt.

Macro elements (10x): 16,5 g/l NH₄NO₃

	19 g/l KNO ₃
	4,4 g/l CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	3,7 g/l MgSO ₄ * 7 H ₂ O
	1,7 g/l KH ₂ PO ₄
Micro elements (1000x):	8,6 g/l ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
	6,2 g/l H ₃ BO ₃
	16.9 g/l MnSO ₄ * H ₂ O
	0,025 g/l CuSO ₄ * 5 H ₂ O
	0,83 g/l KI
	0,025 g/l CoCl ₂ * 6 H ₂ O
	0,25 g/l Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O
Fe EDTA (100x):	2,85 g/l FeSO ₄ * 7 H ₂ O
	3,36 g/l Na ₂ EDTA

2.6.4 Zellkultur

Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in der Impfbank (HeraeusR HERA guard HPH12, Hanau). Die verwendeten Anzuchtgefäße und Kulturmedien wurden sterilautoklaviert.

2.6.4.1 *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur

Arabidopsis-Suspensionszellkultur (Ökotypen *Landsberg erecta* und *Col-0*) wurden bei 25 °C und 100 rpm in einem Orbitalschüttler (InnovaTM 4340, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) im Dunkeln kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte durch Zugabe von 5 g sieben Tage alter abgeseibter Zellen bzw. 5-10 ml Ursprungskultur in 100 ml frisches Medium. Nach drei Tagen Subkultivierung konnten die Zellen für die Protoplastierung verwendet werden.

Anzuchtmedium:	4,3 g/l MS medium basal salt mixture (Duchefa Biochemie, Harlem, Niederlande, M0221.0050)
	30 g/l Saccharose
	50 µg/l Kinetin (gelöst in DMSO)
	500 µg/l NAA (gelöst in 100 mM NaOH)
	In ddH ₂ O. pH 5,7 mit KOH eingestellt.
	Vor Benutzung Zugabe von Vitaminen (1:1000)
Vitamine (1000x):	0,4 mg/ml Thiamin
	100 mg/ml Myoinositol
	In ddH ₂ O. Sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C.

2.6.4.2 BY-2 Suspensionszellkultur

Die Kultivierung der Tabak Bright Yellow 2 (BY-2)-Suspensionszellkultur erfolgte im Dunkeln bei 25 °C und 100 rpm im oben genannten Orbitalschüttler in MS-Medium. Die Kulturen wurden wöchentlich in frischem Medium in einem Verdünnungsverhältnis von 1:50 subkultiviert. Für die Protoplastierung verwendete man drei Tage alte Subkulturen.

Anzuchtmedium: 4,3 g/l MS medium basal salt mixture (Duchefa Biochemie, Harlem, Niederlande, M0221.0050)

30 g/l Saccharose

0,2 mg/l 2,4 D

200 mg/l KH_2PO_4

In ddH_2O . pH 5,7 mit KOH eingestellt.

Vor Benutzung Zugabe von Vitaminen (1:1000)

Vitamine (1000x): 1 mg/ml Thiamin

100 mg/ml Myoinositol

In ddH_2O . Sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein zyklischer Prozess zur selektiven *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotidprimerpaare. Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze lag bei 50 µl mit 10 pmol Oligonukleotidprimern, 100 ng cDNA oder 1-10 ng Plasmid-DNA als Template, 0,2 mM je Nucleotid, 1 Einheit (1 u) der Phusion-DNA-Polymerase und entsprechendem PCR-Puffer (HF- oder GC-Puffer). Die PCR wurde in einem PTC-200 Peltier Thermocycler der Firma MJ Research (USA) durchgeführt, wobei ein „hot start“ verwendet wurde, bei dem die Polymerase erst zugegeben wird, wenn der PCR-Ansatz für ca. 3 min auf 98 °C erhitzt wurde. In dem dreistufigen Prozess der Polymerase-Kettenreaktion wird die zu vervielfältigende DNA denaturiert, sequenzspezifische Oligonukleotide lagern sich an und die Polymerase verlängert diese durch den Einbau von Desoxynukleotiden. Ein typischer Reaktionszyklus wurde 30-35 mal wiederholt:

Denaturierung des Templates: 30 s bei 98 °C

Anlagerung der Oligonukleotide: 30 s bei 45-60 °C

Kettenverlängerung: 15 s / 1 kb bei 72 °C

Die Zeit der Kettenverlängerung bei der Amplifikation ganzer Plasmide erhöhte sich auf 3 min. Zudem wurde dem Ansatz 1,5 % DMSO zur Stabilisierung der Plasmid-DNA zugeführt. Die Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotide wurde mit Hilfe folgender, vereinfachter Formel berechnet, wobei die Anzahl an bindenden Basen A, T, C und G erfasst wurden:

$$T_{\text{Anlagerung}} (\text{°C}) = (A + T) * 2 + (C + G) * 4$$

Nach der Reaktion wurde der PCR-Ansatz mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.7.2) analysiert und anschließend das PCR-Fragment aufgereinigt (siehe 2.7.3) und durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (siehe 2.7.4) die entsprechenden Schnittstellen zur Klonierung in einen Vektor hergestellt.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese mit 0,5-1 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer bei 100 V (analytische Gele bei 50 V) durchgeführt. Die DNA wurde mit im Gel enthaltenem Ethidiumbromid (0,5 µg/ml; analytische Gele mit 0,1 µg/ml) gefärbt und über das Geldokumentationssystem (Illuminator) durch UV-Licht detektiert und die Fragmentgröße der DNA mit Hilfe eines Markers (1 kb DNA ladder) erfasst. Die Proben wurden mit 4x Ladepuffer versetzt.

TBE-Puffer (5x): 54 g/l Tris
27,5 g/l Borsäure
20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
In ddH₂O.

Ladepuffer (4x): 24 % (w/v) Saccharose
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
40 mM EDTA
In ddH₂O.

2.7.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mit einer schwachen UV-Lampe detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde der „NucleoSpin Extract II“-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.7.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

DNA-Fragmente und Plasmid-DNA wurden durch Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 10-50 µl gespalten. Die Menge der eingesetzten Restriktionsendonukleasen richtete sich nach dem Gesamtvolumen und der DNA-Menge und lag zwischen 0,3 und 1 µl pro Ansatz. Die Temperatur und Dauer der Reaktion lag bei 37 °C und 60 min. Die optimalen Restriktionspuffer (RP) für die einzelnen Restriktionsendonukleasen sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgelistet. Wurde die Spaltung mit zwei Restriktionsendonukleasen gemacht, die nicht im selben Puffer ausreichend gut schneiden, wurden die Reaktionen zeitlich getrennt durchgeführt und in einem zusätzlichen Zwischenschritt die DNA wie unter 2.7.3 aufgereinigt. Auf die Spaltung durch Restriktionsendonukleasen folgte eine Aufreinigung (2.7.3).

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Restriktionsendonukleasen-Puffer (10x)

Komponenten	RP0	RP50	RP100	RP150
MgCl ₂	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Tris pH 8.0	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
DTT	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
BSA	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml
NaCl	0	0,5 M	1 M	1,5 M

Tabelle 2.3: Kompatibilität der Restriktionspuffer (RP)

Enzyme	RP0	RP50	RP100	RP150	Enzyme	RP0	RP50	RP100	RP150
BamHI	+	++	+++	+++	NheI	+++	+++	+++	++
BglII	++	+++	+++	+++	NotI	+	+++	+++	+++
Clal	+++	+++	+++	++	PstI	+++	+++	+++	+++
EcoRI	-	+++	+++	+++	PvuI	+	++	+++	+++
EcoRV	+	+	+	+++	SacI	+++	+++	++	+

HindIII	++	+++	+++	++	Sall	+	+	++	+++
KpnI	+++	+	+	+	SmaI	+	+	+	+
NcoI	+	++	+++	+++	StuI	+++	+++	+++	+++
NdeI	+	+	++	+++	XbaI	+	+++	+++	+++

Die Restriktionsendonuklease schneidet in dem jeweiligen Restriktionspuffer – nicht, + schlecht, ++ gut oder +++ sehr gut.

2.7.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religation eines linearisierten Vektors zu vermeiden, wurde dieser durch eine mit alkalische Phosphatase („calf intestinal alkaline phosphatase“, CIAP) katalysierte Reaktion dephosphoryliert. Diese Dephosphorylierung findet am 5'-Ende der DNA statt. Mit Restriktionsendonukleasen gespaltene und anschließend - wie in 2.7.3 beschrieben - aufgereinigte Vektoren wurden in einem Volumen von 40 µl in TE-Puffer eluiert und zur Dephosphorylierung 5 µl CIAP-Puffer (10x) und 5 µl CIAP (1 U/µl) hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 45 min und fand bei 37 °C statt. Anschließend wurde der Ansatz erneut aufgereinigt und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen, bevor er entweder direkt zur Ligation (siehe 2.7.6) verwendet oder bei -20 °C gelagert wurde.

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0
 0,1 mM EDTA
 In ddH₂O. Sterilfiltriert.

2.7.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zur Ligation verwendeten Vektoren und PCR-Fragmente wurden im mittels Gelelektrophorese ermittelten Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die T4-DNA-Ligase (1 U/µl) und der Ligationspuffer wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde in einem Volumen von 20 µl bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien (siehe 2.7.9) wurden 5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.7.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch eine Kombination der von Sanger (Sanger et al., 1977) vorgestellten Methode des Kettenabbruchs und der von Ronaghi (Ronaghi et al., 1996) entwickelten Methode des „Pyrosequencings“. Hierzu wurden

ca. 2 µg DNA durch Natriumperchlorat/Isopropanol-Fällung verwendet und danach getrocknet. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt und die Ergebnisse elektronisch übermittelt. Der Sequenzabgleich der aus der Sequenzierung erhaltenen Daten mit der mit Hilfe des BLAST-Programmes (Altschul et al., 1990) ermittelten *Arabidopsis*-Sequenz des jeweiligen Proteins wurde mit AlignX von Vector NTI (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

2.7.8 Anzucht von *Escherichia coli*-Kulturen

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium als Flüssigkulturen oder auf LB-Agarplatten zur Vereinzelung. Eine Selektion transformierter Bakterien wurde durch Zugabe von Ampicillin (150 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zum Medium erreicht. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C und für Flüssigkulturen bei 250 rpm im Zellkulturschüttler. Die optische Dichte (OD) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt.

LB-Medium: 5 g/l Hefeextrakt
10 g/l Trypton
10 g/l NaCl
In ddH₂O. Anschließend autoklaviert.

LB-Agar: LB-Medium
15 g/l Agar
Autoklaviert.

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlung des Medium auf ca. 50 °C.

2.7.9 Herstellung transformationskompetenter Bakterienstämme

Transformationskompetente Bakterienstämme sind Bakterien, die zur DNA-Aufnahme z. B. in Form von Plasmiden befähigt sind. Zur Herstellung wurde eine 200 ml 2x YT-Lösung mit einer 3 ml Vorkultur (OD_{600} von etwa 0,3) inokuliert und diese bei 37 °C und 250 rpm im Zellkulturschüttler inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,48-0,5 wurde das Bakterienwachstum auf Eis gestoppt und die Kultur in vier 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten in einem Kühlraum (4 °C) auf Eis mit vorgekühlten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.

Die Kultur wurde für 20 min im ausschwingenden Rotor bei 5000 g_{max} und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 80 ml TFBI resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in 8 ml TFBII aufgenommen. Nach 15 min Inkubation wurden jeweils 100 µl der Lösung in 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäße aliquotiert

und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

2x YT-Medium: 5 g/l NaCl
10 g/l Hefeextrakt
16 g/l Trypton
In ddH₂O. pH 7.0 mit NaOH eingestellt und autoklaviert.

TFBI: 10 mM CaCl₂·2 H₂O
30 mM KC₂H₃O₂
50 mM MnCl₂+4H₂O
100 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
In ddH₂O. pH 5.8 mit 0,2 M CH₃COOH eingestellt.
Sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C.

TFBII: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂·2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin
In ddH₂O. pH 6.6 mit 5 M KOH. Sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C.

2.7.10 Transformation transformationskompetenter Bakterienstämme von *E. coli*

Vor der Transformation wurden die kompetenten *E. coli* (2.7.9) für 15 min auf Eis aufgetaut. Danach wurde die zu transformierende DNA hinzugegeben und die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien erfolgte durch eine Hitzeschockbehandlung bei 37 °C. Nach 3 min wurden die Zellen entweder direkt auf LB-Agarplatten ausgestrichen oder nach Zugabe von 1 ml LB-Medium der Ansatz weitere 15 min bei 37 °C inkubiert und danach auf LB-Agarplatten nach einer Ligation verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Wärmeschrank.

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

2.8.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA zur Analyse des Klonierungserfolges bei der Herstellung der Konstruktionen wurde durch Mini-Präparation erreicht. *E. coli* wurden als 3 ml Kultur über Nacht - wie unter 2.7.8 beschrieben - angezogen. Die Hälfte der Übernachtskultur wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße über-

führt und bei 10000 g_{\max} für 2 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in 150 μ l TES-Puffer resuspendiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 μ l Lysozym-Lösung (10 mg/ml) eingeleitet, der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert und anschließend 300 μ l H_2O hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 72 °C wurden die Proben für 30 min bei 10000 g_{\max} zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die im Ansatz enthaltene DNA durch Zugabe von 30 μ l 5 M $NaClO_4$ und 400 μ l Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 g_{\max} wurde die DNA sedimentiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde danach in 50 μ l TE gelöst. Zur Analyse der Plasmid-DNA wurde diese mit Restriktionsendonukleasen (2.7.4) geschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.7.2) untersucht. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

TES-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0
5 mM EDTA
250 mM Saccharose
In ddH₂O. Sterilfiltriert.

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0
0,1 mM EDTA
In ddH₂O. Sterilfiltriert.

2.8.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Herstellung mittlerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das *NucleoBond-Kit PC100* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

2.8.3 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte ausgehend von einer 500 ml LB-Flüssigkultur, die für 24 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert wurde. Die Kultur wurde im SLA3000-Rotor einer Sorvall Zentrifuge bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment auf Eis in 8 ml gekühltem TE 50/1 Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach dem Überführen der Proben in SS34-Zentrifugationsgefäße wurden diese mit 2,5 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml in ddH₂O) versetzt, behutsam mindestens zehnmal invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 2 ml 0,5 M EDTA gestoppt und nach dem Mischen durch Invertieren erneut 5 min auf Eis inkubiert. Die Spaltung der im Ansatz enthaltenen Ribonukleinsäuren erfolgte durch Ribonuklease A. Hierzu wurden 50 μ l Ribonuklease A Lösung (20 mg/ml) mit 150 μ l 10 %-igem Triton X-100

(v/v) und 750 µl TE 50/1 gemischt und zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch Invertieren wurde der Ansatz für 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Ribonuklease-Behandlung folgte eine Zentrifugation bei 18000 rpm für 30 min mit ungebremstem Auslauf im SS34-Rotor. Der nun folgende Extraktionsschritt mittels Phenol entfernt quantitativ Proteine. Der klare Überstand wurde in 50 ml Falcon überführt und mit 20 ml equilibriertem Phenol (pH 8,0; 0,1 % Hydroxychinolin) versetzt und durch kräftiges Schütteln durchmischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 20 min erreicht. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Falcon transferiert und 1:1 mit Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein Corex-Zentrifugationsgefäß überführt und die DNA mit 10 % des Volumens 5 M NaClO₄ versetzt und mit Isopropanol (80 % des Volumens) gefällt. Die Sedimentation der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 rpm im HB6-Swing-Out-Rotor für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment getrocknet. Die erhaltene, getrocknete Plasmid-DNA wurde in 500 µl TE-Puffer bei 4 °C über Nacht resuspendiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

TE 50/1-Puffer: 50 mM Tris, pH 8,0

1mM EDTA pH 8,0

In ddH₂O. Sterilfiltriert.

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0

0,1 mM EDTA

In ddH₂O. Sterilfiltriert.

EDTA: 500 mM EDTA

In ddH₂O. pH 8,0 mit NaOH eingestellt. Autoklaviert.

2.9 Plasmidkonstruktionen

2.9.1 Klonierung der Retromeruntereinheiten

Durch Vergleiche der jeweiligen kodierenden Bereiche in *Arabidopsis thaliana* mit den homologen Sequenzen aus Hefen wurden die Vps5-Homologen SNX1, SNX2a und SNX2b identifiziert und anschließend kloniert. Dafür wurde der jeweilige kodierende Genabschnitt aus cDNA von drei Tage alten Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* als Matrize verwendet und mit degenerierten Desoxyoligonukleotiden (2.3) die jeweiligen Schnittstellen zur Klonierung in die Sequenz eingefügt. Das jeweilige Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (2.7.1) und nach Spaltung durch Restriktionsendonukleasen (2.7.4) in einen Expressionsvektor kloniert, der zuvor mit Rest-

riktionsendonukleasen gespalten und dephosphoryliert (2.7.5) worden war. Auf diese Art entstanden die Genkonstrukte SNX1, SNX2a und SNX2b (siehe Tabelle 2.4). Des Weiteren wurden Konstrukte der großen Retromeruntereinheit VPS26, VPS29 und VPS35 hergestellt (siehe Tabelle 2.4). Als Expressionsvektoren wurden der pUC-basierte pAmy-Expressionsvektor (Crofts et al., 1999), der Klonierungsvektor pGD5 mit einer NheI-Schnittstelle vor der Amylase-Sequenz und der pSN5 mit einer zusätzlichen Sall-Schnittstelle nach der Amylase-Sequenz verwendet. Alle mittels PCR amplifizierten Fragmente wurden zwischen den 35S-CMV-Promotor und den 3'nos-Terminator des Zielplasmids kloniert. SNX1 wurde in den Expressionsvektor pAmy kloniert und das entstandene Plasmid als pSN1 bezeichnet (Abb. 2.1). Als Zielplasmid für SNX2a wurde pSN5 mit den Klonierungsschnittstellen NheI/Sall verwendet (pSN13). SNX2b (pSN24) wurde in den Expressionsvektor pAmy kloniert; VPS26 (pSN2), VPS29 (pSN3) und VPS35 (pSN23) wurden in den Expressionsvektor pAmy (VPS26 und VPS35) oder pGD5 (VPS29) kloniert.

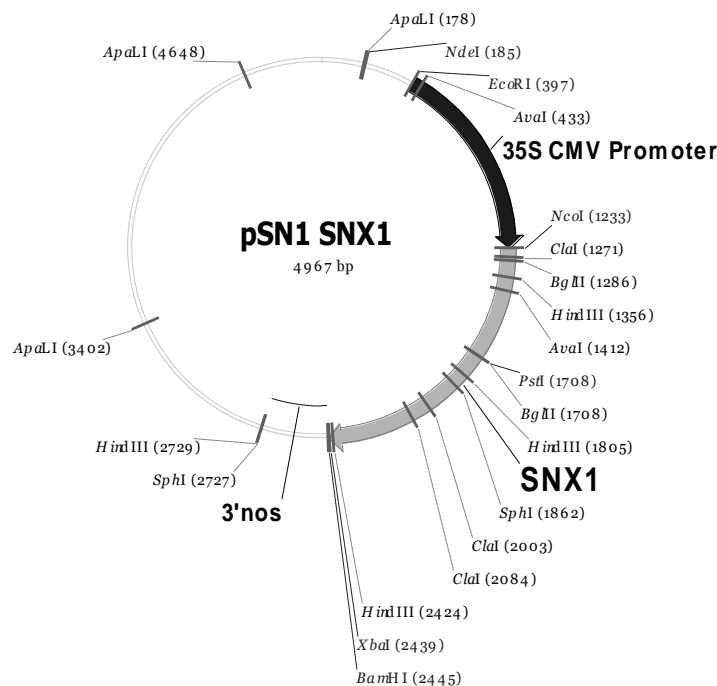


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pSN1 SNX1. Die mit den Klonierungsschnittstellen NcoI/XbaI inserierte SNX1-Sequenz wird von den 35S-CMV-Promotor und dem 3'nos-Terminator flankiert.

Zur Lokalisierung der Retromeruntereinheiten mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie wurden diese mit Sequenzen verschiedener fluoreszierender Proteine C-terminal fusioniert. Das SNX1-Genkonstrukt wurde mit Cerulean (Adgene, Cambridge, MA, USA), einer spektralen Variante des GFP (pSN18, Abb. 2.2) und mKate (evrogen, Moskau, Russland; rot fluoreszierendes Protein, pSN19), das SNX2a-Genkonstrukt mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) fusioniert und in den Expressionsvektor

pAmy (SNX1-XFP) bzw. pGD5 (SNX2a-GFP) kloniert. Des Weiteren wurde VPS29 mit Cerulean fusioniert und in den Vektor pGD5 kloniert (pSN25). Im Anschluss konnten die so entstandenen Konstrukte transient in Protoplasten exprimiert und mit Hilfe des CLSM analysiert werden.

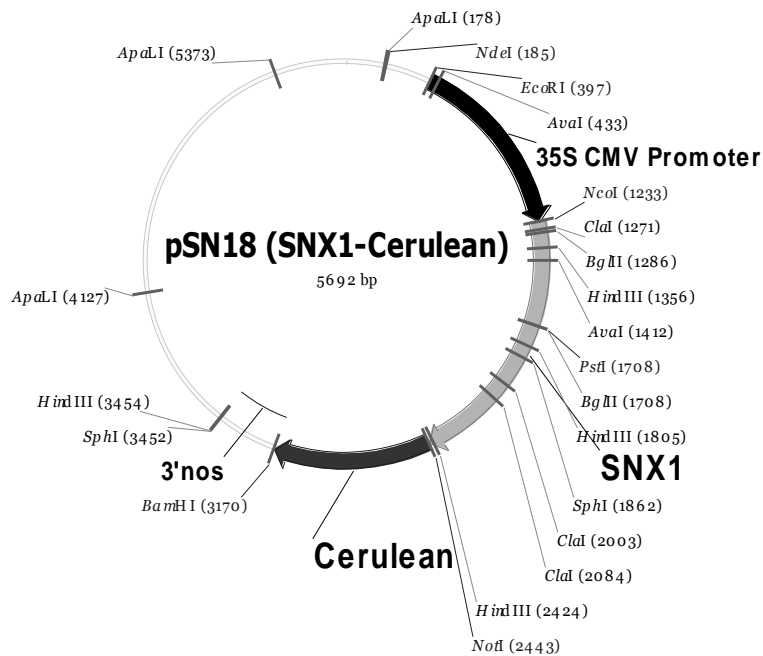


Abb. 2.2: Karte von pSN18 SNX1-Cerulean. Die Cerulean-Sequenz sitzt nach dem SNX1-Fragment.

Tabelle 2.4: Auflistung der hergestellten Plasmidkonstruktionen

Gen	Gene-Accession-Nummer	Konstrukte
SNX1	NM_120696	SNX1
		SNX1-Cerulean
		SNX1-mKate
SNX2a	NM_125230	SNX2a
		SNX2a-GFP
SNX2b	NM_120794	SNX2b
VPS26	NP_200165	VPS26
VPS29	NP_974400	VPS29
		VPS29-Cerulean
VPS35c	NP_190699	VPS35

2.9.2 Herstellung der SNX-Mutanten

Zur Untersuchung der Beteiligung der Sorting Nexine am Retromer-vermittelten Protein-Transport wurden Δ CC- und Δ N-Mutanten der Sorting Nexine SNX1 und SNX2a hergestellt. SNX1- Δ CC (pSN14) und SNX1- Δ N (pSN15) wurden mit den in Tabelle 2.1 genannten Oligonukleotidsequenzen mittels PCR von dem Plasmid pSN1 amplifiziert, mit NcoI und BamHI geschnitten und in den pAmy-Plasmid kloniert. SNX2a- Δ CC (pSN6) und SNX2a- Δ N (pSN7) wurde mit den in Tabelle 2.1 genannten Oligonukleotidsequenzen mittels PCR von dem Plasmid pSN1 amplifiziert mit NheI und BamHI geschnitten und in den pAmy-Plasmid kloniert.

2.9.3 Herstellung eines RNAi-Konstrukts

Zur Herstellung des RNAi-Konstrukts wurde der Bereich der ersten CC-Domäne von SNX2a mittels PCR direkt und revers-komplementär amplifiziert. Als „Loop“ wurde die „hairpin“-Sequenz des Vektors pHannibal (Abb. 2.3) verwendet, der ebenfalls mittels PCR amplifiziert wurde. Die so entstandenen drei Fragmente wurden in der Reihenfolge SNX2aCC, „Loop“ und SNX2aCCrc mit den Schnittstellen NheI/NcoI/NotI/BglIII in den pAmy-Vektor kloniert und als pSN22 SNXCCRNAi (Abb. 2.3) bezeichnet.

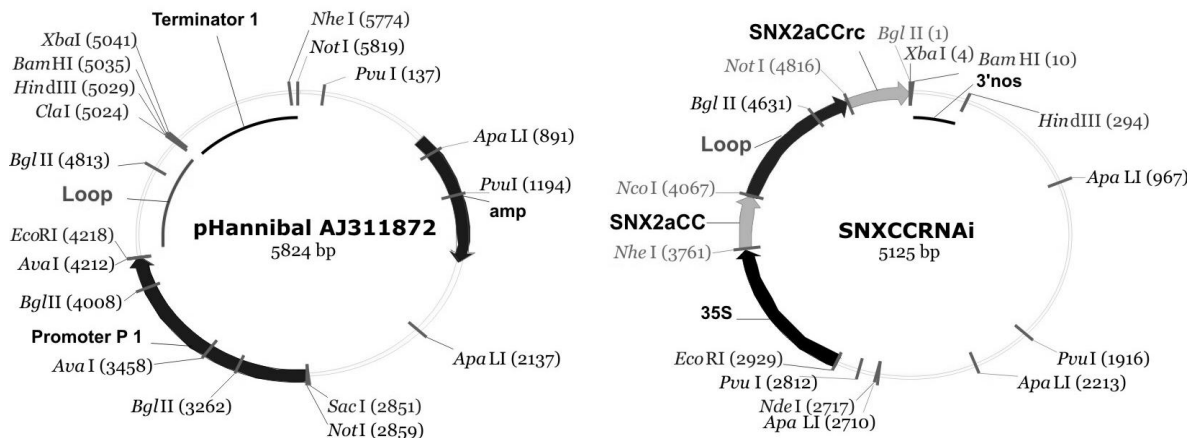


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Vektoren pHannibal und SNX2aRNAi. A Vektor pHannibal (Watson et al., 2005) mit Promotor, „Loop“ und Terminator, sowie der Ampicillin-Resistenzkassette B Vektor pSN22 (SNXCCRNAi) mit der mit den Klonierungsschnittstellen NheI/NcoI/NotI/BglIII inserierten SNX2aCC/Loop/SNX2aCCrc-Sequenz, die von dem 35S-CMV-Promotor und dem 3'nos-Terminator flankiert ist.

2.9.4 Klonierung der BP80-CNX-Konstrukte

Die BP80-CNX-Konstrukte wurden von Mathias Labs und Falco Krüger im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit hergestellt. Für die Konstruktion von BP80-CNX (pML1) wurde der Vektor GFP-CNX (daSilva et al., 2005) mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BglII geschnitten. Der 35S-CMV-Promotor wurde mit EcoRI und NheI aus dem Vektor SNX2aM1 (pSN6, Niemes et al., 2009) geschnitten. Die luminaire Bindungsdomäne von BP80 wurde von Wildtyp BP80 (daSilva et al., 2005) amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen NheI und BglII geschnitten. Durch Ligation der entstandenen Fragmente erhielt man das BP80-CNX-Konstrukt.

Zur Lokalisierung wurde BP80-CNX mit verschiedenen Fluorophoren C-terminal fusioniert. Das BP80-CNX-Genkonstrukt wurde mit Cerulean und mKate fusioniert. Hierzu wurde das Fragment BP80-CNX mittels PCR von pML1 amplifiziert und in die zuvor mit NheI und NotI geschnittenen Vektoren pSN18 (Niemes et al., 2009) bzw. pIC3 (Langhans et al., 2009) ligiert.

2.9.5 Klonierung des BP80FL-Cerulean-Konstrukts

Das BP80FL-Konstrukt (pML2) wurde von Mathias Labs im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit hergestellt. Das Zielplasmid aus pSN18 wurde mit EcoRI und NotI geschnitten und das BP80-Fragment mit Hilfe von EcoRI und NotI aus Wildtyp BP80 (daSilva et al., 2005) erhalten und in das Zielplasmid kloniert.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Herstellung von Protoplasten aus Tabakblättern

Die Isolierung von Mesophyll-Protoplasten aus Tabakblätter erfolgte unter sterilen Bedingungen mit 6-8 Wochen alten steril kultivierten Tabakpflanzen (2.6.3). 5 ml einer aliquotierten und bei -80 °C gelagerten 10x Enzymlösung wurde in TEX-Puffer 1:10 verdünnt und auf 7 Petrischalen verteilt.

Zur Protoplastierung geeignete Blätter weisen eine hellgrüne Farbe und ein geflecktes Muster auf und sind oval. Die Blätter wurden mit einem Skalpell abgetrennt und in eine Petrischale zur Weiterverarbeitung gegeben. Die Blattunterseite wurde mit einem speziell gefertigten Stößel mit Nadelspitzen penetriert, um es der Enzymlösung zu ermöglichen bis zu den Mesophyllzellen des Blattes vorzudringen. Nach Entfernen der Hauptleitgewebe des Blattes mit dem Skalpell wurden die beiden Blatthälften mit der Unterseite auf die verdünnte Enzymlösung gelegt.

Nach 16-20 h Inkubation bei 25 °C bei Dunkelheit wurden die Petrischalen vorsichtig geschwenkt und weitere 30 min inkubiert, um die Protoplasten aus den Blattresten herauszulösen. Der gesamte Ansatz wurde nun mit einem zuvor mit Elektroporationspuffer benetzten Nylonfilter mit einer Maschenweite von 100 µm filtriert. Nach 20 min Zentrifugation bei 700 rpm mit ungebremsten Auslauf im ausschwingenden Rotor (Heraeus Zentrifuge) bildeten die lebenden Protoplasten eine flotierende Phase und Zelltrümmer und Medium konnten mit einer peristaltischen Pumpe mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen werden. Nach zweimaligem erneutem Waschen mit Elektroporationspuffer wurde die Zelldichte auf ca. $4 \cdot 10^6$ pro ml eingestellt.

- Enzymlösung (10x): 2 % (w/v) Macerozyme R10 (Yakult, Japan)
4 % (w/v) Zellulase R10 (Yakult, Japan)
In TEX-Puffer ca. 30 min resuspendiert, danach steril
filtriert. Aliquots á 5 ml bei -80 °C gelagert.
- TEX-Puffer: 3,2 g/l Gamborg B5 Salze
500 mg/l MES
750 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
250 mg/l NH_4NO_3
0,4 M Saccharose
In ddH₂O. pH 5,7 mit KOH eingestellt. Das genaue Volumen wurde in einem Schlankhalskolben abgemessen. Steril filtriert.
- Elektroporationspuffer: 2,4 g/l HEPES
6 g/l KCl
600 mg/l CaCl_2
0,4 M Saccharose
In ddH₂O. pH 7,2 mit KOH eingestellt. Das genaue Volumen wurde in einem Schlankhalskolben abgemessen. Steril filtriert.

2.10.2 Herstellung von Protoplasten aus Suspensionskulturzellen

Protoplasten aus BY2-Suspensionskulturen oder *Arabidopsis*-Suspensionskulturen wurden bis auf die folgenden Abweichungen - wie unter 2.10.1 beschrieben - hergestellt. 50 ml der Suspensionskultur wurde in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und 3 min bei 700 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit in TEX-Puffer verdünnter Enzymlösung aufgenommen. Die Inkubation erfolgte bei 25° C in Dunkelheit für 16 h. Anschließend wurden die Petrischalen bei 50 rpm für

10 min geschüttelt und danach zentrifugiert. Die folgenden Waschschrirte wurden wie unter 2.10.1 beschrieben durchgeföhrt.

2.10.3 Transformation von Protoplasten durch Elektroporation

Pro Transformation wurden 500 μl der gewonnenen, konzentrierten Protoplasten (aus 2.10.1 oder 2.10.2) in sterile Plastikküvetten überföhrt. Um Scherkräfte zu vermeiden wurde hierzu eine abgeschnittene Pipettenspitze verwendet. Zu jedem Ansatz wurden 1-90 μg in 100 μl Elektroporationspuffer verdünnte DNA hinzugegeben und die Suspension durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden die Ansätze erneut aufgeschüttelt und danach die Elektroporation mit 1000 μF und 160 V mit Hilfe des Gene-Pulsers durchgeföhrt. Zwischen den Elektroporation wurde die Elektrode in ddH_2O gereinigt, mit Ethanol abgeflammt und in Elektroporationspuffer abgeköhlt. Die elektroporierten Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5 cm überföhrt und die Küvetten zweimal mit 1 ml TEX-Puffer gespült. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen 6-24 Stunden bei 25 °C bei Dunkelheit inkubiert.

2.10.4 Ernten der Protoplasten und des Mediums

Für die Messung enzymatischer Aktivitäten und für die Immundetektion, die eine Trennung von Medium und Zellen erforderten, wurden die Protoplasten wie folgt geerntet. Die Ansätze wurden in 10 ml Reaktionsgefäße überföhrt und bei 100 g_{max} (Megafuge 1.0R, Heraeus) für 5 min mit ungebremstem Auslauf zentrifugiert. Dadurch wurden die flotierenden, intakten Protoplasten von dem Kulturmedium und von den abgestorbenen, sedimentierten Protoplasten getrennt. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wurde vorsichtig eine Öffnung in die Schicht der flotierenden Protoplasten geblasen und sofort mit der Pasteurpipette durchstoehen, ca. 1 ml Medium abgesaugt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis überföhrt. Das Medium wurde sofort in einer geköhltten Eppendorf-Zentrifuge bei 14000 rpm abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und auf Eis gelagert. Die verbleibende Zellsuspension wurde mit 250 mM NaCl auf 10 ml aufgefüllt, das Sediment gelöst und bei 100 g_{max} für 3 min zentrifugiert. Aufgrund der hohen Salzkonzentration wurden nun alle Protoplasten sedimentiert. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt und die Zellsedimente bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C eingefroren.

2.10.5 Messung der enzymatischen Aktivität

Die Messung der α -Amylase-Aktivität wurde mit Hilfe des *Cereal α -amylase assay* (Magazyme, Bray, Irland) im Medium und in den Zellextrakten durchgeführt. Das hierbei eingesetzte Substrat p-Nitrophenol-Maltoheptaosid (BPNPG7) wird durch α -Amylase-Aktivität hydrolysiert, und das dabei entstandene p-Nitrophenyl-Maltosaccharid wird durch Glucoamylase und α -Glucosidase in Glucose und p-Nitrophenol gespalten. Die Konzentration des freigesetzten p-Nitrophenol kann photometrisch bei 405 nm bestimmt werden. Dadurch können Rückschlüsse auf die Menge an α -Amylase in der jeweiligen Probe gezogen werden.

Die gemäß Kapitel 2.10.4 hergestellten Medien- und Zellproben wurden mit Amylase-Extraktionspuffer verdünnt. Die Zellen wurden mit einem kurzen Ultraschallimpuls homogenisiert und die Zelltrümmer für 10 min bei 20000 g_{\max} und 4 °C sedimentiert. Ein Teil des klaren Überstandes wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Messung der α -Amylaseaktivität wurden 30 μ l des verdünnten Mediums oder 30 μ l des klaren Überstandes der Zellen 1:1 mit Substratlösung versetzt, durch Auf-und-ab-Pipettieren gemischt und bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20-60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μ l einer 1 %igen (w/v) Tris-Lösung durch Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich gestoppt. Die Extinktion der Proben wurde in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Spektralphotometers (Biorad Benchmark Platereader) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

α -Amylase-Extraktionspuffer:	50 mM Maleinsäure 50 mM NaCl 80 mM NaOH 2 mM CaCl_2 0,005 % (w/v) Natriumazid In ddH ₂ O. pH 5,7 mit HCl eingestellt.
Substratlösung:	54,5 mg/ml p-Nitrophenylmaltoheptaosid (geblockt) 100 U Glucoamylase, pH 5,2 100 U α -Glucosidase, pH 5,2 In 10 ml ddH ₂ O.

2.11 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Ammoniumsulfat-Fällung von Proteinen

Diese Art der Fällung erlaubt eine schonende Behandlung der Proteine. Zu 600 µl einer Proteinlösung wurden 20 µl BSA (10 mg/ml) zugegeben, gut gemischt und 900 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzugefügt. Danach folgte eine Inkubation auf Eis für mindestens eine Stunde. Die Lösung wurde bei 20000 g_{max} und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5417R, Hamburg) für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und nach erneuter Zentrifugation für 2 min das Präzipitat in 60 µl Phaseolin-Extraktionspuffer resuspendiert und 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt.

Phaseolin-Extraktionspuffer: 100 mM Tris pH 7,8
200 mM NaCl
1 mM EDTA
2 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,2 % (v/v) TritonX-100
In ddH₂O.

SDS-Probenpuffer: 900 µl Probenpuffer
300 µl 10 % (w/v) SDS
18 µl 1 M DTT

Probenpuffer: 0,1 (w/v) Bromphenolblau
5 mM EDTA
1 M Sucrose
200 mM Tris-HCl pH 8,8
In ddH₂O.

2.11.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden in einem 5 %-igen Sammelgel (siehe Tabelle 2.5) fokosiert und danach in einem 10-12 %-igen Trenngel (siehe Tabelle 2.6) aufgetrennt. Die verwendeten Proteinproben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer (siehe 2.11.1) aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Herstellung der Gele

Die Lösung für das Trenngel wurde gemischt, gegossen und mit Isopropanol überschichtet und nach der Polymerisierung das Isopropanol mit ddH₂O entfernt. Nach Zugabe des Sammelgels wurde der Kamm zur Formung der Probenfächer zwi-

schen die Glasplatten eingeführt. Nach Polymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und 10-15 µl der Proben mit einer Hamilton-Spritze pro Geltasche aufgetragen. Die molekulare Masse der Proteine wurde mit Hilfe des Molekularmassenmarkers (Pageuler Protein ladder, SMO671, Fermentas) ermittelt. Die Elektrophorese wurde in selbst konstruierten Gelapparaturen bei 180 V und 40-60 mA in einfachem Laufpuffer durchgeführt. Die Angaben in den folgenden Tabellen gelten für ein Gel der Größe 200x100x2 mm.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel [%]	10	12
ddH ₂ O	11,5 ml	10 ml
3 M Tris, pH 8,8	3,2 ml	3,2 ml
Protogel	7,5 ml	9 ml
10 % (w/v) SDS	225 µl	225 µl
TEMED	12,5 µl	12,5 µl
10 % (w/v) APS	75 µl	75 µl
Gesamtvolumen	22,5 ml	22,5 ml

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel [%]	5
20 % (w/v) Saccharose in ddH ₂ O	11,3 ml
1 M Tris, pH 6,8	1 ml
Protogel	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl
TEMED	30 µl
10 % (w/v) APS	50 µl
Gesamtvolumen	15 ml

Protogel: 30 % (w/v) Acrylamid
 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
 In ddH₂O.
Laufpuffer (5x): 5 g/l SDS
 30 g/l Tris
 144 g/l Glycin
 In ddH₂O.

2.11.3 Westernblot-Analyse (Immunoblot)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Pall, Dreieich) übertragen. Hierzu wurde die Membran und Whatman-Papier nach Größe des Gels zugeschnitten, in Transferpuffer äquilibriert und in das „Semidry Blotting“-System von Bio-Rad in folgender Reihenfolge von unten nach oben gegeben: 5 Schichten Whatman-Papier, Membran, Gel, 5 Schichten Whatman-Papier. Der Proteintransfer erfolgte bei 200 mA für 2 h.

Die folgenden Inkubations- und Waschschrte wurden auf einer Laborwippe ausgeführt. Nach dem elektrophoretischen Proteintransfer wurden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran für 5 min in Ponceau-Lösung gefärbt. Die Membran wurde mit ddH₂O gewaschen, um unspezifische Färbungen zu entfernen. Die Ponceau-Färbung dient sowohl der Kontrolle des Proteintransfers als auch der Fixierung der Proteine an der Membran. Zur vollständigen Entfärbung der Membran wurde diese mehrmals bis TBS-T gewaschen und anschließend einmal in TBS gewaschen. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindung während des Immunnachweises wurde die Nitrocellulosemembran 1 h in Blocklösung inkubiert. Nachdem die Membran in TBS-T dreimal und einmal in TBS für 5 - 10 min gewaschen worden war, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem in Antikörperlösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran mindestens dreimal für 5-10 min in TBS-T und einmal in TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper gegen Kaninchen oder Meerschweinchen (1:15000 verdünnt in Blocklösung) erfolgte für 1 h Stunde. Danach wurde die Membran erneut in TBS-T und TBS gewaschen.

Die Proteine wurden durch ein ECL-Detektionsverfahren auf Röntgenfilm nachgewiesen. Dazu wurden ECL-Lösung I und ECL-Lösung II nach dem Ansetzen gemischt und direkt danach die Nitrocellulosemembran in diesem Ansatz für 1 min inkubiert. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Rönt-

genfilm-Kassette fixiert. In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm je nach Signalstärke 30 sec bis 1 h mit der Membran belichtet und anschließend mit einem AGFA Filmentwickler entwickelt. Die Nitrocellulosemembran konnte getrocknet und aufbewahrt werden.

Transferpuffer:	25 mM Tris 50 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol In ddH ₂ O.
Ponceau-Lösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) Trichloressigsäure In ddH ₂ O.
TBS:	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 0,9 % (w/v) NaCl In ddH ₂ O.
TBS-T:	1 % (v/v) Tween20 in TBS.
Blocklösung:	5 % (w/v) Milchpulver 1 % (w/v) BSA In TBS.
Verdünnungslösung für Antikörper:	1 % (w/v) TBS 0,2 % (w/v) BSA 0,2 % (w/v) NaN ₃ In ddH ₂ O.
ECL-Lösung I:	50 µl 90 mM p-Coumarsiure in DMSO 100 µl 250 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazid in DMSO) 1 ml 1 M Tris, pH 8,5 In 10 ml ddH ₂ O.
ECL-Lösung II:	6 µl 30 % (w/v) H ₂ O ₂ 1 ml 1 M Tris, pH 8,5 In 10 ml ddH ₂ O.

2.12 Immunmarkierung

2.12.1 Immunmarkierung von *Arabidopsis thaliana*

Wurzeln fünf Tage alter *Arabidopsis thaliana*-Linien wurden geerntet und in MTSB („microtubules stabilizing buffer“) versetzt mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd ü.N. bei 4

°C fixiert. Die Wurzeln wurden in MTSB mit 0,1 % Triton-X100 dreimal gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellwand wurden die Proben mit 2 % (w/v) Driselase in ddH₂O für 1 h bei 28 °C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in MTSB versetzt mit 0,1 % Triton-X100 folgte die Permeabilisierung der Plasmamembran in MTSB versetzt mit 10 % DMSO / 3 % NP40. Danach wurden die Proben erneut dreimal in MTSB versetzt mit 0,1 % Triton-X100 gewaschen und dann in Blocklösung für 1 h inkubiert. Mit Primärantikörper 1:50 - 1:250 in PBS („phosphate-buffered saline“) verdünnt, wurden die Proben über Nacht bei 4 °C inkubiert und danach erneut wie oben beschrieben gewaschen. Der Sekundärantikörper (2.4.3) wurde 1:100 in PBS verdünnt und die Proben 3 h bei RT darin inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit in MTSB versetzt mit 0,1 % Triton-X100 konnten die Proben am CLSM (2.13.2) analysiert werden.

MTSB: 50 mM PIPES
 5 mM EGTA
 5 mM MgSO₄
 In ddH₂O. pH 6,9 mit KOH eingestellt.

Blocklösung: 5% (w/v) BSA
 2,5% (w/v) Goat serum
 0,1% (v/v) Fischgelatine
 In 1x PBS.

2.12.2 Immunmarkierung von BY2-Suspensionskulturen

Für Immunmarkierungen wurden drei Tage alte BY-2 Suspensionskulturen benutzt. Dabei wurden neben dem Wildtyp auch stabil-transformierte BY-2-Zelllinien verwendet (GONST1-YFP, sGFP-BP80 und SCAMP1-YFP).

Die Fixierung der Zellsuspension wurde entweder durch Inkubation in 1,5 % Paraformaldehyd in PB (Sörensen Phosphatpuffer) ü.N. bei 4 °C oder alternativ mit 1 % Glutaraldehyd im Endvolumen für 15 min fixiert. Nach der Fixierphase wurden die Zellen mit Anzuchtmedium (2.6.4.2) zweimal 15 min und noch einmal mit PBS für 15 min gewaschen. Die Inkubation der Zellen in PBS versetzt mit 0,1% NaBH₄ für mindestens 2 h dient der Permeabilisierung der Zellwand und der Reduktion der Aldehydgruppen und damit der durch Glutaraldehyd hervorgerufenen Autofluoreszenz. Für die Mazeration der Zellwand störendes NaBH₄ wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Für 1 h wurden die Zellen in PBS versetzt mit 0,1 % Pectolyase Y23/ 1 % Cellulase bei 28°C inkubiert. Danach folgte ein Waschen für 15 min in PBS und anschließendes Blocken von 30 min.

Die Zellen wurden über Nacht im Dunkeln bei 4 °C mit dem Primärantikörper 1:50 - 1:200 in PBS verdünnt inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurde die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (2.4.3) 1:200 in PBS verdünnt für 3 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit TBS („Tris-buffered saline“) gewaschen und danach am CLSM (2.13.2) analysiert. Die Zellen können für einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

PBS: 2 g/l KH_2PO_4
22,5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
87 g/l NaCl
In ddH₂O. pH 7,4 einstellen.

2.12.3 Immunmarkierung von BY2-Suspensionskulturen (abgewandeltes Protokoll)

Eine drei Tage alte BY2-Suspensionskultur wurde mit 1 % Glutaraldehyd in Anzuchtmedium (2.6.4.2) für 15 min bei RT fixiert und anschließend 3 mal mit Anzuchtmedium gewaschen. Die enzymatische Behandlung mit 0,1 % Pectinase und 1 % Cellulase in Anzuchtmedium erfolgte für 1 h bei 28 °C. Die Zellen wurden in 10 ml frisch hergestelltes PBS mit 0,1 % NaBH_4 überführt und ü.N. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Nach dreimaligen Waschen und 30-minütigen Blocken mit Blockpuffer 1 wurde der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit Blockpuffer 2 gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht im Dunkeln bei 4 °C mit dem Primärantikörper 1:50 - 1:200 in Blockpuffer 2 verdünnt inkubiert. Nach dreimaligen Waschen und 30-minütigen Blocken mit Blockpuffer 2 wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (2.4.3) 1:200 in Blockpuffer 2 inkubiert für 1 h bei Raumtemperatur verdünnt. Die Zellen wurden dreimal mit Blockpuffer 2 gewaschen und danach am CLSM (2.13.2) analysiert. Die Zellen können für einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

PBS: 2 g/l KH_2PO_4
22,5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
87 g/l NaCl
In ddH₂O. pH 7,4 einstellen.

Blockpuffer 1: 1 % BSA in PBS
Sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C.

Blockpuffer 2: 0,25 % (w/v) BSA
0,25 % (w/v) Gelatine

0,05 % (w/v) NP-40 (IGEPAL CA-630)

0,02 % (w/v) Azid

In 1x PBS. Sterilfiltriert. Lagerung bei 4 °C.

2.13 Konfokale Mikroskopie

2.13.1 Probenvorbereitung

Die Protoplasten aus Tabakblättern, BY2- und *Arabidopsis*-Suspensionskulturen wurden 6-24 Stunden nach Transformation (2.10.3) geerntet, indem sie in ein 15 ml Röhrchen überführt wurden. Nach wenigen Minuten flotierten die Protoplasten, und es wurden ca. 50 µl der Protoplastensuspension auf einen speziell vorbereiteten Objektträger gegeben. Diese Objektträger wurden mit einem Stück Isolierband beklebt und ein 10 x 15 mm großes Rechteck herausgeschnitten. Das Isolierband diente somit als Abstandhalter zwischen Deckglas (24 x 32 mm) und Objektträger für die empfindlichen Protoplasten.

Nach der Immunmarkierung stabil-transformierter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (2.12.1) wurden diese direkt auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. BY2-Zellen wurden nach der Immunmarkierung (2.12.2, 2.12.3) direkt aus dem Flüssigmedium auf einen wie oben beschrieben hergestellten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.13.2 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Die Proben wurden an einem inversen konfokalen Mikroskop (Zeiss Axiovert LSM510 Meta CLSM) untersucht. Die Protoplasten wurden zunächst mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe nach Transformanten, BY2-Zellen und *Arabidopsis*-Pflanzen auf ausreichende Fluoreszenz der Markerproteine sowie der Signale der Immunmarkierung mit Alexa-Fluor® untersucht. Die Aufnahmen wurden anschließend mit Lasern verschiedener Wellenlängen (siehe Tabelle 2.7) mit Bedingungen gemäß der zu untersuchenden Molekülen angefertigt. Hierzu wurde das C-apochromatische 63/1,2 Wasser-korrigierte Objektiv verwendet. Der optimale Fluoreszenzbereich der einzelnen fluoreszierenden Proteine wurde mittels Wellenlängen-Scans („Lambda-Scans“) über das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts von 400 – 750 nm unter verschiedenen Anregungswellenlängen ermittelt (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: CLSM-Bedingungen zur Detektion der jeweiligen fluoreszierenden Proteine und Alexa®-Farbstoffe.

	Lasert	Anregungs- wellenlänge [nm]	Emissions- maxima [nm]	Metadetektor (Emission) [nm]
GFP	Argon	488	507	496 – 518
RFP	Helium/Neon1	543	603	593 – 636
YFP	Argon	514	529	529 – 550
mKate	Helium/Neon1	543	636	625 – 646
ceruleanFP	Argon	458	475	464 - 486
Alexa-Fluor® 405	Argon	405	422	411 - 454
Alexa-Fluor® 568	Argon	568	603	593 - 636
Alexa-Fluor® 488	Argon	488	520	496 - 529
Alexa-Fluor® 546	Helium/Neon1	546	572	561 - 614

Bei Koexpressionsstudien verschiedener fluoreszierenden Proteine und Alexa-Fluor® wurde die Fluoreszenz mittels des Metadetektors durchgeführt. Dabei wurden die Hauptfarbteiler (HFT) 405/514, 458/514 und 488/543 - wie in Tabelle 2.8 angegeben - verwendet. Die fluoreszierenden Proteine und/oder sekundäre Antikörper wurden abwechselnd mit dem „Multi-tracking“-Modus des Mikroskops angeregt. Die „Pinholes“ wurden an 1 Airy Unit für jede Wellenlänge (102 µm, 108 µm, 115 µm, 121µm, 131 µm, 138 µm) angepasst. Die Leistung der Laser wurde bei allen Proben des jeweiligen Experiments auf gleichem Niveau gehalten. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der Programme Zeiss LSM 510 Image Browser (Version 4.2.0.121) und CorelDrawX4 (Version 14.0.0.653).

Tabelle 2.8: Farbteiler für Koexpressionsstudien.

	Hauptfarbteiler [nm]
GFP/RFP	488/543
GFP/mKate	488/543
GFP/YFP	488/543 // 458/514
YFP/RFP	458/514 // 488/543
YFP/mKate	458/514 // 488/543
Cerulean/GFP/RFP	458/514 // 488/543
GFP/Alexa546	488/543
YFP/Alexa546	458/514 // 488/543
GFP/Alexa546/Alexa405	405/514 // 488/543
YFP/Alexa546/Alexa405	405/514 // 488/543

Verwendete fluoreszierende Markerproteine:

- aleurain-GFP (Humair et al., 2001)
- ARA6-GFP (Ueda et al., 2001)
- ARA6-RFP (Ueda et al., 2004)
- GFP-BP80 (daSilva et al., 2005)
- GFP-HDEL (Brandizzi et al., 2003)
- GFP-sporamin (daSilva et al., 2005)
- Man1-RFP (Nebenfuehr et al., 1999)
- Man1-GFP (Nebenfuehr et al., 1999)
- p24-RFP (Langhans et al., 2008)
- RTLN-mKate (pIC3, Langhans et al., 2009)
- ST-YFP (Brandizzi et al., 2002)
- YFP-SYP61 (Dettmer et al., 2006)

Verwendete stabil-transformierte *Arabidopsis thaliana*-Linien:

- ARA7-GFP (Ueda et al., 2004)
- ST-YFP/VHA-a1-GFP (Dettmer et al., 2006)
- VHA-a1-GFP (Dettmer et al., 2006)

Verwendete stabil-transformierte BY2-Zelllinien:

- GFP-BP80 (Tse et al., 2004)
- GONST1-YFP (Tse et al., 2004)
- SCAMP1-YFP (Lam et al., 2007a)

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation und strukturelle Charakterisierung der kleinen Retromeruntereinheit

Dem Retromer wird eine Beteiligung am Rezyklieren von vakuolären Sortierungsrezeptoren zugeschrieben. Der Retromerkomplex in Hefen besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die große heterotetramere Untereinheit besteht aus den vakuolären Proteinsortierungs-Proteinen Vps26p, Vps29p und Vps35p, die kleine heterodimere Untereinheit setzt sich aus Vps5 und Vps17 zusammen (Seaman, 2004).

Während in Pflanzen Homologe der Proteine der großen Untereinheit bereits identifiziert wurden (Oliviusson et al., 2006), konnte bisher noch nicht geklärt werden, welche Proteine die kleine Untereinheit repräsentieren. Eine Sequenzanalyse in der *Arabidopsis*-Genom-Datenbank ergab, dass für Vps17p kein Sequenzhomolog existiert, für Vps5p jedoch drei homologe Sequenzen vorliegen (Oliviusson et al., 2006). Die drei Vps5-Homologen in Pflanzen sind die Sorting Nexine SNX1, SNX2a und SNX2b. Während SNX2a und SNX2b in ihren Nukleotidsequenzen zu 79 % und in ihren Proteinsequenzen zu 83 % homolog sind, ähneln sie SNX1 nur zu 33-39 % (siehe Tabellen 3.1 und 3.2). Aus Tabelle 3.2 geht hervor, dass die pflanzlichen Sorting Nexine in ihren Proteinsequenzen ähnlicher sind zu den Sorting Nexinen der Säugetiere als zu dem Vps5-Homolog der Hefen.

Tabelle 3.1: Vergleich der Nukleotidsequenzen der Sorting Nexine

[%]	SNX1	SNX2a	SNX2b
SNX1	100	36	39
SNX2a	-	100	79

Tabelle 3.2: Vergleich der Homologie der Proteinsequenzen der Vps5-Homologen

[%]	SNX1 (Pflanzen)	SNX2a (Pflanzen)	SNX2b (Pflanzen)	Vps5p (Hefen)	SNX1a (Säuger)	SNX2 (Säuger)
SNX1 (Pflanzen)	100	33	36	18	41	42
SNX2a (Pflanzen)	-	100	83	13	31	35
SNX2b (Pflanzen)	-	-	100	13	31	37
Vps5p (Hefen)	-	-	-	100	20	20
SNX1a (Säuger)	-	-	-	-	100	69
SNX2 (Säuger)	-	-	-	-	-	100

Der deutliche Unterschied zwischen SNX1 und SNX2 kommt durch den längeren N-Terminus der SNX2 zustande (siehe Abb. 3.1). Mit dem Programm PROSITE (Expasy) wurden die SNXs auf das Vorhandensein von Domänen untersucht. SNX1, SNX2a und SNX2b besitzen eine Phox homology (PX) Domäne, die über Phosphoinositide wie z. B. Phosphatidylinositol-3-Phosphate (PtdIns-3P) mit der Membran interagieren kann. Des Weiteren besitzen sie zwei BAR-Domänen bzw. coiled-coil-Domänen (CC), die eine Dimerisierung der beiden SNXs ermöglichen. (Abb. 3.1)

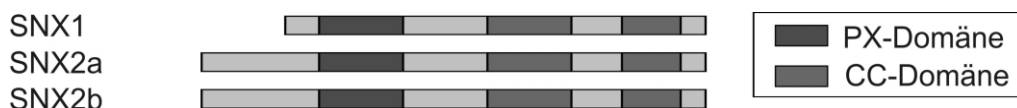


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur pflanzlicher Sorting Nexine. Die SNXs besitzen jeweils eine PX-Domäne und zwei CC-Domänen.

In Abbildung 3.2 ist eine Analyse des Sequenzvergleichs der drei Sorting Nexine dargestellt, welche mit Hilfe des Programmes AlignX (VectorNTI, Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt wurde. Die charakteristischen Domänen der Sorting Nexine bestehen aus einer PX-Domäne (roter Rahmen) und zwei CC-Domänen (blaue Rahmen). Mit dem N-terminus findet die Interaktion der Sorting Nexine mit der großen Untereinheit statt.

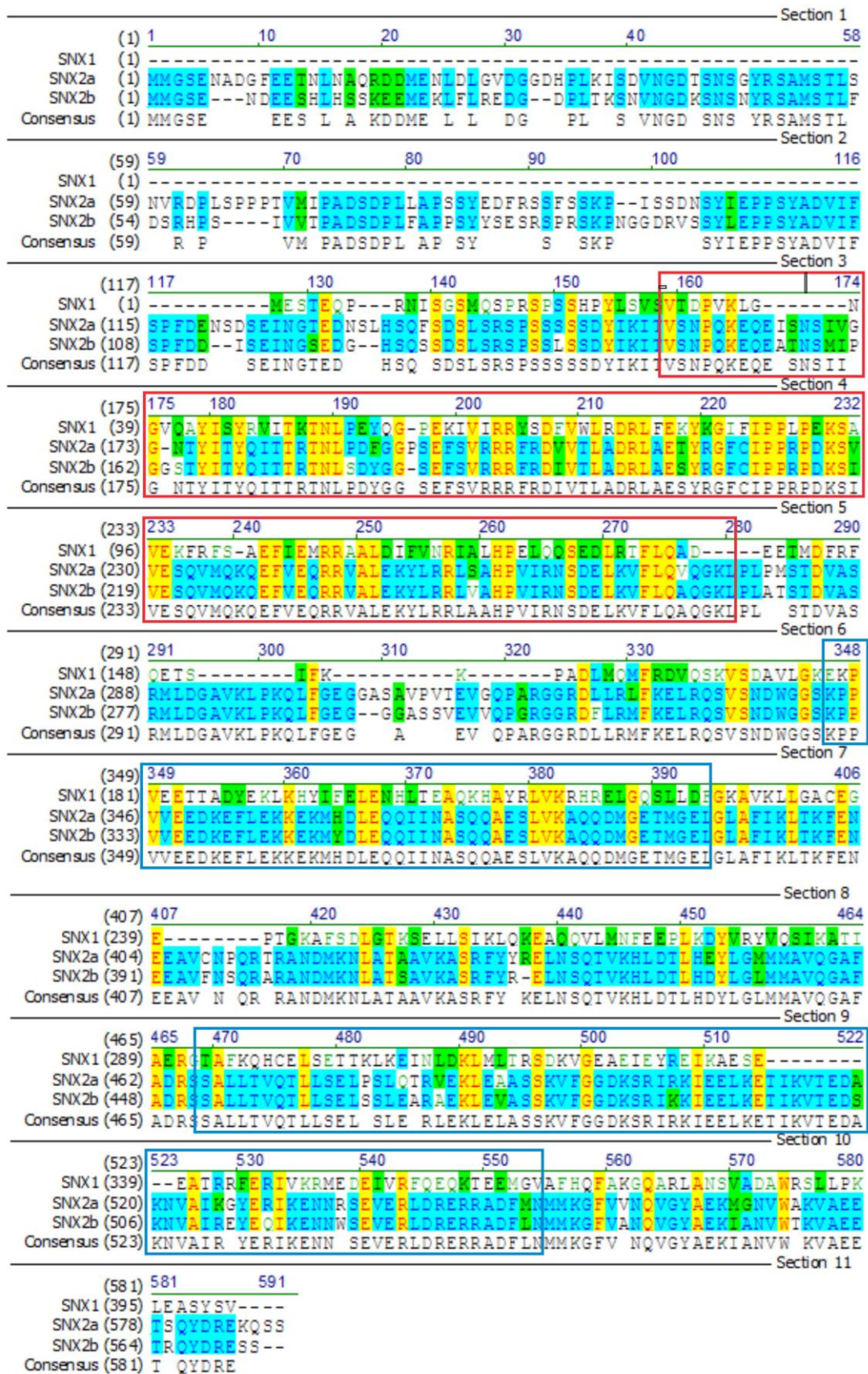


Abb. 3.2 Sequenzvergleich von SNX1, SNX2a und SNX2b. Die PX-Domäne ist rot, die CC-Domänen sind blau eingrahmt. Identische Aminosäuren: türkis, konservierte Aminosäuren: grün, identische Aminosäuren aller drei Sorting Nexine: gelb markiert.

3.2 Analyse der Antikörper gegen SNX1, SNX2a und VPS35

Zur Lokalisation der Sorting Nexine wurden Antikörper hergestellt. Der Ort der Lokalisierung kann dann Hinweise auf die möglichen Funktionen der SNXs liefern, die dann genauer analysiert werden können. Um endogenes SNX1, SNX2a und VPS35 lokalisieren zu können, wurde jeweils ein Peptidantikörper in Doppelpeptidstrategie hergestellt. Die verwendeten Peptidsequenzen sind unter 2.4.1 angegeben. Tabelle 3.3 listet die für die Antikörperherstellung relevanten Retromerproteine, deren „Accession Numbers“ und ihre molekularen Massen auf. Aufgrund der Auswahl der Peptide detektierte der Antikörper gegen SNX1 ausschließlich SNX1 und der Antikörper gegen SNX2a weder SNX1 noch SNX2b, während der Antikörper gegen VPS35 alle drei VPS35-Isoformen erkannte.

Tabelle 3.3: Übersicht der zu lokalisierenden Retromerproteine in *Arabidopsis thaliana*

Protein	Protein Accession Number	molekulare Masse
SNX1	NP_196232	46 kDa
SNX2a	NP_200652	66 kDa
SNX2b	NP_196329	62 kDa
VPS35a	NP_179370	95 kDa
VPS35b	NP_177713	95 kDa
VPS35c	NP_190699	89 kDa

Die von der Firma Eurogentec (Belgien) hergestellten Antikörper wurden mittels SDS-Page und anschließendem Immunoblot analysiert. Hierfür wurden als Proben totale Zellextrakte von *Arabidopsis*- und Tabak-Protoplasten verwendet, die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert und durch Chemilumineszenz visualisiert. Der SNX1-Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion mit einer Bande von 46 kDa in Tabak, die dem der molekularen Masse des SNX1 entspricht, in *Arabidopsis* war nur eine extrem schwache Bande erkennbar (Abb. 3.3). Das Protein SNX2a mit einer molekularen Masse von 66 kDa wurde mit einer deutlichen Bande in Tabak als auch in *Arabidopsis* erkannt (Abb. 3.3). VPS35p (89-95 kDa) detektierte der VPS35-Antikörper in *Arabidopsis*; in Tabak war die Bande allerdings nur schwach (Abb. 3.3).

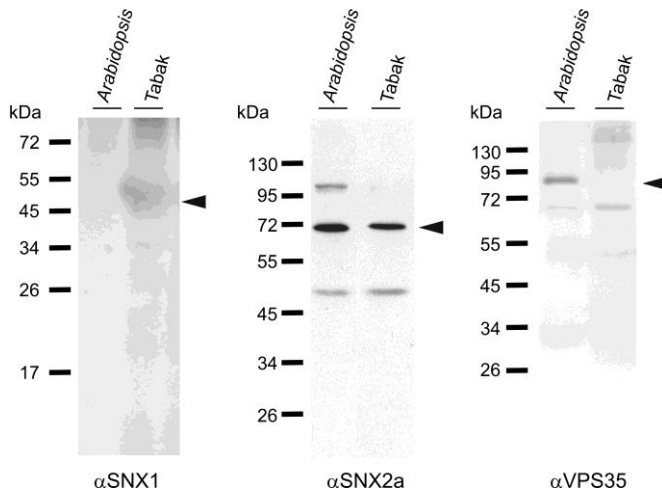


Abb. 3.3 Immunologischer Nachweis der Retromerproteine. In *Arabidopsis*- und Tabak erkannte der jeweilige Antikörper endogenes SNX1 (46 kDa), SNX2a (66 kDa) und VPS35 (89 kDa). Der Pfeil zeigt das apparente Molekulargewicht.

Die Immundetektion zur Beurteilung der Spezifität der Antikörper zeigt die Spezifität des SNX2a-Antikörpers auf (Abb. 3.4). Plasmid-DNA von SNX1, SNX2a und SNX2b wurde in drei verschiedenen Konzentrationen transient in Tabak-Protoplasten exprimiert, und die nach 24 Stunden geernteten Zellen mittels SDS-Page und Immunoblot analysiert. Bei den Proben mit exprimiertem SNX2a sind konzentrationsabhängig Banden zu erkennen, die der Größe des mit GFP (26 kDa) fusionierten SNX2a (66 kDa) entsprechen (92 kDa), während es zu keiner Kreuzreaktion mit SNX1 oder SNX2b kam.

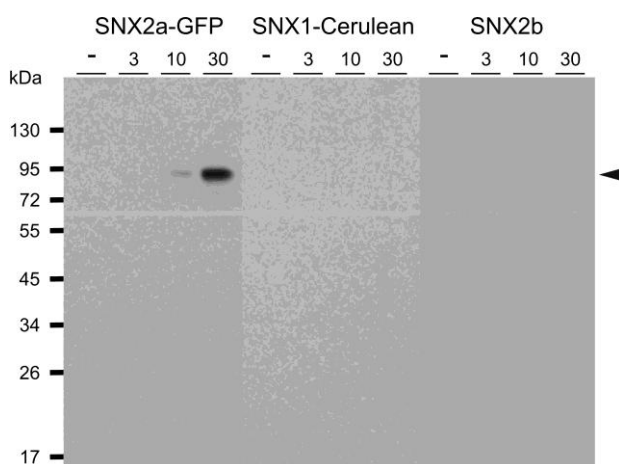


Abb. 3.4 Immunoblot mit SNX2a-Peptidantikörper. Bei den einzelnen Proben handelt es sich um den Zellextrakt von Tabakprotoplasten, die SNX2a-GFP, SNX1-Cerulean oder SNX2b in verschiedenen DNA-Konzentrationen (0, 3, 10 und 30 µg DNA) transient exprimierten. Der Pfeil markiert die Größe von SNX2a-GFP (92 kDa).

3.3 Lokalisierungsstudien pflanzlicher Sorting Nexine

Zur Lokalisierung der Sorting Nexine SNX1 und SNX2a wurden XFP-Fusionsproteine hergestellt, in transienter Genexpression in Protoplasten exprimiert und mittels CLSM analysiert. Da die große Untereinheit des Retromer am PVC lokalisiert wurde (Oliviusson et al., 2006), legte es die Vermutung nahe, dass die kleine Untereinheit, sobald sie aus dem Zytosol an die Membran rekrutiert wird, sich ebenfalls am PVC befindet. Zur Aufklärung der Lokalisierung wurden Koexpressionsstudien der C-terminal mit fluoreszierenden Proteinen fusionierten Sorting Nexine mit fluoreszierenden Markerproteinen für das prävakuläre Kompartiment (PVC), den *cis*-Golgi und für das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) durchgeführt. Als Markerproteine wurden für den *cis*-Golgi das Golgi-resistente Enzym Mannosidase1 (Man1)-GFP und Man1-RFP, für den TGN das SNARE YFP-SYP61 und für das PVC die Rab/Ytp-GTPasen ARA6-GFP und ARA6-RFP verwendet.

3.3.1 Lokalisierung der Sorting Nexine in *Arabidopsis*-Protoplasten

Zur Lokalisierung der Sorting Nexine SNX1 und SNX2a wurden *Arabidopsis*-Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen mit einem SNX2a-GFP bzw. SNX1-mKate kodierenden Plasmid und fluoreszierenden Markerproteinen kotransformiert und nach 16-20 Stunden Inkubation am Konfokalmikroskop untersucht. *Arabidopsis*-Protoplasten, die SNX2a-GFP exprimierten, zeigten sowohl ein zytosolisches als auch ein punktiertes Signal (Abb. 3.5 a, d). Eine Koexpression von SNX2a-GFP mit dem Golgi-Marker Man1-RFP zeigte Signale, die teilweise überlappten (Abb. 3.5 a-c), während eine Koexpression mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 eine hohe Kolo-kalisierungsrate hatte (Abb. 3.5 d-f). SNX1-mKate zeigte ein überwiegend punktier-tes Signal, das mit SNX2a-GFP in Punkten kolokalisierte (Abb. 3.5 g), keine Kolo-kalisierung mit dem PVC-Marker ARA6-GFP aufwies (Abb. 3.5 h) und mit dem Golgi-Marker Man1-GFP nur teilweise überlappte (Abb. 3.5 i). Mit fluoreszierenden Proteinen fusioniertes SNX1 und SNX2a befand sich also im gleichen Komparti-ment, bei dem es sich weder um das PVC noch den Golgi-Apparat handelte, son-dern das TGN darstellte.

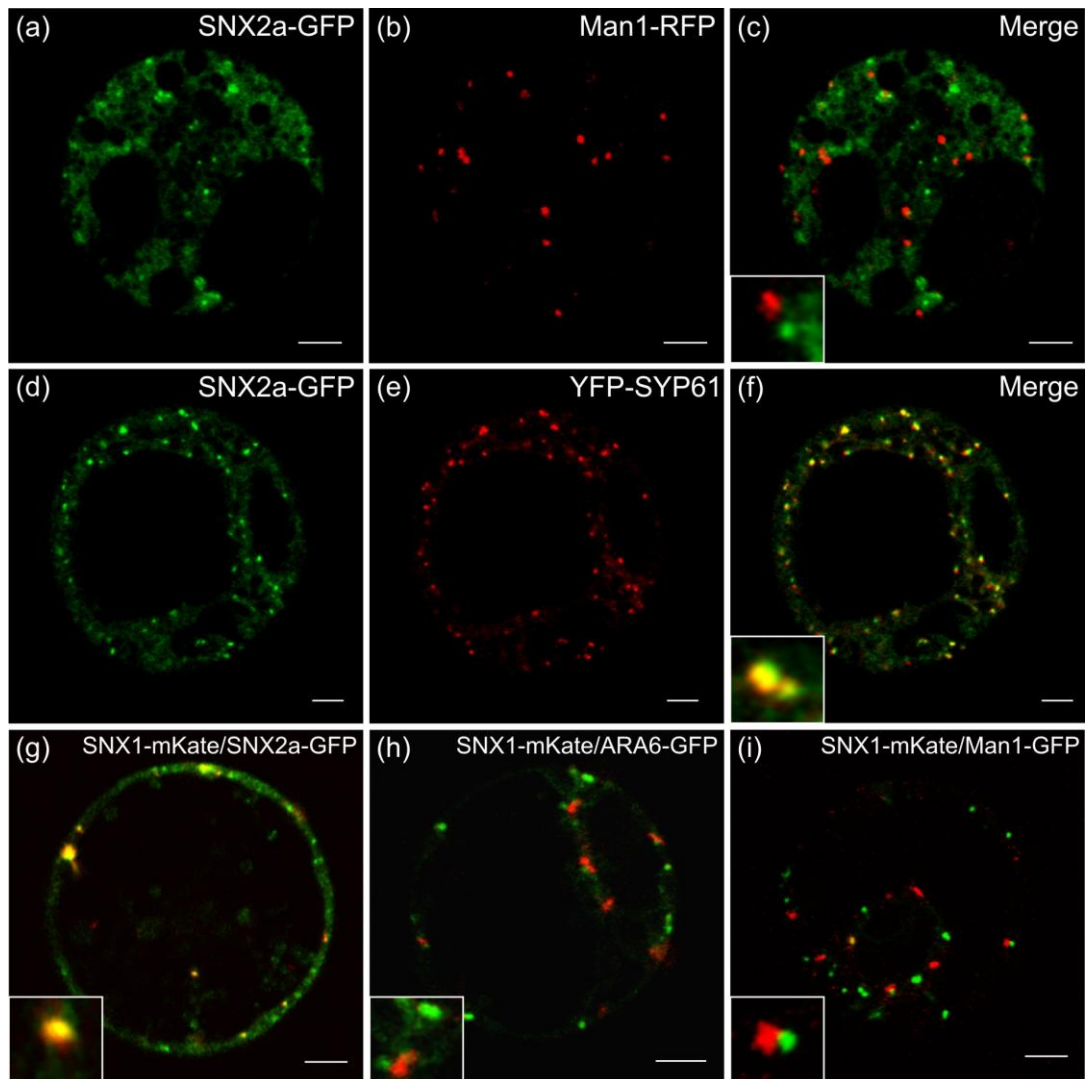


Abb. 3.5 Die Sorting Nexine SNX1 und SNX2a sind in *Arabidopsis*-Protoplasten am TGN lokalisiert. Koexpression von SNX2a-GFP (grün) und SNX1-mKate (rot) mit verschiedenen Markerproteinen. (a-c) Koexpression von SNX2a-GFP mit dem Golgi-Marker Man1-RFP (rot). (d-f) Koexpression von SNX2a-GFP mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 (rot). (g-i) Koexpression von SNX1-mKate mit SNX2a-GFP, dem PVC-Marker ARA6-GFP (grün) und dem Golgi-Marker Man1-GFP (grün). Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Die Vergrößerungen zeigen Bereiche von Interesse. Maßstabsbalken = 5 μ m.

3.3.2 Lokalisierung der Sorting Nexine in Tabak-Protoplasten

Die Lokalisierung der Sorting Nexine führte zu dem unerwarteten Ergebnis der Lokalisation an das TGN. Daher sollten die SNXs auch in Tabak lokalisiert werden. Die Kotransformation der Sorting Nexine in Tabak-Protoplasten wurde mit SNX2a-GFP bzw. SNX1-mKate kodierenden Plasmiden und fluoreszierenden Markerproteinen durchgeführt und nach 20-24 Stunden Inkubation am Konfokalmikroskop untersucht (Abb.3.6).

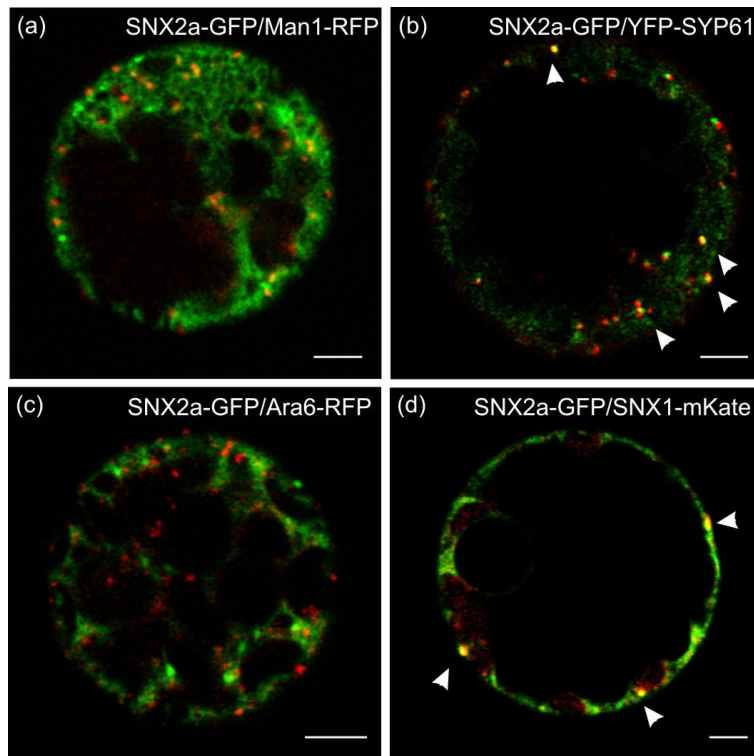


Abb. 3.6 Die Sorting Nexine SNX1 und SNX2a sind in Tabak-Protoplasten am TGN lokalisiert. Koexpression von SNX2a-GFP (grün) und SNX1-mKate (rot) mit verschiedenen Markerproteinen. (a) Koexpression von SNX2a-GFP mit dem Golgi-Marker Man1-RFP (rot). (b) Koexpression von SNX2a-GFP mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 (rot). (c) Koexpression von SNX2a-GFP mit dem PVC-Marker ARA6-RFP (rot). (d) Koexpression von SNX1-mKate mit SNX2a-GFP. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb (teilweise durch weiße Pfeile verdeutlicht). Maßstabsbalken = 5 μ m.

Im Vergleich zur Lokalisierung in *Arabidopsis*-Protoplasten zeigte SNX2a-GFP in Tabakprotoplasten ein deutlich stärkeres zytosolisches und nur schwach punktiertes Signal. Das Signal von SNX1-mKate war hingegen mit dem in *Arabidopsis*-Protoplasten vergleichbar. Die Koexpression von SNX2a-GFP und dem Golgi-Marker Man1-RFP zeigte Signale, die teilweise überlappten (Abb. 3.6 a). Durch die Koexpression mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 wurde eine sehr hohe Rate an Kolokalisierung erreicht (Abb. 3.6 b), während keine Überlappungen mit dem PVC-Marker ARA6-RFP zu detektieren war (Abb. 3.6 c). Auch in Tabak-Protoplasten kolokalisierten die beiden Sorting Nexine (Abb. 3.6 d).

3.3.3 Lokalisierung der Sorting Nexine in BY2-Zellen

Die unerwarteten Resultate der Expression der XFP-fusionierten Sorting Nexine erforderten eine *in situ* Lokalisation der endogenen Sorting Nexine zur Überprüfung der Ergebnisse. Zur Lokalisierung von endogenen Sorting Nexinen wurde der jewei-

lige SNX-Antikörper in verschiedenen Tabak-BY2-Zelllinien verwendet, die Markerproteine für PVC, Golgi-Apparat oder TGN exprimierten. Als Sekundärantikörper der Immunfluoreszenzstudien wurden Alexa-Fluore® verwendet. In der BY2-Zelllinie, die den TGN-Marker SCAMP1-YFP exprimierte, überlappten die Signale von SCAMP1-YFP und SNX1 zum Großteil (Abb. 3.7 a-c). Endogenes SNX1 kolokalisierte auch hier nicht mit dem PVC-Marker GFP-BP80 und nur zu geringen Teilen mit dem Golgi-Marker Gonst1-YFP (Abb. 3.7 d-e).

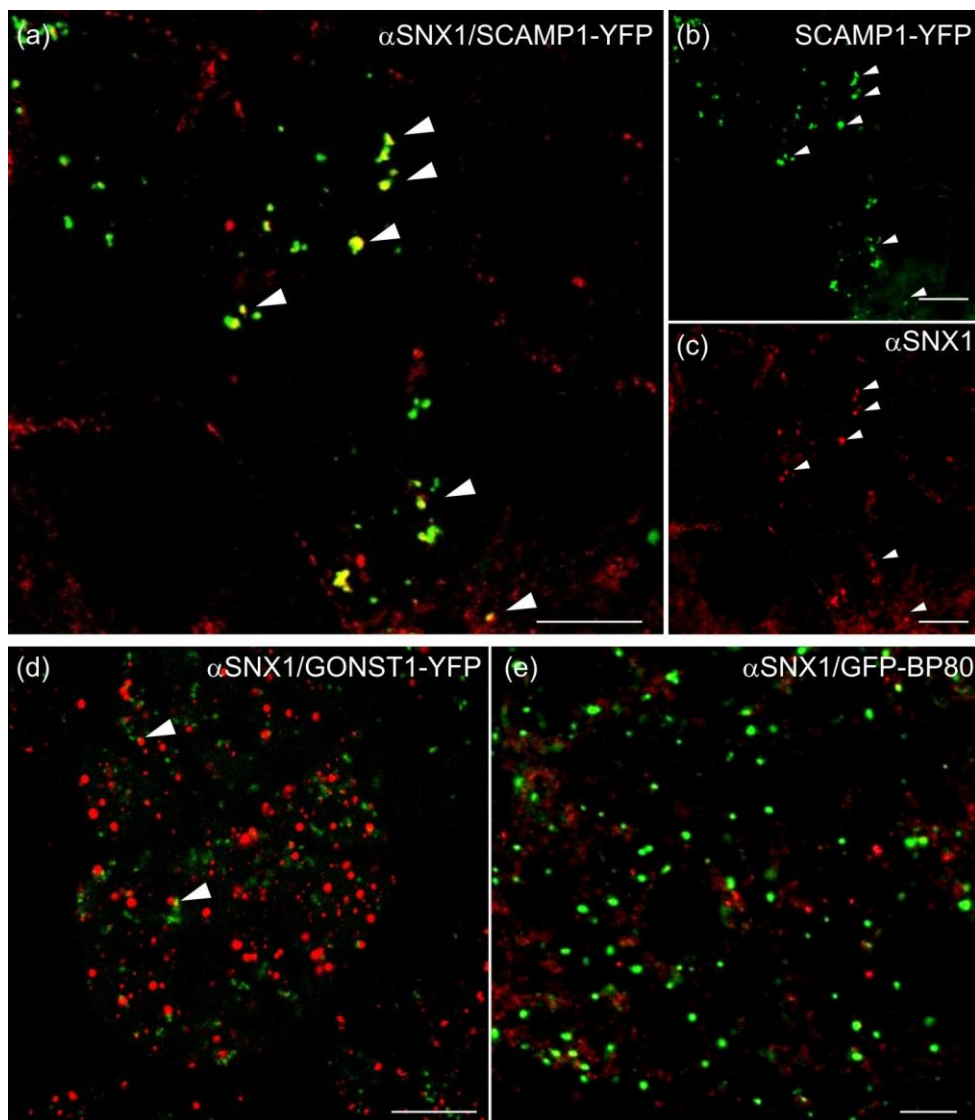


Abb. 3.7 Endogenes SNX1 befindet sich auch in BY2-Zellen am TGN. (a-c) Immunfluoreszenz von α SNX1 (rot) in der SCAMP1-YFP BY2-Zelllinie. Immunmarkierung mit SNX1-Antikörper (rot) in den BY2-Zelllinien GONST1-YFP (d) und GFP-BP80 (e). Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb (teilweise mit weißen Pfeilen markiert). Maßstabsbalken = 5 μ m.

Eine Immunmarkierung mit dem SNX2a-Antikörper in den oben genannten BY2-Zelllinien zeigte eine hohe Kolo­kalisierungsrate mit dem TGN, jedoch wenig Über­lappung mit dem Golgi-Apparat und keine Überlagerung mit dem PVC-Marker (Abb. 3.8 a-c).

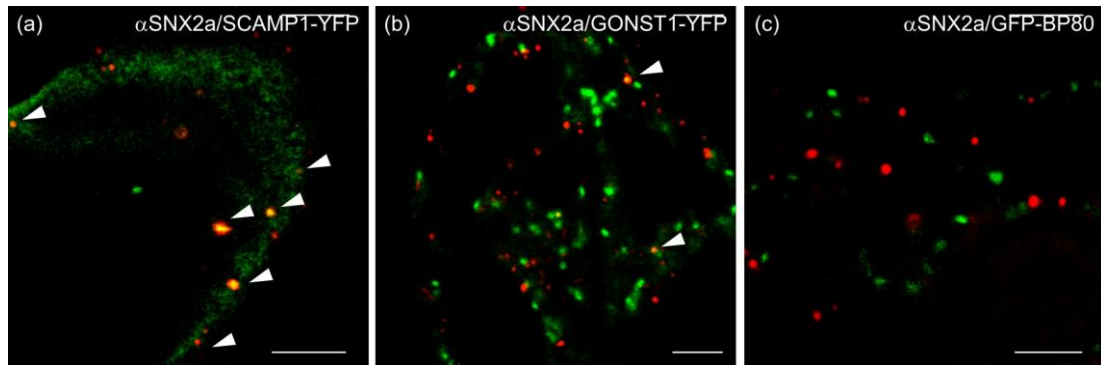


Abb. 3.8 SNX2a wurde in stabil-transformierten BY2-Zellen am TGN lokalisiert. Immunfluoreszenz von α SNX2a (rot) in den BY2-Zelllinien mit dem TGN-Marker SCAMP1-YFP (a), dem Golgi-Marker GONST1-YFP (b) und dem PVC-Marker GFP-BP80 (c). Die drei Markerproteine sind grün dargestellt. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb (teilweise mit weißen Pfeilen markiert). Maßstabsbalken = 5 μ m.

3.3.4 Lokalisierung von endogenem SNX2a in *Arabidopsis thaliana*

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde der SNX2a-Antikörper auch in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zur Lokalisierung des endogenen SNX2a in *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Hierzu wurden die *Arabidopsis*-Linien verwendet, die Markerproteine für TGN (VHA-a1-GFP), Golgi-Apparat (ST-YFP) oder PVC (ARA7-RFP) exprimierten. Während mit dem PVC-Marker ARA7-RFP keine Überlappung mit dem SNX2a-Immunsignal vorhanden war, befanden sich die Signale von SNX2a und ST-YFP direkt nebeneinanderliegend oder getrennt voneinander. Mit VHA-a1-GFP wurde jedoch nahezu eine Deckung der punktierten Signale erreicht (Abb. 3.9). Endogenes SNX2a befindet sich demnach auch in *Arabidopsis* am TGN.

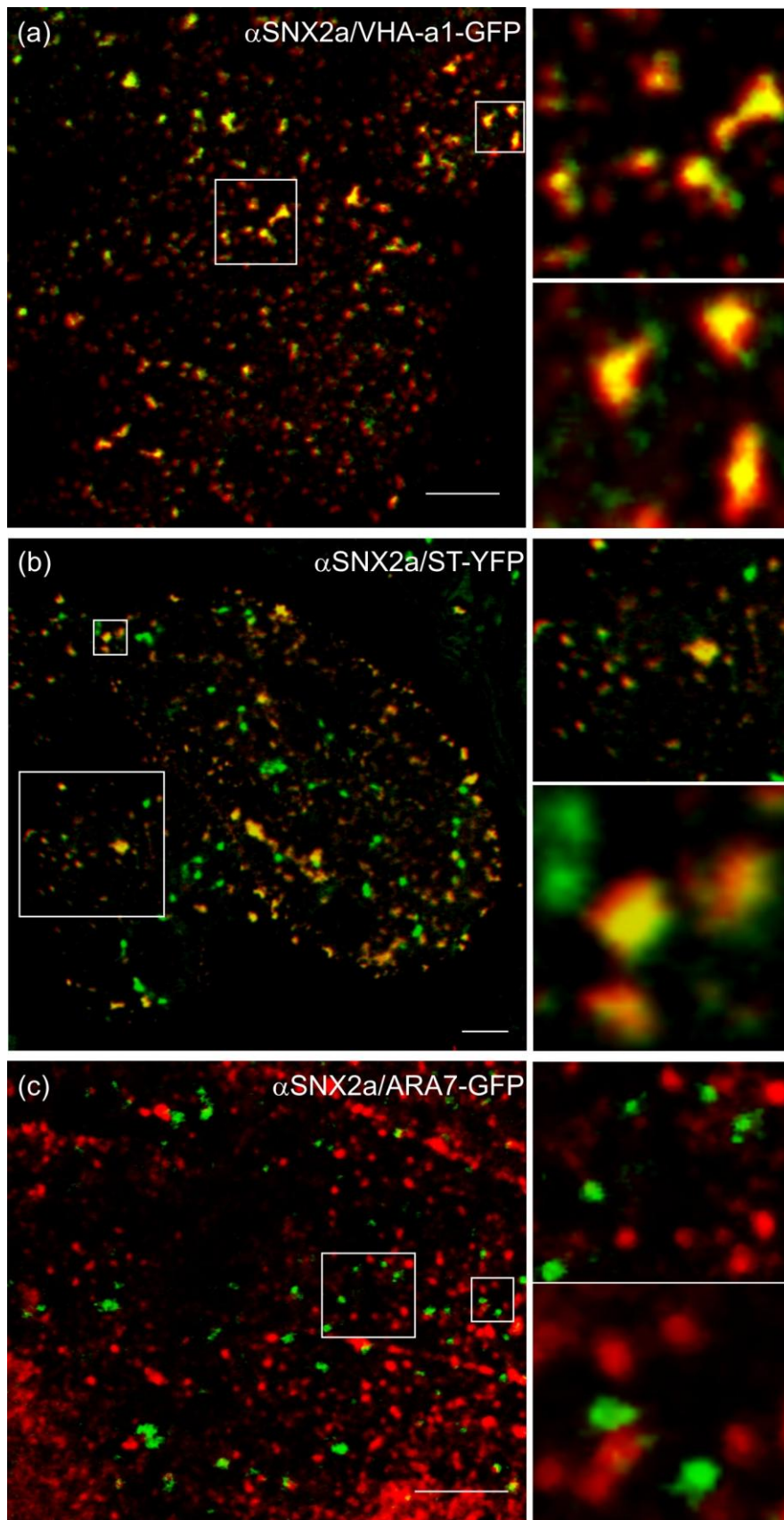


Abb. 3.9 Endogenes SNX2a ist in *Arabidopsis* am TGN lokalisiert. Immunfluoreszenz von α SNX2a (rot) in den transgenen *Arabidopsis*-Linien VHA-a1-GFP (a), ST-YFP (b) und ARA7-GFP (c). Die eingerahmten Bereiche sind nebenstehend vergrößert dargestellt. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Maßstabsbalken = 5 μ m.

3.4 Lokalisierungsstudien der großen Retromeruntereinheit

Aufgrund der unerwarteten Lokalisierung der Sorting Nexine und damit der kleinen Retromeruntereinheit am TGN, stellte sich die Frage, ob die SNXs die kleine Untereinheit bilden können, wenn die große Untereinheit am PVC lokalisiert ist. Daher sollten zunächst Lokalisierungsstudien mit den Proteinen VPS29 und VPS35 als Bestandteile der großen Retromeruntereinheit durchgeführt werden, um zu klären, ob sich diese am PVC oder ebenfalls am TGN befindet. Die Lokalisierung wurde mittels Immunmarkierung mit dem publizierten VPS29-Antikörper (Oliviusson et al., 2006) und dem neu hergestellten VPS35-Peptidantikörper (siehe 3.2) an stabil-transformierten BY2-Zelllinien durchgeführt, die Marker für TGN, Golgi-Apparat und PVC exprimierten.

Während das VPS29-Signal deckungsgleich mit dem TGN-Marker SCAMP1-YFP war, zeigte es keine Überlappung mit den fluoreszierenden Markern GONST1-YFP (Golgi) und dem PVC-Marker GFP-BP80 (Abb. 3.10).

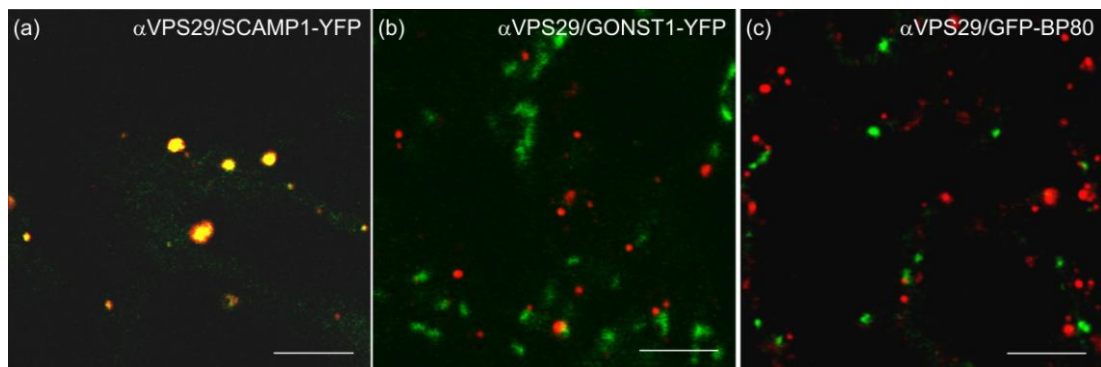


Abb. 3.10 Endogenes VPS29 befindet sich in BY2-Zellen am TGN. Immunfluoreszenz von α VPS29 (rot) in den BY2-Zelllinien SCAMP1-YFP (a), GONST1-YFP (b) und GFP-BP80 (c). Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Maßstabsbalken = 5 μ m.

In der BY2-Zelllinie, die den TGN-Marker SCAMP1-YFP exprimiert, überlappten die Signale von SCAMP1-YFP und VPS35 in punktierten Strukturen (Abb. 3.11 a-c). In Kontrollen mit Marker-Linien kolokalisierte endogenes VPS35 weder mit dem Golgi-Marker Gonst1-YFP noch mit dem PVC-Marker GFP-BP80 (Abb. 3.11 d-e).

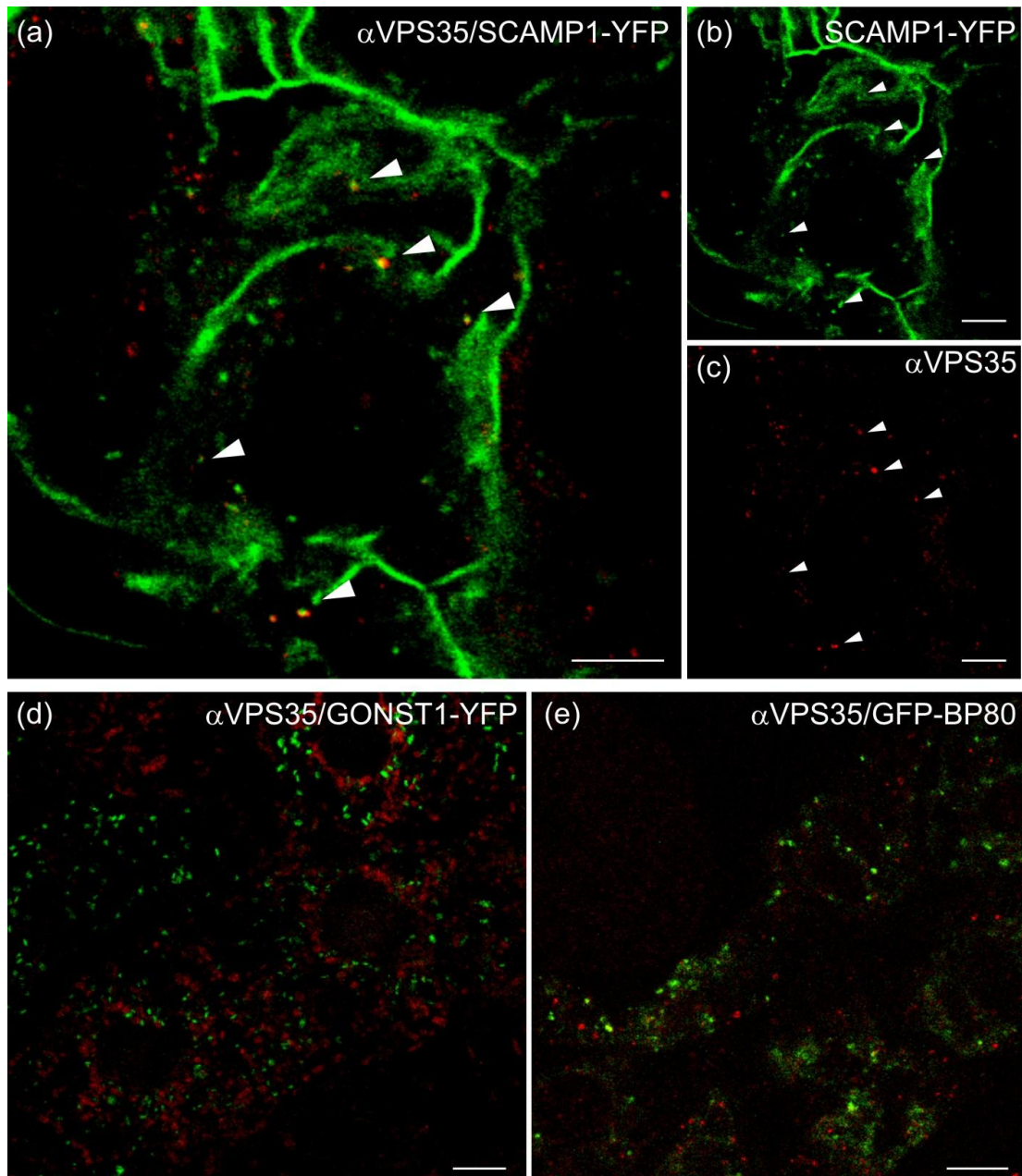


Abb. 3.11 Endogenes VPS35 ist in BY2-Zellen am TGN lokalisiert. (a-c) Immunfluoreszenz von α VPS35 (rot) in der SCAMP1-YFP BY2-Zelllinie. Immunmarkierung mit dem VPS35-Antikörper (rot) in den BY2-Zelllinien GONST1-YFP (d) und GFP-BP80 (e) zeigten keine Kolo­kalisierung der Signale. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb (teilweise mit weißen Pfeilen markiert). Maßstabsbalken = 5 μ m.

Immunfluoreszenzmarkierungen mit Antikörpern gegen Proteine der großen Untereinheit von Retromer ergaben somit eine Lokalisierung am TGN. Damit befindet sich sowohl die kleine als auch die große Untereinheit, die gemeinsam den Retromer­komplex bilden, nicht wie zuvor beschrieben am prä­vakuolären Kompartiment lokalisiert. Durch die Lokalisierung des Retromer an das TGN ist die Funktion des Re-

zyklieren der vakuolären Sortierungsrezeptoren vom PVC zurück zum TGN fraglich. Aus diesem Grund soll in den folgenden Analysen die Funktion des Retromers untersucht werden.

3.5 Funktionelle Charakterisierung der Sorting Nexine

Die Beteiligung der VPS5-Homologen am Retromer-vermittelten Rezeptor-Transport soll durch Inhibierung der Funktion des Retromers und damit eine Inhibierung des Retromer-vermittelten Transportweges untersucht werden. Hierzu wurden dominant-negative Mutanten von SNX1 und SNX2a hergestellt, die die Bildung eines Retromer-Vesikels durch das Fehlen für die strukturelle Funktion der SNXs wichtiger Domänen verhindern sollten. Die Expression der Mutanten sollte also zu einer Inhibierung des VSR-Rezyklierens und schließlich zu einer Hemmung des Protein-Transports zur Vakuole führen.

Die SNXs interagieren über den N-Terminus mit VPS35 und mit der PX-Domäne über PtdIns-3P mit der Membran. Die CC-Domänen der SNXs sind für die Bildung des Retromer-Vesikels verantwortlich und besitzen damit eine strukturelle Funktion. Um dies für die SNXs genauer zu untersuchen, wurden die in Abbildung 3.12 dargestellten dominant-negativen Mutanten von SNX1 und SNX2a hergestellt. Den SNX- Δ N-Mutanten fehlt die N-terminale Domäne. Dadurch können diese Mutanten nicht mit der großen Untereinheit interagieren und damit kann kein Transport stattfinden. Durch das Fehlen der CC-Domänen der SNX- Δ CC-Mutanten werden die Membrandeformierung und damit die Vesikelbildung verhindert. Da alle Mutanten weiterhin eine PX-Domäne besitzen, ist eine Interaktion mit der Membran gewährleistet. Auf Grund der Titration der endogenen SNXs durch 35S-getriebene Expression der Mutanten sollte kein Retromer-Vesikel mehr gebildet werden können. Die Expression der Mutanten sollte also zu einer Blockierung des Transportwegs zur Folge haben. Dies wurde anhand der folgenden Analysen am CLSM und mit Hilfe proteinbiochemischer Methoden untersucht.

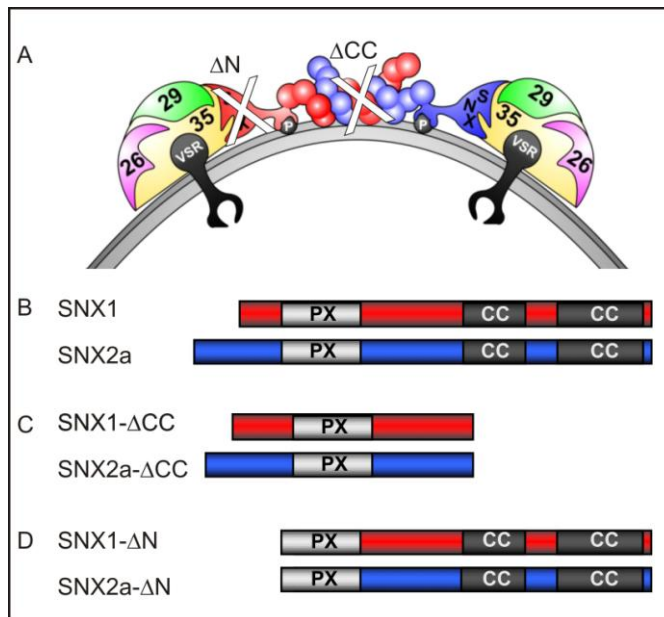


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der SNX-Mutanten. **A** Schematische Darstellung des Retromer-Komplexes mit interagierenden CC-Domänen zweier Sorting Nexine zur Verdeutlichung der Mutanten. **B** Wildtyp SNX1 und SNX2a mit ihren Domänen dargestellt. **C** Schematische Darstellung der SNX-ΔCC-Mutanten. **D** Schematische Darstellung der SNX-ΔN-Mutanten. (N = N-terminus, PX = Phox-homology-Domäne, CC = coiled-coil Domäne)

Eine Inhibierung aller drei Sorting Nexine SNX1, SNX2a und SNX2b war das Ziel eines hergestellten RNAi-Konstrukts gegen die erste CC-Domäne von SNX2a. Mittels Doppelstrang-RNA-vermittelter RNA-Interferenz (RNAi) sollte die kleine Retromerunterheit inhibiert werden. Hierfür wurde der Bereich der CC-Domäne von SNX2a mittels PCR direkt und revers-komplementär amplifiziert. Als „Loop“ wurde die „hairpin“-Sequenz des Vektors pHannibal verwendet. Wird das RNAi-Konstrukt exprimiert, entsteht doppelsträngige RNA, die erkannt wird und in 21-23 nt lange einzelsträngige RNA-Moleküle zerstückelt wird. RNAi führt zur Spaltung und zur Translationsblockade der Ziel-mRNA. Somit wird die Produktion spezifischer Proteine reduziert, hier die CC-Domänen des SNX2a. Aufgrund der hohen Homologie der CC-Domänen in den Vps5-Orthologen führt das RNAi-Konstrukt wahrscheinlich zu einer Verringerung der Genaktivität aller drei Sorting Nexine. Zur Verhinderung eines unspezifischen „Silencings“ der CC-Domänen anderer Proteine wurde eine BLAST-Suche in der *Arabidopsis*-Genomdatenbank durchgeführt. Außer einem in Chloroplasten lokalisierten Protein mit unbekannter Funktion (At5g37050) wurden keine weiteren homologen Sequenzen gefunden. Die Expression des RNAi-Konstrukts führte zu einem deutlichen Verlust an detektierbaren endogenem SNX2a sowohl in *Arabidopsis*- als auch in Tabak-Protoplasten (Abb. 3.13).

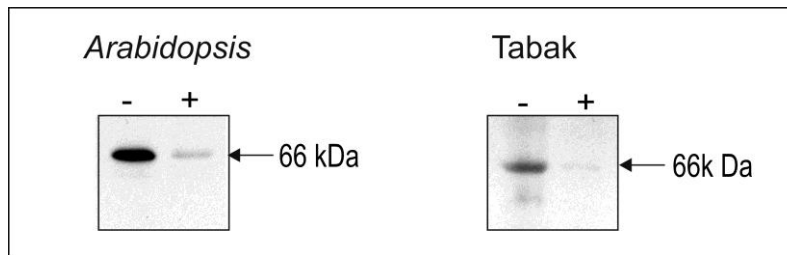


Abb. 3.13 Immunologischer Nachweis des Retromerproteins SNX2a. Der SNX2a-Peptidantikörper erkannte in totalem Zellextrakt von *Arabidopsis*- und Tabak-Protoplasten endogenes SNX2a (66 kDa) in Kontrollprotoplasten (-) oder deutlich schwächer in Protoplasten, die das SNXCCRNAi-Konstrukt für 24 h exprimierten (+).

3.5.1 Einfluss der SNX-Mutanten auf den vakuolären Sortierungsrezeptor BP80

Zur Analyse der Funktion der Sorting Nexine sollte überprüft werden, ob die unter 3.5 beschriebenen SNX-Mutanten einen Einfluss auf den vakuolären Sortierungsrezeptor BP80 haben. Hierzu wurden der etablierte Marker für das PVC (GFP-BP80) und der Golgi-Marker Man1-RFP verwendet. Die Marker wurden zur Kontrolle alleine oder zusammen mit den verschiedenen SNX-Mutanten in Tabakprotoplasten in transienter Genexpression koexprimiert und mit Hilfe des CLSM analysiert. Um eine mögliche sterische Hinderung durch Fluorophore zu verhindern, wurden die SNX-Mutanten nicht mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert. Dadurch wurde sichergestellt, dass weder die Interaktion mit der großen Retromeruntereinheit über die N-terminale Domäne noch die Dimerisierung der SNXs über die CC-Domänen behindert wurde. Der Nachteil dieser Mutanten ist, dass sie nicht detektierbar sind. Da aber bei einer Kotransfektion in Protoplasten $93,6 \pm 3,5$ % aller transformierter Protoplasten beide Proteine und ca. $76,0 \pm 12,9$ % aller transformierten Protoplasten alle drei Proteine exprimierten, ist davon auszugehen, dass die Mutanten exprimiert wurden, wenn die Markerproteine sichtbar sind.

Kontrollprotoplasten, die den Golgi-Marker Man1-RFP und den PVC-Marker GFP-BP80 koexprimierten, zeigten überwiegend separate fluoreszierende Signale (Abb. 3.14 a, d). In einem parallel dazu angesetzten Experiment wurden nun die gleichen Marker zusammen mit SNX- Δ N- bzw. SNX- Δ CC-Mutanten koexprimiert. Durch Expression der SNX-Mutanten erhöhte sich die Rate der Signale des PVC- und des Golgi-Markers, die direkt benachbart lagen, deutlich (Abb. 3.14 b, c, e, f). Alle vier SNX-Mutanten zeigten einen vergleichbaren Phänotyp, der von den Kontrollprotoplasten zu unterscheiden war. Zur Untermauerung des Ergebnisses wurde eine statistische Analyse der PVC- und Golgi-Signale durchgeführt, die zeigte, dass

sich die Anzahl der separaten Signale von der Kontrolle mit ca. 85 % zu den Mutanten mit etwa 40 % verschob, während die Rate der benachbarten Signale sich entsprechend auf 50 % erhöhte (Tabelle 3.4). Da alle Mutanten den gleichen Effekt zeigten, wurden für die folgenden Experimente nur die SNX2a-Mutanten verwendet.

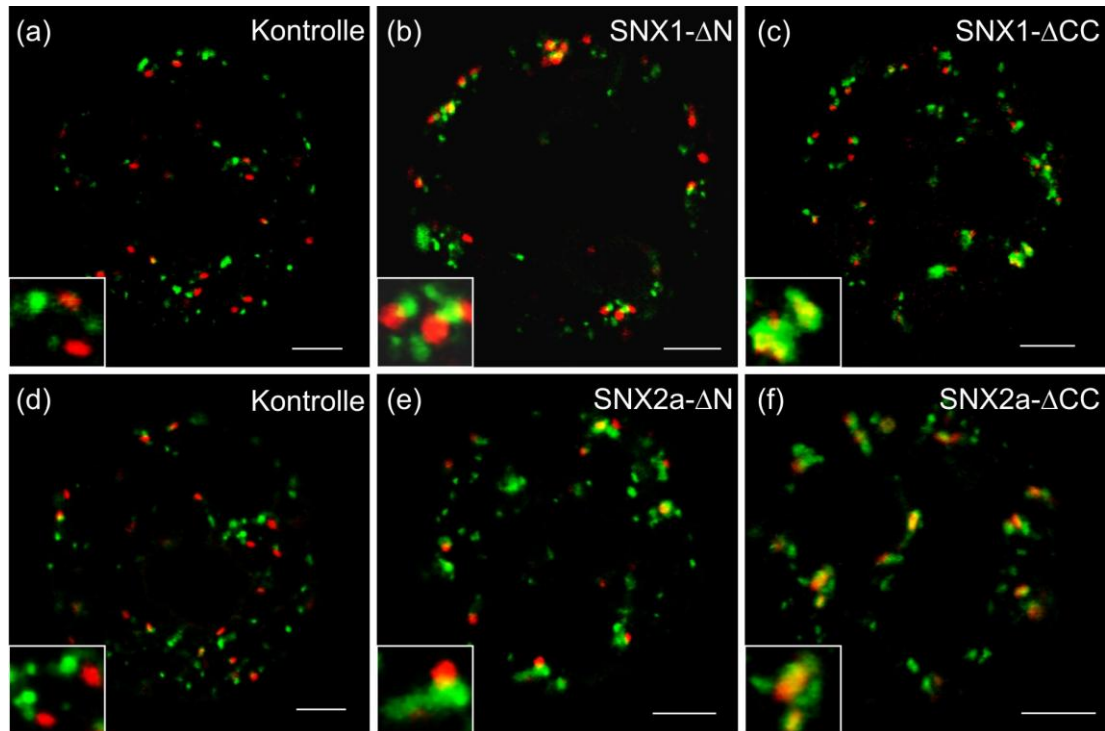
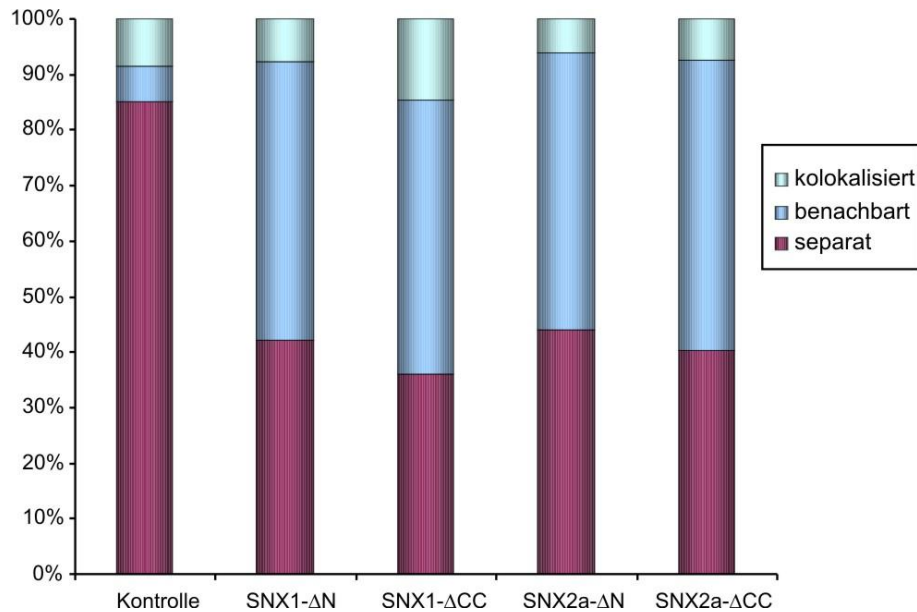


Abb. 3.14 Einfluss der SNX-Mutanten auf die Verteilung der Markerproteine Man1-RFP und GFP-BP80. Koexpression von GFP-BP80 (grün) und Man1-RFP (rot) als Kontrolle nur die beiden Marker (a, d) oder koexprimiert mit den SNX-Mutanten $-\Delta N$ (b, e) oder $-\Delta CC$ (c, f). Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Die Vergrößerungen zeigen Bereiche von Interesse. Maßstabsbalken = 5 μm .

Tabelle 3.4: Verteilung der Golgi- und PVC-Signale in Kontrollprotoplasten und in SNX-Mutanten exprimierenden Protoplasten. (Das Diagramm repräsentiert die Tabelle. Anzahl der analysierten Protoplasten: 50)

GFP-BP80/Man1-RFP	separat [%]	benachbart [%]	kolokalisiert [%]
Kontrolle	85 \pm 4	6 \pm 3	9 \pm 2
SNX1- ΔN	42 \pm 4	50 \pm 5	8 \pm 3
SNX1- ΔCC	36 \pm 13	49 \pm 7	15 \pm 7
SNX2a- ΔN	44 \pm 7	50 \pm 4	6 \pm 4
SNX2a- ΔCC	41 \pm 3	52 \pm 5	7 \pm 5



Da PVC-Marker und Golgi-Marker in den Kontrollzellen nicht kolokalisieren, zeigten diese Experimente, dass die SNX-Mutanten einen Einfluss auf den Transport der Markerproteine haben. Die Frage ist nun, in welchem Kompartiment sich die Marker befinden. Hierbei können folgende Szenarien in Betracht gezogen werden: die Markerproteine befinden sich zusammen am PVC, am Golgi-Apparat oder an einem anderen Kompartiment. Um dies zu charakterisieren wurden die Drogen Wortmannin (WM) und Brefeldin A (BFA) verwendet. Wortmannin ändert die Morphologie des PVCs, es erscheint deutlich vergrößert. Bei der konfokalen Mikroskopie zeigt ein PVC unter Wortmannin-Einfluss eine ringförmige Struktur. Befinden sich unter Einfluss der SNX-Mutanten Golgi- und PVC-Marker im PVC, würde man nach Wortmannin-Behandlung für beide Marker eine ringförmige Struktur erhalten. In diesem Falle würden die Mutanten zu einer veränderten fehlerhaften Lokalisierung der Golgi-Marker führen. In Tabak führt BFA zu einer Relokalisierung der Golgi-Marker in das endoplasmatische Retikulum (ER). Befände sich also der PVC-Marker im Golgi-Apparat, würde eine Behandlung der Tabakprotoplasten mit BFA eine Lokalisierung des PVC-Markers im ER zur Folge haben.

Protoplasten der in Abbildung 3.12 verwendeten Proben, die den PVC-Marker GFP-BP80 und dem Golgi-Marker Man1-RFP exprimierten, wurden nach 16 Stunde Expression mit 10 μM Wortmannin oder 36 μM BFA für ca. 1 Stunde behandelt (Abb. 3.15).

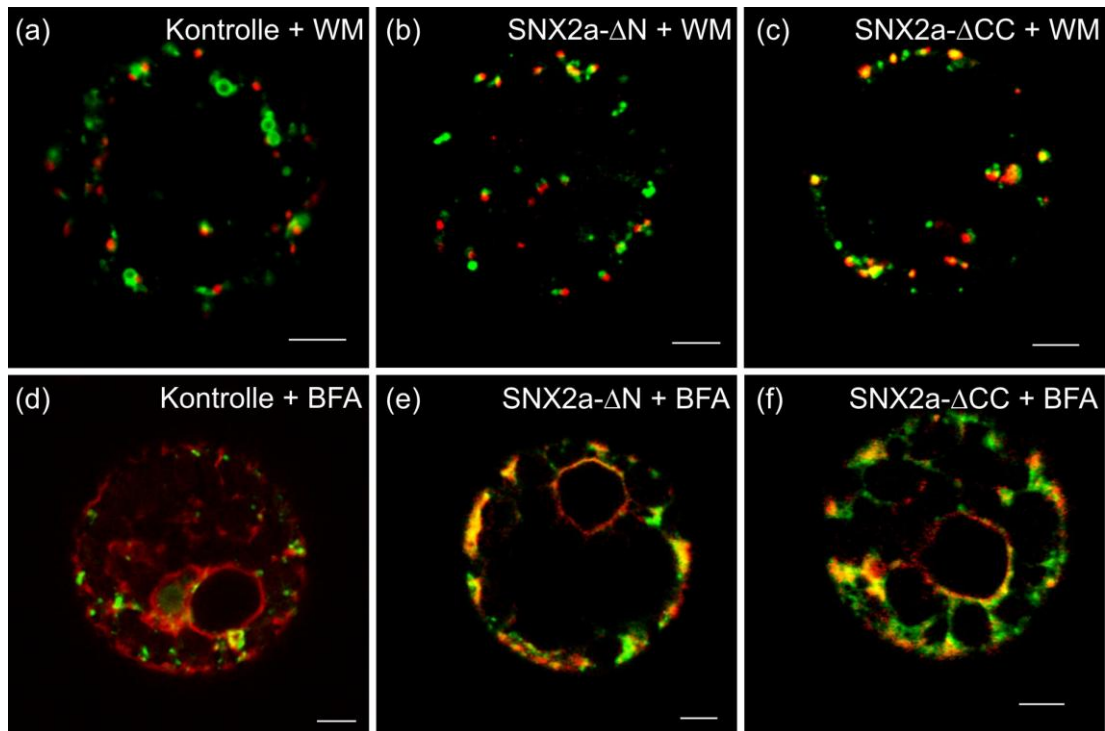


Abb. 3.15 Analyse des Einflusses der SNX-Mutanten auf die Verteilung der Markerproteine Man1-RFP und GFP-BP80 in Tabakprotoplasten. Koexpression von GFP-BP80 (grün) und Man1-RFP (rot) in Kontrollprotoplasten (a, d) oder koexprimiert mit den SNX2a- Δ N (b, e) oder SNX2a- Δ CC (c, f) nach Behandlung mit 10 μ M Wortmannin (a-c) oder 36 μ M BFA (d-f) für eine Stunde. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Maßstabsbalken = 5 μ m.

Unter Einfluss der Droge Wortmannin zeigte der PVC-Marker in der Kontrolle eine ringförmige Struktur, während der Golgi-Marker unverändert blieb (Abb. 3.15 a). Im Gegensatz dazu war nach Wortmannin-Behandlung weder für Protoplasten, die SNX2a- Δ N (Abb. 3.15 b) noch für welche die SNX2a- Δ CC (Abb. 3.15 c) überexprimierten, eine Ringstruktur zu erkennen. Die Marker – auch der PVC-Marker – befanden sich also nicht am PVC. In Tabak führt eine Behandlung mit BFA zu einer Relokalisierung eines Golgi-Markers in das ER, während ein PVC-Marker durch die Droge nicht beeinflusst wird.

Es sollte nun getestet werden, ob unter Einfluss der SNX2a-Mutanten die Marker sich im Golgi-Apparat befinden, ob also der PVC-Marker GFP-BP80 das PVC nicht mehr erreichen kann und im Golgi-Apparat festsetzt. Die Kontrolle zeigt den typischen BFA-Effekt: Der Golgi-Marker war im ER lokalisiert, während GFP-BP80 noch in Punkten vorhanden war (Abb. 3.15 d). Unter Einfluss von SNX2a- Δ N (Abb. 3.15 e) oder SNX2a- Δ CC (Abb. 3.15 f) zeigte sich für den Golgi-Marker ein ER-Signal, während GFP-BP80 teilweise im ER und zum Teil noch in Punkten zu erkennen war. Bei dem punktförmigen Signal kann es sich nur um das TGN han-

deln, da dieser weder Wortmannin- noch BFA-sensitiv ist. Die Expression der SNX2a-Mutanten verursachte also eine Akkumulierung der PVC-Marker GFP-BP80 im Golgi-Apparat und im TGN.

3.5.2 Einfluss der SNX-Mutanten auf das prävakuoläre Kompartiment

Die Expression einer SNX-Mutante führte dazu, dass der PVC-Marker GFP-BP80 das PVC nicht mehr erreichen konnte. Es stellte sich nun die Frage, ob unter diesem Mutanten-Einfluss überhaupt noch ein PVC existiert. Zur Klärung dieser Frage wurde neben GFP-BP80 ein weiterer PVC-Marker hinzugezogen: ARA6-RFP. Bei ARA6 handelt es sich um eine Rab/Ytp-GFPase, die aus dem Zytosol direkt an das PVC rekrutiert wird, während GFP-BP80 durch den sekretorischen Transportweg über den Golgi-Apparat zum PVC transportiert wird.

In Kontrollprotoplasten kolokalisierten ARA6-RFP und GFP-BP80 und auch nach Wortmannin-Behandlung zeigte sich für beide Marker ein punktiertes und teilweise ringförmiges Signal am PVC (Abb. 3.16 a-d). Unter Einfluss der SNX2a- Δ CC-Mutante traten die beiden PVC-Marker separat voneinander auf (Abb. 3.16 e-g), und nach einer Stunde Inkubation mit der Wortmannin waren keine ARA6-RFP-Ringe zu erkennen, und auch GFP-BP80 lag weiterhin als punktiertes Signal vor (Abb. 3.16 h). Die Koexpression der PVC-Marker mit SNX2a- Δ N zeigte den gleichen Effekt (Abb. 3.16 i-l). Da GFP-BP80 durch den Einfluss der SNX-Mutanten im Golgi/TGN akkumuliert, hatte Wortmannin keinen Einfluss. Außerdem wurde gezeigt, dass noch PVCs in der Zelle vorhanden sind, weil Ara6-RFP diese markierte und nicht zytosolisch vorlag. Allerdings hatte Wortmannin in den Protoplasten, die eine der Mutanten exprimierten, keinen Einfluss auf die Morphologie des PVCs. Durch Koexpression der Marker mit dem RNAi-Konstrukt SNXCCRNAi kam es ebenfalls zu einer Trennung der beiden Marker (Abb. 3.16 m-o). Allerdings blieb hier der PVC-Marker ARA6-RFP sensitiv gegen Wortmannin und zeigte eine ringförmige Struktur (Abb. 3.16 p).

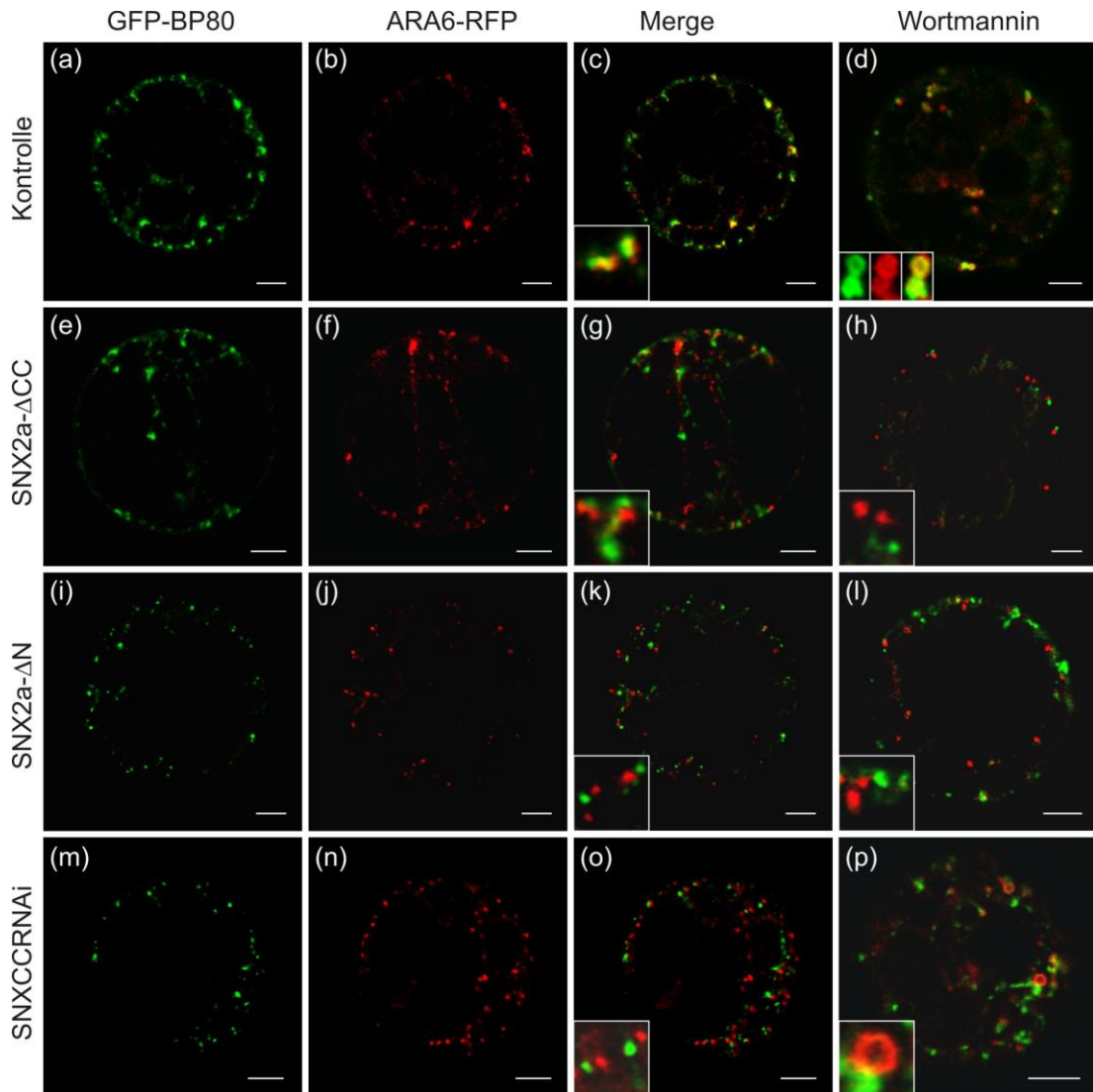
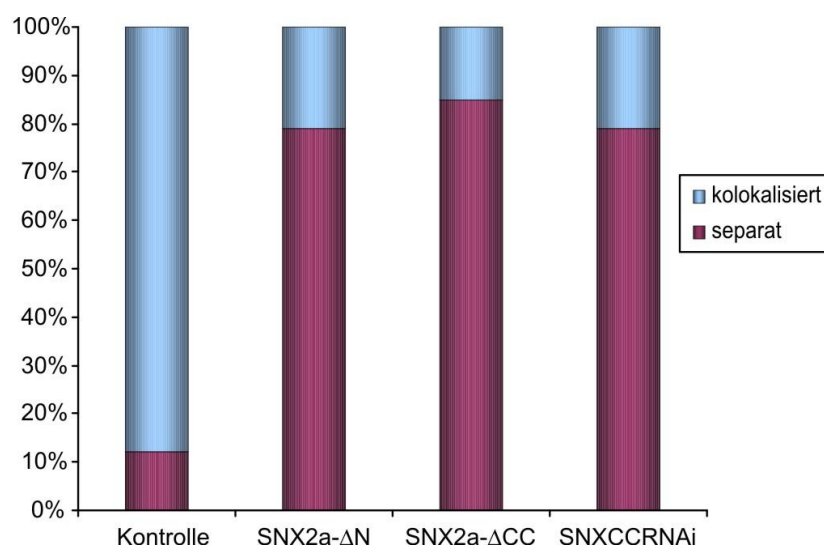


Abb. 3.16 Analyse des Einflusses der SNX-Mutanten und durch RNAi-induzierte SNX-Inhibierung auf die Verteilung der Markerproteine ARA6-RFP und GFP-BP80. Koexpression von GFP-BP80 (grün) und ARA6-RFP (rot) in Kontrollprotoplasten (a-d) oder koexprimiert mit SNX2a- Δ CC (e-h), SNX2a- Δ N (i-l), oder SNXCCRNAi (m-p). Die Proben d, h, l und p wurden für eine Stunde mit 10 μ M Wortmannin behandelt. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Maßstabsbalken = 5 μ m.

Durch Koexpression der SNX-Mutanten oder des RNAi-Konstrukts kam es zu einer signifikanten Änderung der Verteilung der PVC-Marker ARA6-RFP und GFP-BP80 von ca. 88 % kolokalisierenden Signalen in der Kontrolle zu etwa 80 % separaten Signalen (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Verteilung der PVC-Marker ARA6-RFP und GFP-BP80 in Kontrollprotoplasten oder SNX-Mutanten bzw. RNAi-Konstrukt exprimierenden Protoplasten (Das Diagramm repräsentiert die Tabelle. Anzahl der analysierten Protoplasten: 50)

ARA6-RFP/GFP-BP80	separat [%]	kolokalisiert [%]
Kontrolle	12 ± 5	88 ± 5
SNX2a-ΔN	79 ± 5	21 ± 5
SNX2a-ΔCC	85 ± 5	15 ± 5
SNXCCRNAi	79 ± 6	21 ± 6



3.5.3 Einfluss der SNX-Mutanten auf den vakuolären Transportweg

Nachdem die Sorting Nexine sowohl in Tabak als auch in *Arabidopsis* am TGN lokalisiert wurden und ein Einfluss der SNX-Mutanten sowie des RNAi-Konstrukts auf den vakuolären Sortierungsrezeptor gezeigt werden konnten, stellte sich nun die Frage, ob der Einfluss des Retromer-Transport von VSRs den Transport löslicher Proteine zur Vakuole inhibiert. Dies sollte zunächst mit Hilfe von quantitativen Proteintransportanalysen untersucht werden, um über die Beteiligung der Vps5-Orthologe am Transport zur Vakuole Aufschluss geben. Hierzu wurden zwei Derivate der α -Amylase (amy) als Reportermoleküle eingesetzt, die sich auf Grund ihres Transportweges grundsätzlich voneinander unterscheiden und anhand ihrer enzymatischen Aktivität detektiert werden (amy und amy-spo). Die α -Amylase wird ausgehend vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran sekretiert. Der zweite Reporter ist ein α -Amylase-Derivat, das am C-Terminus ein sequenzspezifisches vakuoläres Sortierungssignal (NPIRL) des Sporamins trägt (amy-spo). Dieses

Sortierungssignal wird im Golgi-Apparat vom VSR erkannt, worauf dieser Reporter über das PVC in die lytische Vakuole transportiert. Da für diesen Transport das Rezyklieren des VSR von zentraler Bedeutung ist, wird vermutet, dass eine Inhibierung des Retromer-vermittelten Rezeptor-Rezyklings zu einer Mangelsituation von verfügbaren VSRs führt, die direkte Auswirkungen auf den Transport von löslichen Proteinen des Reporters zur Vakuole hat. In diesem Fall wird amy-spo stattdessen ebenso wie die α -Amylase zur Plasmamembran sekretiert. Die auftretende Sekretion des Reporters amy-spo kann daher als Indiz für die Inhibierung des Rezeptor-Recyclings herangezogen werden. Die Droge Wortmannin inhibiert den Retromer-vermittelten Transport. Dies führt zu einem Zusammenbruch des Transportwegs zur Vakuole. Dadurch wird amy-lase-sporamin, das unter Kontrollbedingungen zur Vakuole transportiert und dort abgebaut wird, sekretiert und ist dann anhand ihrer endogenen enzymatischen Aktivität im Medium detektierbar. Dies führte zu einem massiven Anstieg des Sekretionsindex (Abb. 3.17 a). Eine Koexpression der SNX2a-Mutanten mit dem Reporter amy-spo führte zu keinem signifikanten Anstieg des Sekretionsindex (Abb. 3.17 c). Die Sorting Nexine haben demnach keinen mit Wortmannin vergleichbaren Effekt auf den Transport. Abbildung 3.17 b zeigt, dass durch die Expression der SNX-Mutanten auch kein signifikanter Abfall des Sekretionsindex der α -Amylase erfolgte. Die SNX2a-Mutanten hatten also auch keinen Einfluss auf die Sekretion.

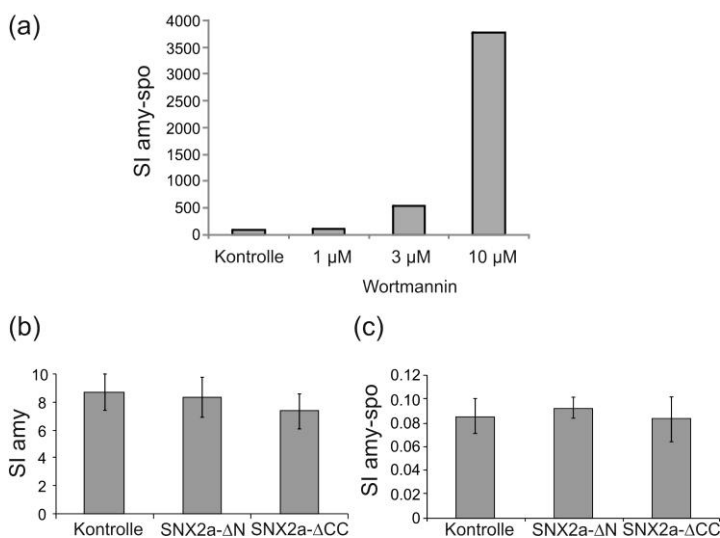


Abb. 3.17 Einfluss der SNX2a-Mutanten und Wortmannin auf die Sekretion von amy und den Transport von amy-spo. Auf der Y-Achse ist der Sekretionsindex aufgetragen, auf der X-Achse ist die Konzentration der Droge Wortmannin [μ M] aufgetragen (a) oder die zur Transformation eingesetzte Plasmid-DNA von 30 μ g für SNX2a- Δ N oder SNX2a- Δ CC (b, c). Die erste Spalte diente jeweils als Positivkontrolle. In den folgenden Spalten ist der Sekretionsindex von amy bzw. amy-sporamin bei Kotransformation der jeweiligen Plasmid-DNA gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (a: n=1a, b, c: n=5;)

Diese quantitativen Proteintransportanalysen zeigten, dass der Transport zur lytischen Vakuole unter Einfluss der SNX2a-Mutanten weiterhin erfolgte, obwohl der Rezeptor bei gleicher Konzentration von eingesetzter Plasmid-DNA im TGN akkumulierte (siehe Abb. 3.14). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde SNX2a- Δ CC mit dem vakuolären Marker GFP-sporamin koexprimiert und nach dem Ernten der Tabakprotoplasten GFP immunologisch nachgewiesen. GFP-sporamin besitzt das gleiche sequenzspezifische vakuoläre Sortierungssignal wie α -amylase-sporamin. Der Vorteil von GFP-sporamin ist darin zu sehen, dass es in der Vakuole degradiert wird und als sogenannter „GFP-Core“ mit 28 kDa detektiert werden kann (daSilva et al., 2005). Auf dem Weg zur Vakuole (im „Transit“) und ins Medium sekretiert ist es dagegen 40 kDa groß. Dies erlaubt eine präzise biochemische Analyse des vakuolären Transports. Tabakprotoplasten wurden mit GFP-sporamin alleine exprimiert, mit verschiedenen Konzentrationen von SNX2a- Δ CC koexprimiert oder in verschiedenen Konzentrationen von Wortmannin inkubiert.

Nach 24 h Inkubation wurden das Medium und die Zellen der Proben geerntet und mittels SDS-Page und folgendem Immunoblot analysiert. Abbildung 3.18 zeigt die mit GFP-Antikörpern detektierten Formen des GFP-sporamin in der Zellfraktion und im Kulturmedium. Bei einer Expression von GFP-sporamin in Kontrollprotoplasten war der Hauptanteil in der Vakuole und nur wenig als „Transitform“ oder im Kulturmedium zu finden. Eine Koexpression mit der SNX2a- Δ CC-Mutante erhöhte sowohl die Menge der „Transitform“ von GFP-sporamin in den Zellen als auch im Medium leicht. Der Transport von GFP-sporamin zur Vakuole war aber nicht inhibiert, obwohl bei einer Konzentration von 30 μ g Plasmid-DNA der Mutante der VSR BP80 in den vorigen Experimenten nicht mehr das PVC erreichte (siehe Abb. 3.14). In einem zusätzlichen Kontrollexperiment wurden die GFP-sporamin exprimierenden Protoplasten für 24 h in verschiedenen Konzentrationen von Wortmannin inkubiert. Wortmannin induziert die Sekretion von BP80-Liganden und verhindert so das Erreichen der Vakuole (daSilva et al., 2005; Pimpl et al., 2003; Pimpl et al., 2006). Während unter Einfluss von Wortmannin die ins Medium sekretierte Transitform von GFP-sporamin konzentrationsabhängig zunahm, erreichte immer weniger GFP-sporamin die Vakuole, und der GFP-Core verschwand (Abb. 3.18).

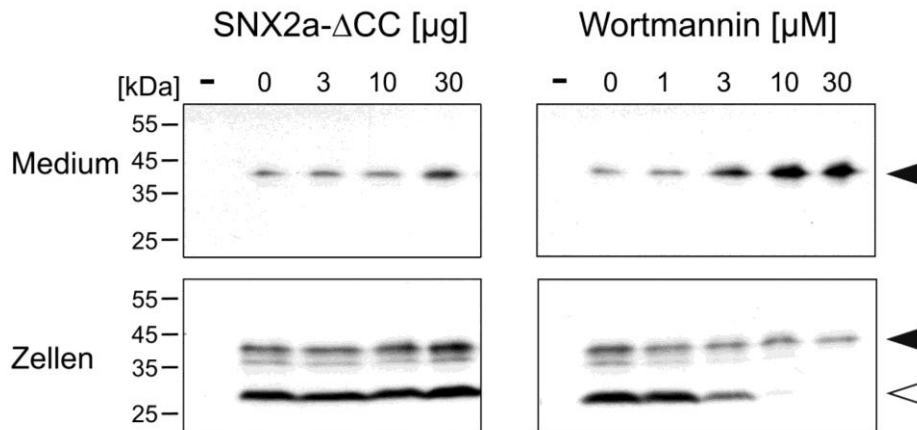


Abb. 3.18 Einfluss von SNX2a-ΔCC und Wortmannin auf das lösliche vakuoläre Reporterprotein GFP-sporamin. Immundetektion des vakuolären Reporters GFP-sporamin in Kulturmedium und gesamten Zellextrakt von Tabakprotoplasten, die entweder nur GFP-sporamin exprimierten (0) oder mit SNX2a-ΔCC in verschiedenen Plasmid-Konzentrationen (linke Spalte) koexprimierten. Als Kontrolle dienten Protoplasten, die in Wortmannin inkubiert wurden (rechte Spalte). Als Negativkontrolle (-) wurden nicht-transformierte Protoplasten verwendet. Schwarze Pfeile zeigen die „Transitform“ von GFP-sporamin (40 kDa), weiße Pfeile den „GFP-Core“ (28 kDa).

Die erhalten biochemischen Daten sollten nun durch konfokal-mikroskopische Untersuchungen *in vivo* überprüft werden. Im Vergleich zu den Kontrollen mit einem deutlich vakuolären Signal (Abb. 3.19 a, d) war der Anteil an vakuolären Reportern im „Transit“ erhöht, aber ein nur leicht schwächeres vakuoläres Signal erkennbar (Abb. 3.19 b, c, e, f). Die Koexpression der fluoreszierenden, vakuolären Reporter aleurain-GFP und GFP-sporamin mit den SNX2a-Mutanten in Tabakprotoplasten *in vivo* bestätigte das Ergebnis, dass der Transport zur Vakuole nicht vollständig inhibiert ist.

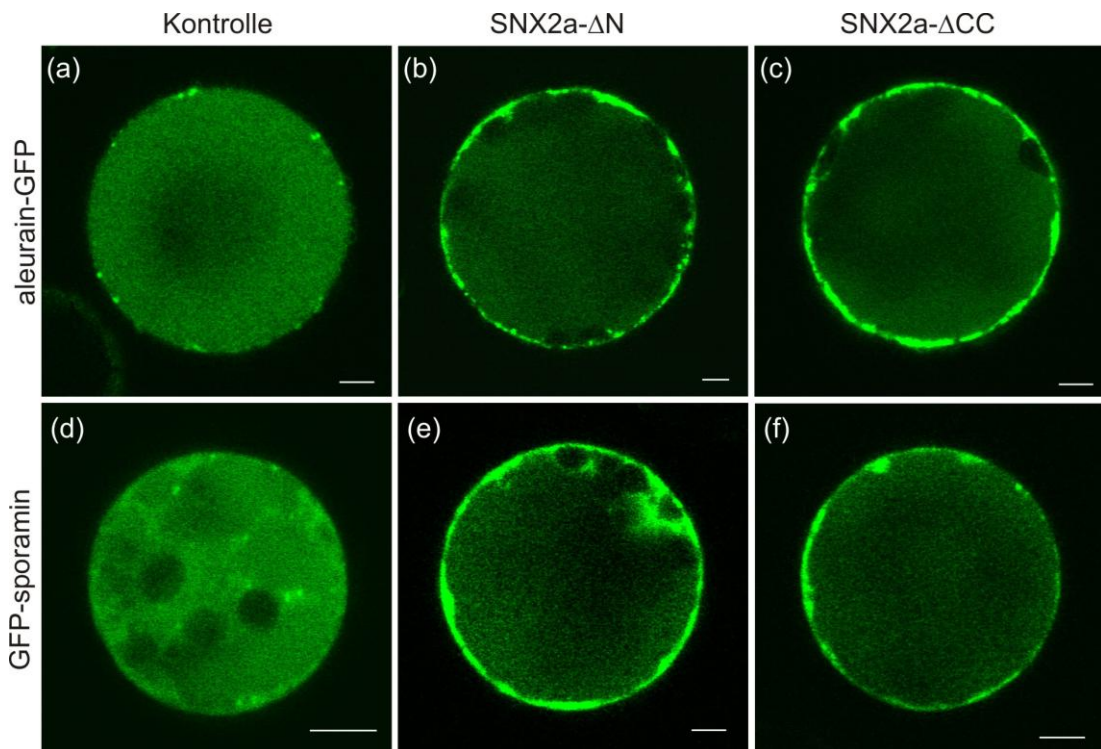


Abb. 3.19 Analyse des Einflusses der SNX-Mutanten auf die vakuolären Markerproteine aleurain-GFP und GFP-sporamin. Koexpression von aleurain-GFP (a-c) und GFP-sporamin (d-f) alleine (a, d) oder koexprimiert mit SNX2a-ΔN (b, e) oder SNX2a-ΔCC (c, f) in Tabakprotoplasten 16 h nach Transfektion. Maßstabsbalken = 5 μm.

Die SNX-Mutanten hatten also nur einen geringen Einfluss auf den Transport der Liganden zur Vakuole. Das könnte dadurch erklärt werden, dass die Sorting Nexine ein Homodimer bilden, um dem Effekt der SNX1- oder SNX2a-Mutante entgegenzuwirken.

Die Wirkung einer Inhibierung beider Sorting Nexine auf den VSR BP80 und den vakuolären Transportweg soll im Folgenden geklärt werden. Dies soll durch die Koexpression beider SNX-ΔCC-Mutanten (SNX1-ΔCC und SNX2a-ΔCC) oder beider SNX-ΔN-Mutanten (SNX1-ΔN und SNX2a-ΔN) gleichzeitig oder in einer alternativen Strategie durch ein RNAi-“knock-down“ der Sorting Nexine erreicht werden.

3.5.4 Einfluss der Koexpression zweier SNX-Mutanten auf den vakuolären Sortierungsrezeptor BP80

Die Expression einer der SNX-Mutanten führte zu einer Lokalisierung des PVC-Markers GFP-BP80 am TGN, während der vakuoläre Transport nur minimal beeinträchtigt wurde. Es besteht aber die Möglichkeit, dass das jeweils andere Sorting Nexin die Funktion des SNX1 bzw. SNX2a zumindest teilweise mittragen könnte. Um eine Inhibierung von SNX1 und SNX2 gleichzeitig zu erreichen, wurden zwei verschiedene Strategien angewandt. Zum Einen wurden jeweils beide SNX-ΔCC-

bzw. SNX- Δ N-Mutanten koexprimiert, zum Anderen wurde mit Hilfe des RNAi-Konstrukts aufgrund der hohen Homologie der CC-Domänen der SNXs alle Sorting Nexine inhibiert. Die schematischen Darstellungen in Abbildung 3.20 verdeutlichen den Effekt der Mutanten. Im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen können die SNX- Δ CC-Mutanten aufgrund der fehlenden CC-Domänen die zur Vesikelbildung wichtige Interaktion miteinander und damit mit der Membran nicht aufbringen. Die Δ N-Mutanten können nicht mit der großen Untereinheit des Retromer interagieren, da ihnen der N-Terminus fehlt. Das RNAi-Konstrukt hat zur Folge, dass die Genexpression aller drei Sorting Nexine beeinflusst wird, und dadurch kein Rezeptor transportiert werden kann. Durch die Koexpression zweier Mutanten oder des RNAi-Konstrukts wird die kleine Untereinheit des Retromer komplett inhibiert und folglich der Retromer-vermittelte Transport gehemmt.

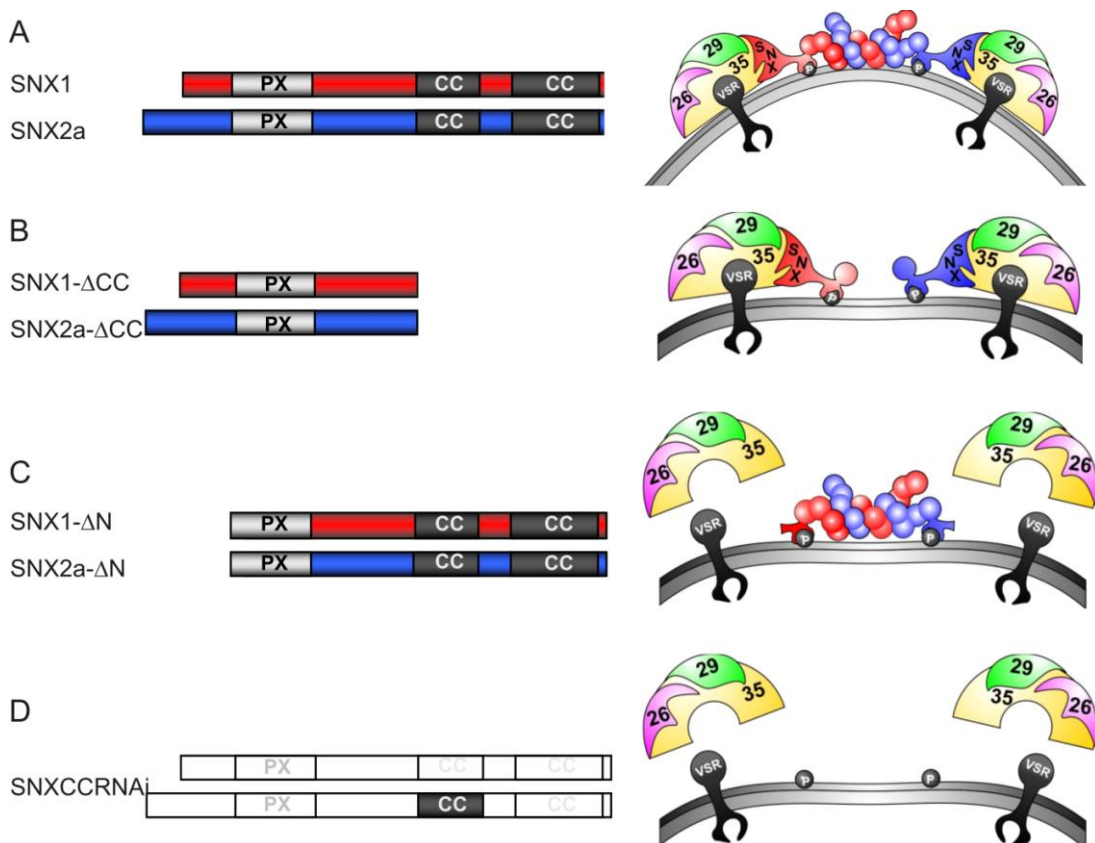


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der SNX-Mutanten und des SNXCCRNAi-Konstrukts. Schematische Darstellung der Konstrukte und des Retromerkomplexes mit interagierenden CC-Domänen zweier Sorting Nexine zur Verdeutlichung der Mutanten. A Wildtyp SNX1 und SNX2a mit ihren Domänen dargestellt. Schematische Darstellung der SNX- Δ CC-Mutanten (B), der SNX- Δ N-Mutanten (C) und des RNAi-Konstrukts (D). (Abkürzungen: N = N-terminus, PX = Phox homology-Domäne, CC = coiled-coil Domäne)

Tabakprotoplasten, die GFP-BP80 und Man1-RFP koexprimierten, zeigten separate Signale in Kontrollprotoplasten (Abb. 3.21 a-c). Im Gegensatz dazu erhielt man unter Einfluss beider dominant-negativer Mutanten SNX- Δ CC-Mutanten (SNX1- Δ CC und SNX2a- Δ CC) oder beider SNX- Δ N-Mutanten (SNX1- Δ N und SNX2a- Δ N) gleichzeitig exprimiert ein vergleichbares Marker-Muster (Abb. 3.21 d-i): Während der Golgi-Marker unverändert blieb, zeigte GFP-BP80 24 Stunden nach Transformation ein Signal im Endoplasmatischen Retikulum, d. h. eine Anreicherung des vakuolären Sortierungsrezeptors im ER.

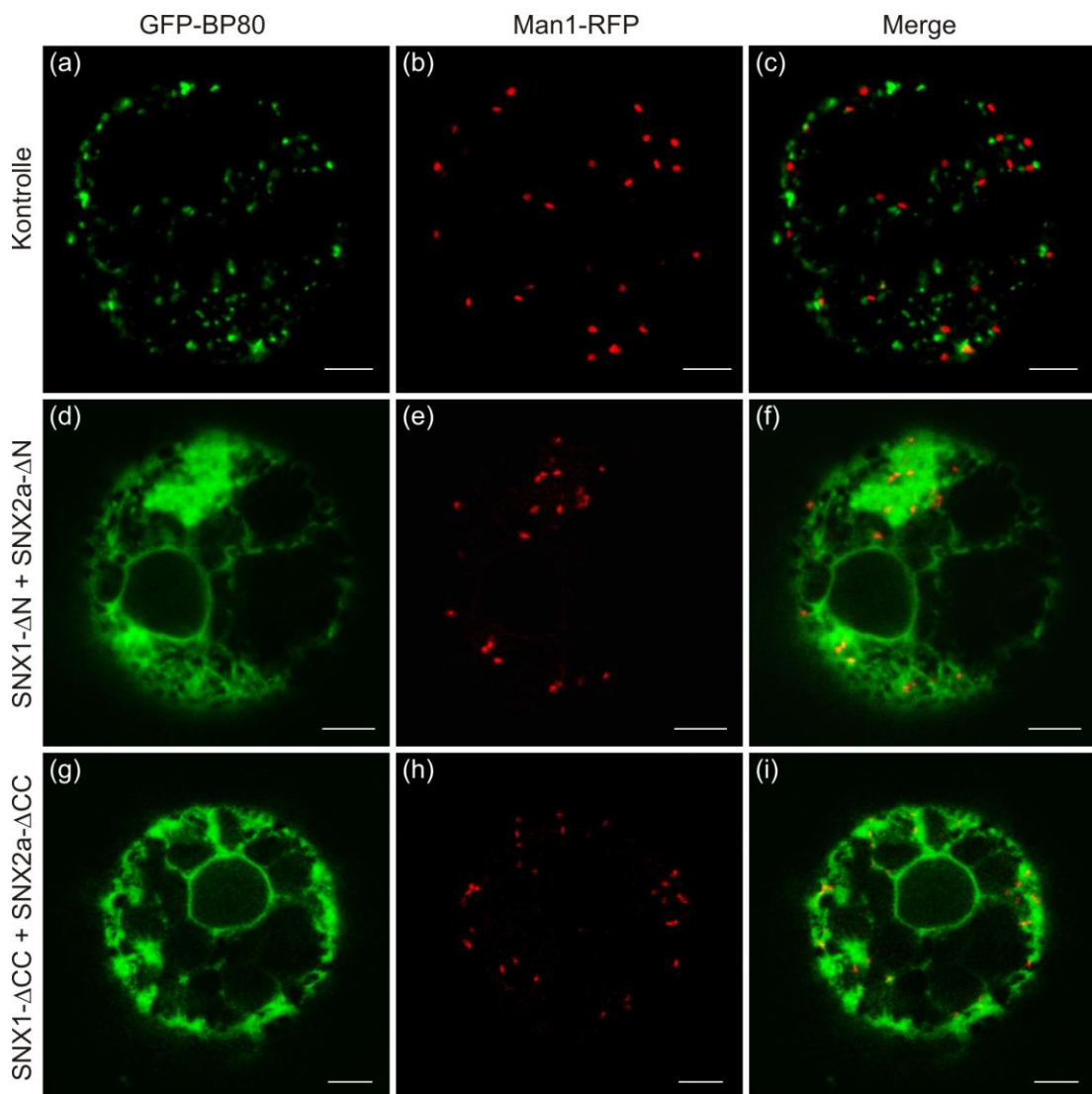


Abb. 3.21 Einfluss beider SNX-Mutanten auf die Verteilung der Markerproteine Man1-RFP und GFP-BP80. Koexpression von GFP-BP80 (grün) und Man1-RFP (rot) in Kontrollprotoplasten (a-c) oder koexprimiert mit den SNX1- Δ N und SNX2a- Δ N (d-f) oder SNX1- Δ CC und SNX2a- Δ CC (g-i). Maßstabsbalken = 5 μ m.

In Tabakprotoplasten wurden GFP-BP80 und Man1-RFP zusammen mit dem RNAi-Konstrukt SNXCCRNAi für 24 h koexprimiert. Der Golgi-Marker behielt sein punktiertes Signal bei, während der GFP-BP80 im ER lokalisiert war (Abb. 3.22 a-c). In *Arabidopsis*-Protoplasten hatte das RNAi-Konstrukt nach 24 h den gleichen Effekt (Abb. 3.22 g-i), während die entsprechende Kontrolle für beide Markerproteine ein punktiertes, benachbartes Signal zeigte (Abb. 3.22 d-f). Damit zeigten beide Mutantenkombinationen sowie das RNAi-Konstrukt den gleichen Phänotyp für den vakuolären Sortierungsrezeptor, nämlich eine Akkumulation im ER.

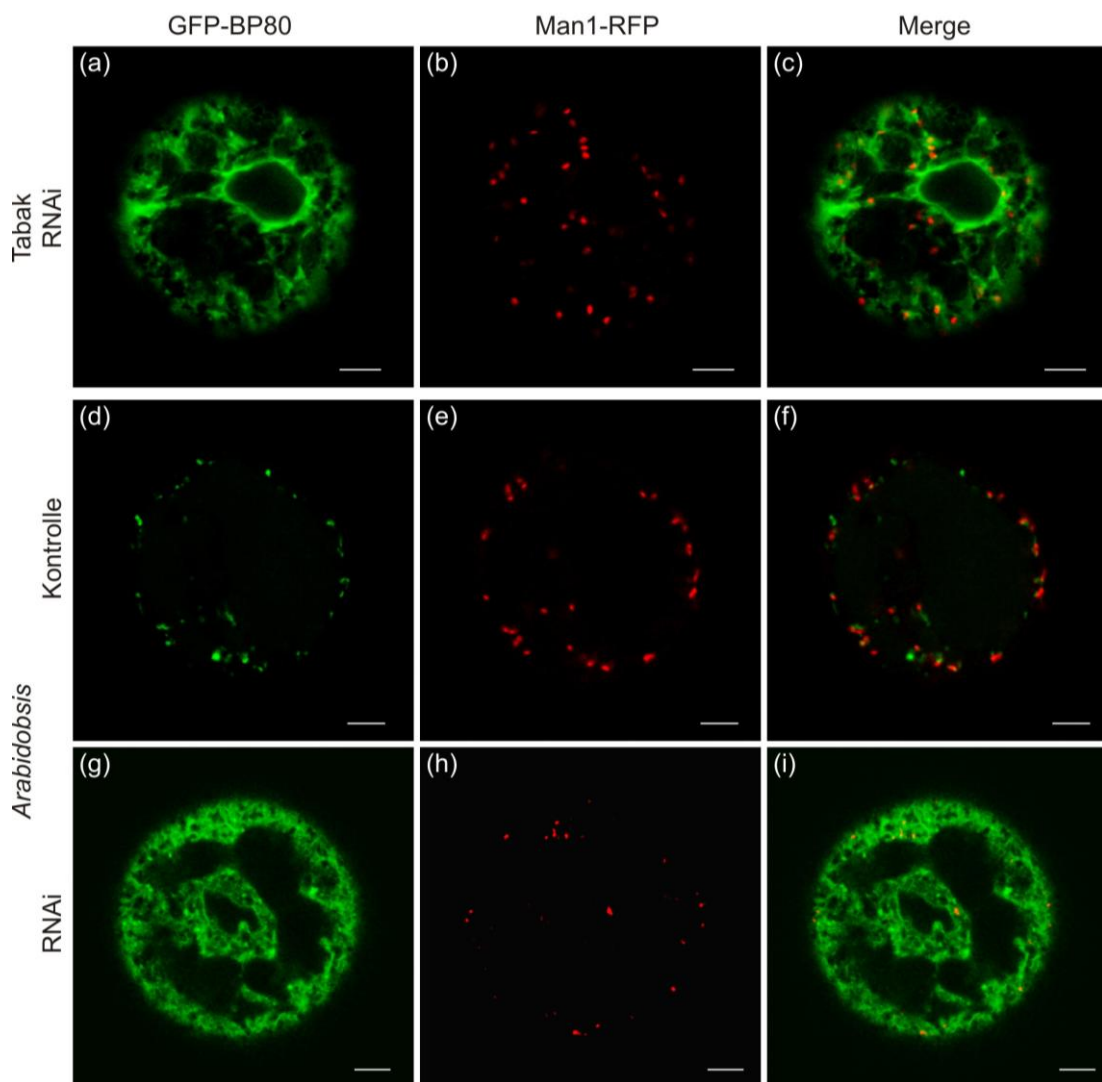


Abb. 3.22 Einfluss der Inhibierung aller Sorting Nexine mittels RNAi-„knock-down“ auf die Verteilung der Markerproteine Man1-RFP und GFP-BP80. Koexpression von GFP-BP80 (grün), Man1-RFP (rot) und SNXCCRNAi in Tabak-Protoplasten (a-c). Koexpression von GFP-BP80 (grün), Man1-RFP (rot) alleine (d-f) und mit SNXCCRNAi (g-i) in *Arabidopsis*-Protoplasten. Maßstabsbalken = 5 μ m.

In Tabak-Protoplasten 16 h nach Transformation zeigte GFP-BP80 unter Einfluss des RNAi-Konstrukts noch ein punktiertes, aber vom PVC-Marker ARA6-RFP separates Signal (siehe Abb. 3.16 m-p). Nach 24 Stunden Koexpression mit dem RNAi-Konstrukt hingegen wurde für GFP-BP80 ein Signal am ER erhalten (siehe Abb. 3.22 a-c). Dieser unterschiedliche Effekt der Inhibierung aller Sorting Nexine mittels RNAi-„knock-down“ sollte im Folgenden näher untersucht werden. Hierzu wurden der PVC-Marker GFP-BP80 und der Golgi-Marker Man1-RFP entweder in Kontrollprotoplasten oder zusätzlich mit dem RNAi-Konstrukt koexprimiert und über einen Zeitraum von 6-24 h nach der Transfektion mittels CLSM untersucht (Abb. 3.23).

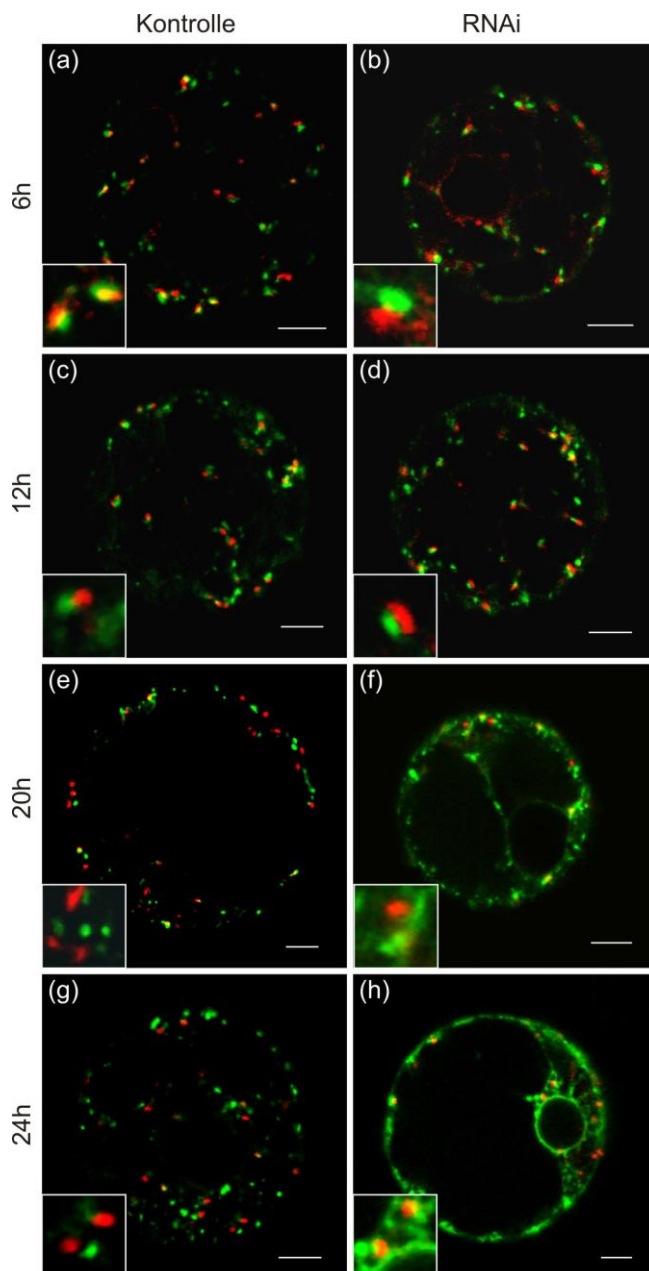


Abb. 3.23 Einfluss des SNX-RNAi auf die Verteilung der Markerproteine Man1-RFP und GFP-BP80 über einen Zeitraum von 6-24 h. Koexpression von GFP-BP80 (grün), Man1-RFP (rot) als Kontrolle (erste Spalte) oder mit SNXCCRNAi (zweite Spalte) in Tabak-Protoplasten 6, 12, 20 und 24 h nach Transformation. Maßstabsbalken = 5 μ m.

Die Marker in Kontrollprotoplasten und in Protoplasten, die das RNAi-Konstrukt überproduzierten, wurden 6 h nach der Transformation sehr nah beieinander vorgefunden (Abb. 3.23 a-d). Erst nach 20-24 h lagen die beiden Signale in der Kontrolle separiert vor (Abb. 3.23 e, g). Der PVC-Marker war nach kurzer Expression vermutlich im TGN lokalisiert und reicherte sich erst nach und nach im PVC an, bis dieses Signal schließlich überwiegte. Protoplasten, die das RNAi-Konstrukt exprimierten, zeigten das punktierte Signal des GFP-BP80 in der Nähe des Golgi-Markers und damit am TGN (6-12 h), nach 20 h ein beginnendes und nach 24 h ein vollständiges ER-Signal (Abb. 3.23 f, h). Im Gegensatz dazu wurde der Golgi-Marker zu keinem Zeitpunkt beeinflusst. Es lag also keine generelle Inhibierung des ER-Exports vor. Es stellte sich nun die Frage, ob es sich bei dem im ER lokalisierten GFP-BP80 um neusynthetisiertes handelte oder um ein Anreichern im ER, z. B. durch Verschmelzung eines anderen Kompartiments mit dem ER. Im Falle einer ER-Akkumulation durch Neusynthese dürfte GFP-BP80 in diesem Fall kein Signal im ER zeigen, sondern weiterhin punktiert vorliegen. Mit Hilfe des Proteinsynthese-Hemmers Cycloheximid sollte dies nun geklärt werden. Nach 12 h Expression wurden den Protoplasten Cycloheximid hinzugefügt und weitere 12 h inkubiert (Abb. 3.24).

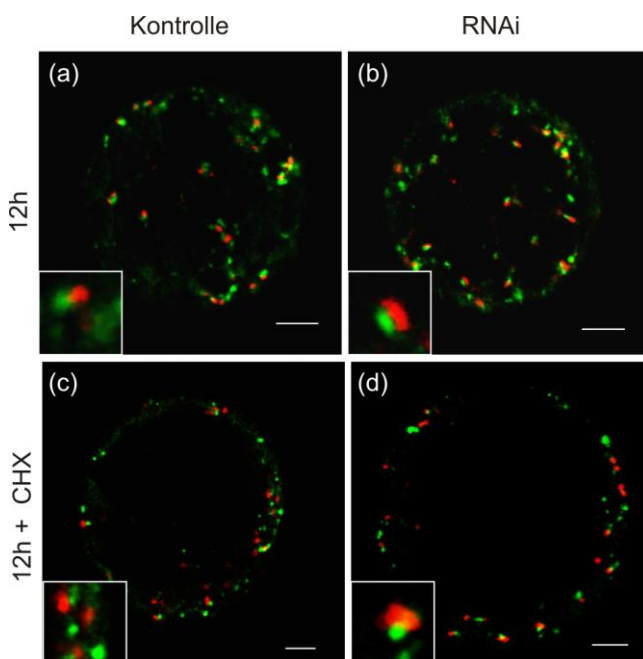


Abb. 3.24 Die Inhibierung der Proteinsynthese verhinderte das Erscheinen von GFP-BP80 im ER. Koexpression von GFP-BP80 (grün), Man1-RFP (rot) ohne (erste Spalte) und mit SNXCCRNAi (zweite Spalte) in Tabak-Protoplasten. Nach 12 h waren die Golgi- und PVC-Signale der Kontrolle und der Probe mit RNAi-Konstrukt nah beieinander (a, b). Nach weiteren 12 h Inkubation mit dem Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid (CHX) zeigte die Kontrolle separate Signale und auch die Probe mit dem RNAi-Konstrukt zeigte kein Signal im ER, sondern punktierte, benachbarte Signale. Maßstabsbalken = 5 µm.

Die Protoplasten der Kontrolle veränderten ihr Signal von benachbarten zu separaten PVC- und Golgi-Markern (Abb. 3.24 a, c). Die RNAi-Probe zeigte keinen ER-Phänotyp, sondern weiterhin ein zum Golgi-Apparat benachbartes, punktiertes Signal (Abb. 3.24 b, d). Das Erscheinen des VSR-Reporters im ER kam demnach durch neu synthetisiertes GFP-BP80 zustande, das dort akkumulierte, da es das ER nicht verlassen konnte. Diese Inhibierung schien spezifisch für den VSR-Reporter zu sein, da der Golgi-Marker weiterhin unbehindert den Golgi-Apparat erreichen konnte. Dies sollte nun in einem weiteren Experiment quantitativ analysiert werden. Mit Hilfe des Reporters α -Amylase konnte die Behauptung bestätigt werden, da die Sekretion der α -Amylase nicht gestört wurde, wenn die beiden ΔN -, die beiden ΔCC -Mutanten oder das RNAi-Konstrukt mit dem Reporter koexprimiert wurden (Abb. 3.25). Im Falle einer Inhibierung der Sekretion wäre der Sekretionsindex niedriger als in der Kontrolle gewesen.

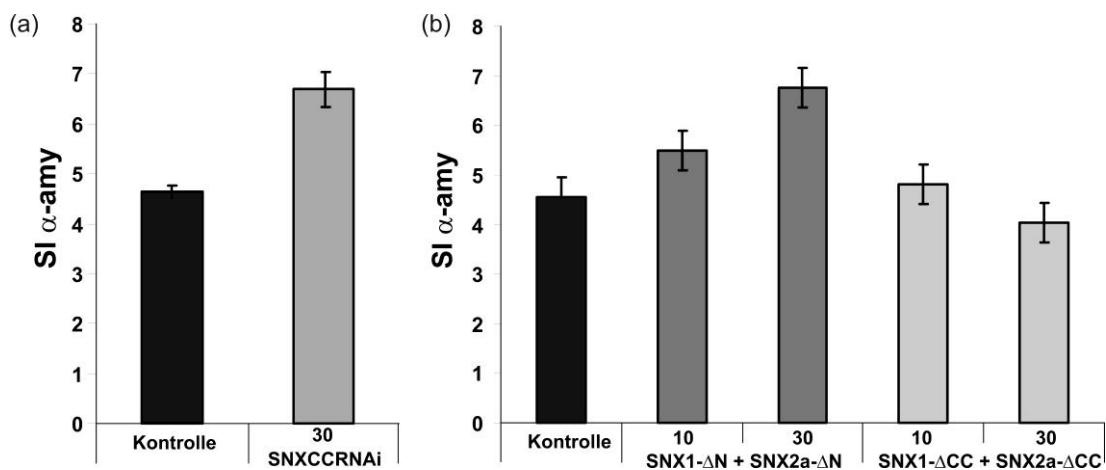


Abb. 3.25 Einfluss der SNX-Mutanten und des RNAi-Konstrukts auf die Sekretion von α -Amylase. Auf der Y-Achse ist der Sekretionsindex aufgetragen, auf der X-Achse ist die Konzentration oder die zur Transformation eingesetzte Plasmid-DNA in $[\mu\text{g}]$ an SNXCCRNAi (a) und für beide SNX- ΔN -Mutanten oder beide SNX- ΔCC -Mutanten (b). Die erste Spalte diente jeweils als Kontrolle. In den folgenden Spalten ist der Sekretionsindex von amy bei Kotransformation der jeweiligen Plasmid-DNA gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (n = 5)

3.5.5 Einfluss der Koexpression beider SNX-Mutanten auf den vakuolären Transportweg

Durch Inhibierung beider bzw. aller Sorting Nexine akkumulierte der vakuoläre Sortierungsrezeptor im ER, während die Sekretion nicht beeinflusst wurde. Im Folgenden sollte der Einfluss auf den vakuolären Transport durch quantitative Proteinanalysen, immunologischen Proteinnachweis und konfokale Mikroskopie untersucht werden. Proteinanalysen mit dem Reporter amy-spo zeigten einen um etwa die Hälfte erhöhten Sekretionsindex bei Inhibierung beider bzw. aller Sorting Nexine durch Expression beider SNX- Δ N- oder SNX- Δ CC-Mutanten oder des RNAi-Konstrukts (Abb. 3.26). Dies wies darauf hin, dass ein Teil des exprimierten Reporters amy-spo in das Medium sekretiert wurde anstatt die Vakuole zu erreichen.

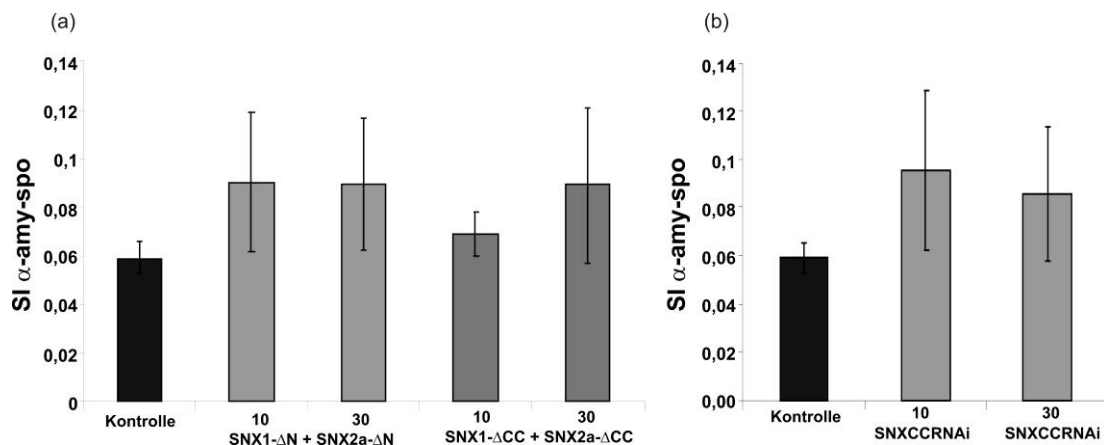


Abb. 3.26 Einfluss der Inhibierung beider bzw. aller SNXs auf amy-spo. Auf der Y-Achse ist der Sekretionsindex aufgetragen, auf der X-Achse ist die zur Transformation eingesetzte Plasmid-DNA in [μg] an SNXCCRNAi (b) und für beide SNX- Δ N-Mutanten oder beide SNX- Δ CC-Mutanten (a) angegeben. Die erste Spalte zeigte die Kontrolle. In den folgenden Spalten ist der Sekretionsindex von amy-spo bei Kotransformation der jeweiligen Plasmid-DNA gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (n = 3)

Der Sekretionsindex erhöhte sich gegenüber dem Einfluss der Droge Wortmannin nur leicht. Daher wurde zur genaueren Erfassung des Effekts das Konstrukt SNXCCRNAi mit dem vakuolären Marker GFP-sporamin koexprimiert und nach dem Ernten der Tabakprotoplasten GFP immunologisch nachgewiesen. Hierfür wurden Tabakprotoplasten mit GFP-sporamin mit verschiedenen Konzentrationen des RNAi-Konstrukts koexprimiert, und nach 24 h Inkubation das Medium und die Zellen der Proben geerntet. Die Proben wurden mittels SDS-Page und folgendem Immu-

noblots analysiert. Abbildung 3.27 zeigt die mit GFP-Antikörpern detektierten Formen des GFP-sporamin in der Zellfraktion und im Kulturmedium. Bei einer Expression von GFP-sporamin in Kontrollprotoplasten war der Hauptanteil in der Vakuole und nur wenig als „Transitform“ auf dem Weg zur Vakuole oder im Kulturmedium zu finden. Durch die Expression beider SNX- Δ CC- oder beider SNX- Δ N-Mutanten konnte etwas mehr GFP-sporamin im Medium und im „Transit“ detektiert werden. Der GFP-Core war mit dem der Kontrolle vergleichbar. Eine Koexpression mit dem RNAi-Konstrukt erhöhte die Menge von GFP-sporamin im Medium deutlich. Der Transport von GFP-sporamin zur Vakuole war aber trotz allem nicht inhibiert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Effekt der Inhibierung der SNXs zeitlich verzögert einsetzte, wenn bereits ein Großteil des GFP-sporamin die Vakuole erreicht hatte.

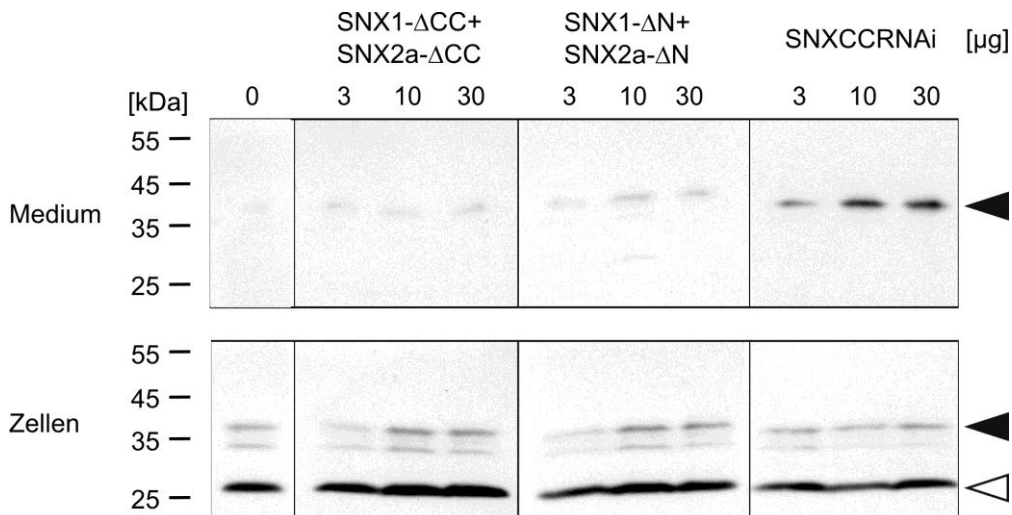


Abb. 3.27 Einfluss der Inhibierung der SNXs auf GFP-sporamin. Immundetektion des vakuolären Reporters GFP-sporamin in Kulturmedium und totalem Zellextrakt von Tabakprotoplasten, die GFP-sporamin alleine exprimierten (0) oder mit beiden SNX- Δ CC oder SNX- Δ N-Mutanten in verschiedenen Plasmid-Konzentrationen oder dem RNAi-Konstrukt SNXCCRNAi koexprimierten. Schwarze Pfeile zeigen die „Transitform“ von GFP-sporamin (40 kDa), weiße Pfeile den „GFP-Core“ (28 kDa).

Die erhaltenen biochemischen Daten sollten nun durch konfokal-mikroskopische Untersuchungen *in vivo* überprüft werden. Hierzu wurde einer der beiden vakuolären Reporter aleurain-GFP oder GFP-sporamin zusammen mit den SNX-Mutanten oder dem RNAi-Konstrukt in Tabakprotoplasten koexprimiert. Im Vergleich zu den Kontrollen mit dem vakuolären Signal (Abb. 3.28 a, b) war kein vakuoläres Signal

mehr sondern eine Akkumulation der vakuolären Reporter im ER zu erkennen (Abb. 3.28 c-h).

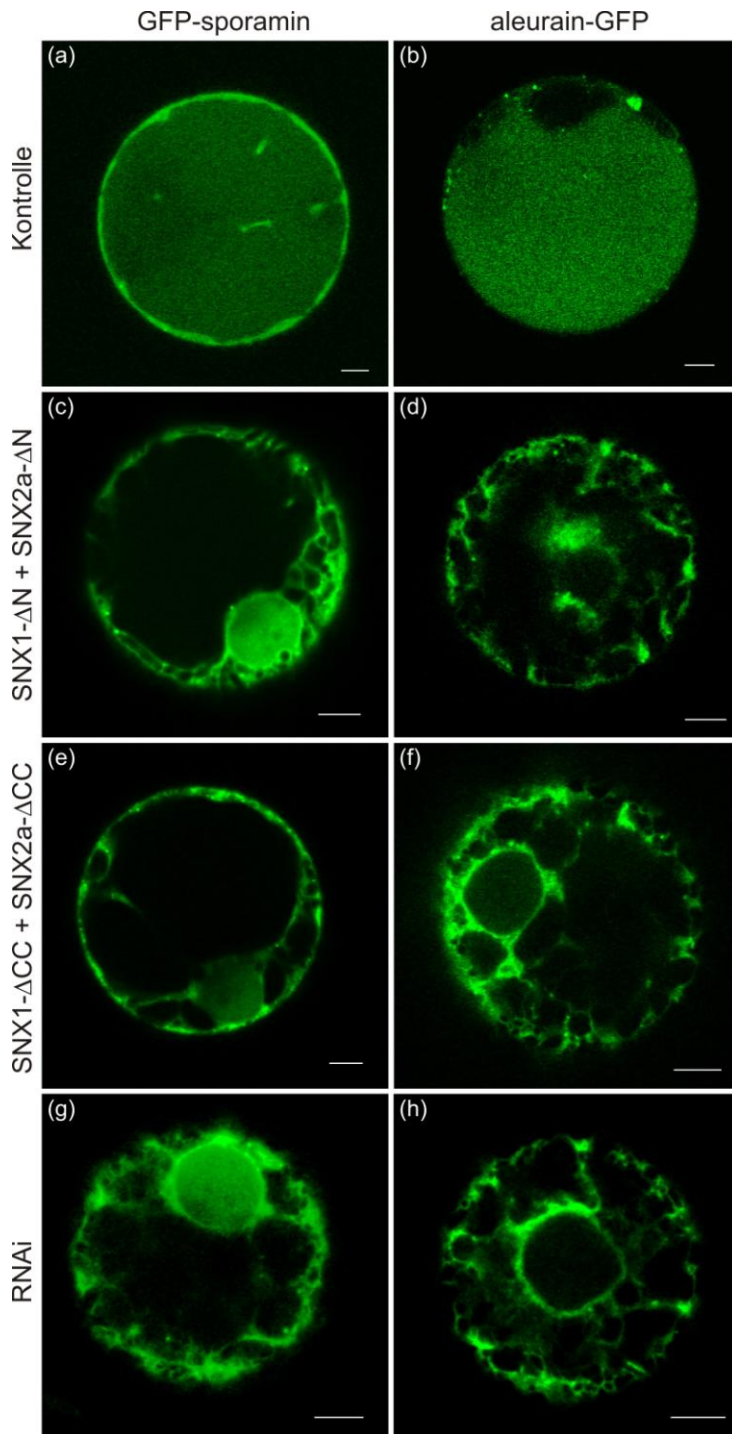


Abb. 3.28 Analyse des Einflusses der SNX-Mutanten und des RNAi-Konstrukts auf die vakuolären Markerproteine aleurain-GFP und GFP-sporamin. Koexpression von GFP-sporamin (linke Spalte) und aleurain-GFP (rechte Spalte) in Kontrollprotoplasten exprimiert (a, b) oder koexprimiert mit den beiden SNX-ΔN-Mutanten (c, d) oder SNX-ΔCC-Mutanten (e, f) oder SNXCCRNAi (g, h) in Tabakprotoplasten 24 h nach Transfektion. Maßstabsbalken = 5 μ m.

Die Hemmung beider bzw. aller SNXs hatte also einen inhibierenden Effekt auf den Transport der Liganden zur Vakuole. Zusammenfassend ist demnach zu sagen, dass sowohl der vakuoläre Sortierungsrezeptor als auch dessen Liganden am ER akkumulierten.

3.6 Rezeptor-Liganden-Interaktion

Durch die Inhibierung des Retromerkomplexes kam es zu einer Anreicherung der vakuolären Reporter und vakuolären Sortierungsrezeptors im ER. Daraus ergibt sich die Frage, wie es möglich sein soll, dass lösliches Cargo sich in diesem Ausmaße im ER entgegen des „bulk-flow“ anreichern konnte. Eine Vermutung wäre, dass das Cargo mit dem endogenen, funktionellen VSR BP80 interagieren könnte. Das Reporter-Konstrukt GFP-BP80 hingegen besitzt keine luminal Bindungs-Domäne (LBD) wie der Wildtyp BP80 und kann daher nicht mit Liganden interagieren (siehe Abb. 3.30). Das Grundprinzip der Rezeptor-Liganden-Interaktion ist in Abbildung 3.29 dargestellt. In einem Donor-Kompartiment bindet der Ligand an den Rezeptor und beide werden zum Akzeptor-Kompartiment transportiert. Im Akzeptor-Kompartiment wird der Ligand zum weiteren Transport entlassen, während der Rezeptor zurück zum Donor-Kompartiment rezykliert wird. So ist es möglich, dass der Rezeptor erneut mit Liganden interagieren kann und so für weitere Transportvorgänge genutzt wird. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Rezeptor-Liganden-Interaktion bereits am ER stattfinden könnte, obwohl bisher vermutet wurde, dass diese Bindung erst im *trans*-Golgi-Apparat geschieht. Wenn die VSR-Liganden-Interaktion bereits im ER stattfände, müsste ein im ER lokalisiertes funktionelle VSR zu einer Akkumulierung des löslichen, vakuolären Cargos führen. Liganden würden den Rezeptor dann im ER binden, dieses aber nicht verlassen können und sich dort anreichern. Dieses würde jedoch eine Rezeptor-Liganden-Interaktion bereits im Lumen des ER voraussetzen. Um dies zu überprüfen wurden die in Abbildung 3.30 gezeigten BP80-Konstrukte, die im ER verbleiben, hergestellt.

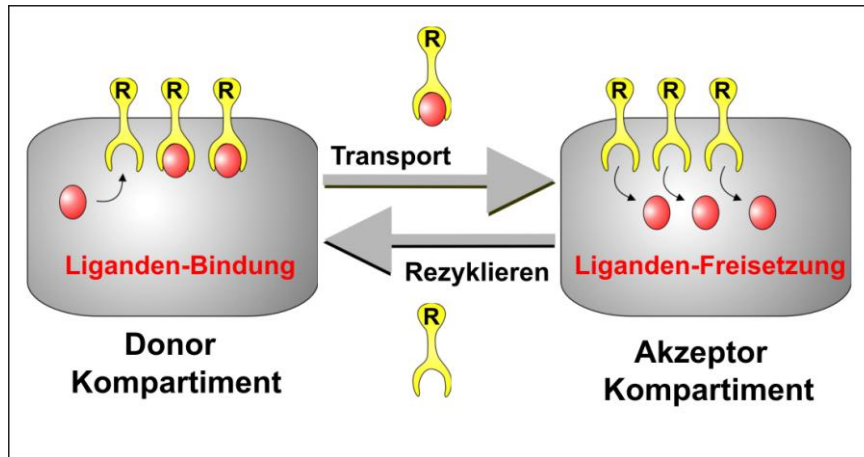


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der Rezeptor-Liganden-Interaktion. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor (R) im Donor-Kompartiment werden sie zum Akzeptor-Kompartiment transportiert. Nach Freisetzung des Liganden rezykliert der Rezeptor.

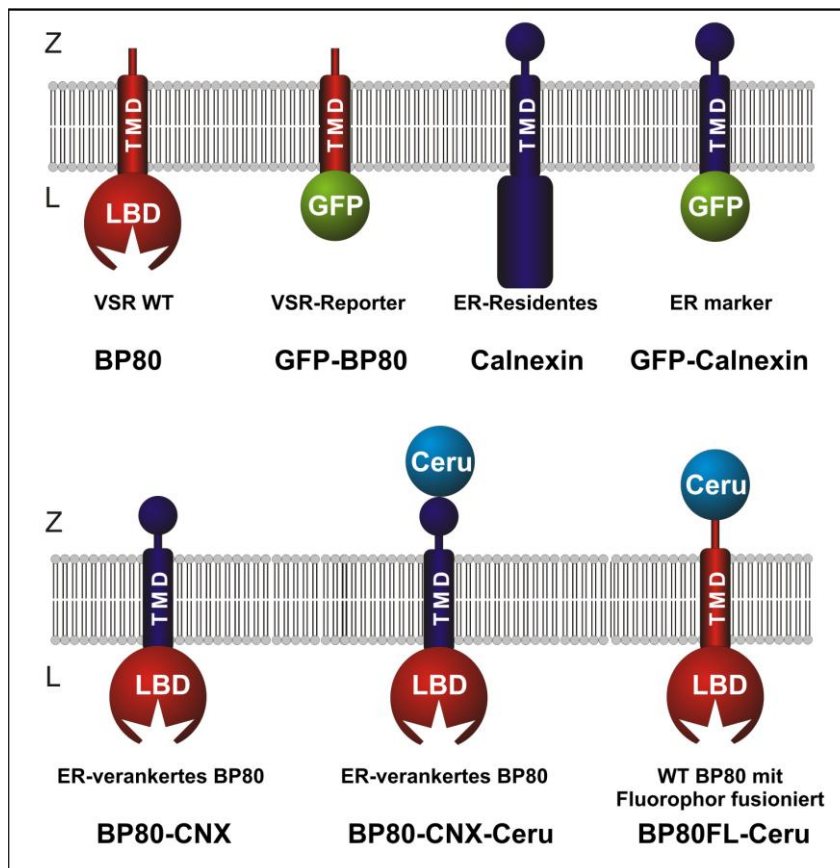


Abb. 3.30: Schematische Darstellung der BP80-Konstrukte. Die Chimäre BP80-CNX besteht aus der Transmembran-Domäne (TMD) sowie dem zytosolischen Ende von Wildtyp Calnexin und der Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) des Wildtyp BP80. Dieses Konstrukt wurde mit Cerulean am zytosolischen Ende fusioniert und als BP80-CNX-Cerulean bezeichnet. Die Fusion von Cerulean an Wildtyp BP80 ergab das Konstrukt BP80FL-Cerulean. (Z = Zytosol, L = Lumen, Ceru = Cerulean)

Der PVC-Marker GFP-BP80 (daSilva et al., 2005) hat anstatt der luminalen Bindungsdomäne (LBD) von Wildtyp BP80 das grün-fluoreszierende Protein GFP. Daher kann GFP-BP80 nicht mit den Liganden interagieren. Der etablierte ER-Marker GFP-Calnexin besteht aus der Transmembran-Domäne (TMD) und der zytosolischen Domäne des Chaperons Calnexin (CNX), die mit dem Fluorophor GFP fusioniert wurden (daSilva et al., 2005). Ziel war es einen artifiziellen ER-lokalisierten Rezeptor zu konstruieren. Die hierfür hergestellte Chimäre BP80-CNX setzt sich daher zusammen aus der TMD und dem zytosolischen Ende des Calnexin sowie der LBD von BP80. Durch Fusion mit Cerulean am zytosolischen Ende wurde BP80-CNX-Cerulean konstruiert. Als alternativer Fluorophor wurde mKate fusioniert. Diese drei Konstrukte müssten aufgrund der Transmembran-Domäne von Calnexin im ER lokalisiert sein (Brandizzi et al., 2003).

Zusätzlich zu den aus Domänen von BP80 und Calnexin zusammengesetzten Chimären wurde ein Konstrukt hergestellt, das in seiner Struktur dem Wildtyp-Rezeptor am nächsten kommt. Auf Grund der Resultate für dieses als BP80FL-Cerulean bezeichnete Konstrukt kann dann am sichersten auf die Funktion des Wildtyp-BP80 geschlossen werden. Bei BP80FL-Cerulean handelt es sich um ein fluoreszierendes BP80 in kompletter Länge inklusive aller Domänen, an dessen zytosolisches Ende Cerulean fusioniert wurde. Diese drei neuen Konstrukte besitzen alle die luminale Bildungs-Domäne von BP80 und müssten daher Liganden binden können.

3.6.1 Lokalisierung der BP80-Konstrukte

Die neuen BP80-Konstrukte sollten zunächst lokalisiert werden. Auf Grund der Transmembran-Domäne des ER-Residenten Calnexin wurde eine Lokalisierung im ER vermutet. Um dies zu überprüfen, wurde BP80-CNX-Cerulean zusammen mit dem ER-Marker p24-RFP in Tabakprotoplasten koexprimiert und konfokalmikroskopisch analysiert. Beide Signale überlagerten im Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3.31 a-c). Durch Koexpression des Golgi-Markers Man1-RFP konnte gezeigt werden, dass der ER-Export nicht komplett inhibiert wurde, da Man1-RFP den Golgi-Apparat erreichte (Abb. 3.31 d-f). Im Gegensatz zu GFP-BP80, das ein punktförmiges Signal am PVC zeigt (daSilva et al., 2005), wurde BP80FL-Cerulean mit dem ER-Marker p24-RFP am ER lokalisiert (Abb. 3.31 g-i). Alle drei BP80-Konstrukte befanden sich also im Endoplasmatischen Retikulum. Im nächsten Schritt sollten die BP80-Konstrukte biochemisch analysiert werden.

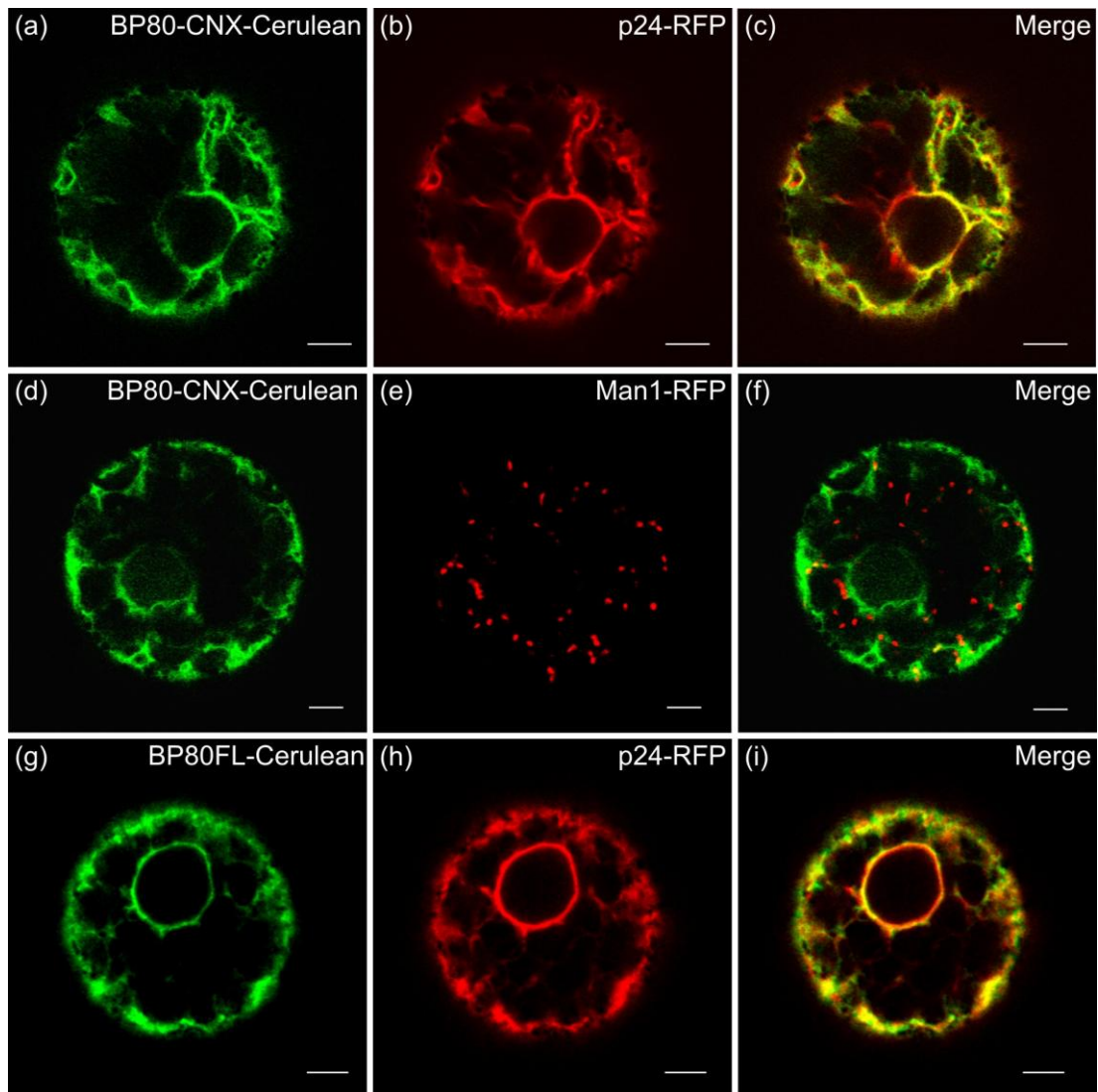


Abb. 3.31 Die BP80-Konstrukte sind in Tabak-Protoplasten am ER lokalisiert. Koexpression von BP80-CNX-Cerulean (grün) und BP80FL-Cerulean (grün) mit verschiedenen Markerproteinen (rot). (a-c) Koexpression von BP80-CNX-Cerulean mit dem ER-Marker p24-RFP. (d-f) Koexpression von BP80-CNX-Cerulean mit dem Golgi-Marker Man1-RFP. (g-i) Koexpression von BP80FL-Cerulean und dem ER-Marker p24-RFP. Überlappende rote und grüne Signale erscheinen gelb. Maßstabsbalken = 5 μm .

3.6.2 Funktionelle Charakterisierung der BP80-Konstrukte

Da die BP80-Konstrukte im ER lokalisiert waren, sollte im nächsten Schritt die Interaktion mit Liganden und der Einfluss auf den sekretorischen Transportweg im Allgemeinen analysiert werden. Eine Überproduktion der Proteine kann den Transport beeinflussen, in dem es z. B. zu einer Akkumulierung im ER kommt. Obwohl kein Effekt auf den Golgi-Marker vorherrschte (Abb. 3.31 d-f), wurden die BP80-Konstrukte in quantitativen Proteintransportanalysen (α -Amylase-Assays) auf eine mögliche Inhibierung der Sekretion untersucht. Eine Inhibierung des ER-Export

würde zu einer extremen Verringerung des Sekretionsindex von α -Amylase führen, da es zu einer Anreicherung von α -Amylase in den Zellen käme. Die ER-lokalisiereten BP80- Konstrukte verminderten den Sekretionsindex der α -Amylase nicht (Abb. 3.32). Demnach hatte keine der BP80-Chimären eine generelle Inhibierung des ER-Exports zur Folge.

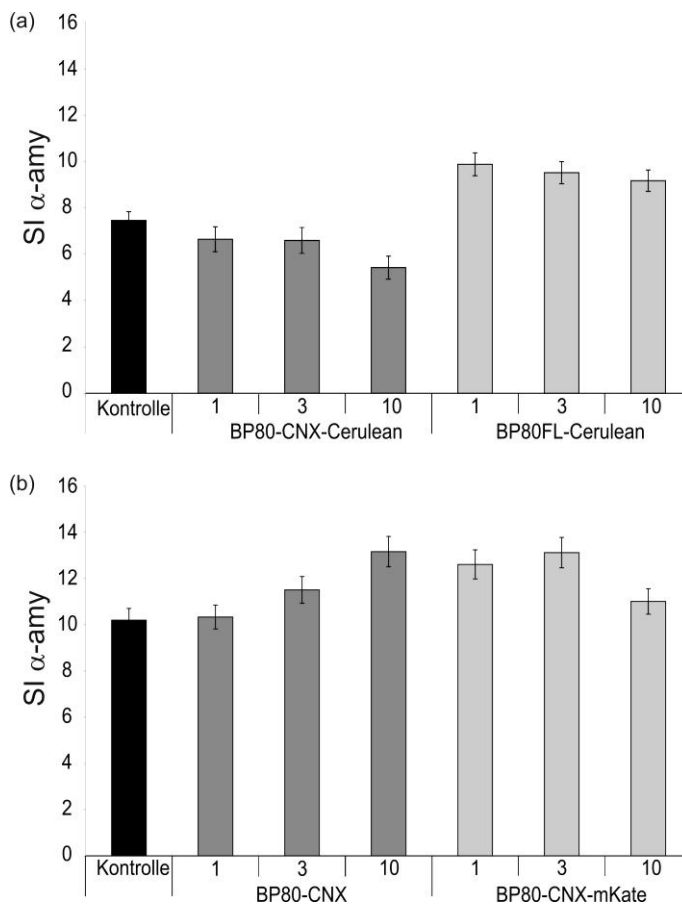


Abb. 3.32 Einfluss der BP80- Konstrukte auf die Sekretion von α -Amylase. Auf der Y-Achse ist der Sekretionsindex aufgetragen, auf der X-Achse ist die Konzentration oder die zur Transformation eingesetzte Plasmid-DNA in μ g angegeben. (a) Koexpression von α -Amylase mit BP80-CNX-Cerulean bzw. BP80FL-Cerulean. (b) Koexpression von α -Amylase mit BP80-CNX oder BP80-CNX-mKate. Die erste Spalte zeigt jeweils die Kontrolle. In den folgenden Spalten ist der Sekretionsindex von amy bei Kotransformation der angegebenen Plasmid-DNA gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (n = 4)

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die BP80-Konstrukte mit Liganden interagieren können. Dies soll mit Hilfe der folgenden biochemischen Analyse gezeigt werden. Für den VSR-Reporter GFP-BP80 wurde vermutet, dass er in Konkurrenz mit dem Transport durch endogenes BP80 steht und dadurch die Sekretion des vakuolären Reporters α -Amylase-sporamin zur Folge hat (daSilva et al., 2005). Dies ist

darauf zurückzuführen, dass GFP-BP80 nicht dazu in der Lage ist, Liganden zu binden. Durch Überproduktion des Wildtyp BP80 ließ sich die Wirkung der Droge Wortmannin auf den vakuolären Transportweg abschwächen, wodurch der Sekretionsindex sank (daSilva et al., 2005). Das bedeutet, dass es eine Interaktion zwischen Wildtyp-BP80 und Liganden gibt. Im Gegenzug dazu erhöhte sich der Sekretionsindex bei Koexpression von GFP-BP80 noch weiter (daSilva et al., 2005), d. h. GFP-BP80 konnte nicht mit den Liganden interagieren. Dieses System soll nun angewendet werden, um die Fähigkeit der BP80-Konstrukte BP80FL-Cerulean und BP80-CNX zur Liganden-Bindung zu analysieren. Durch die Behandlung mit 10 μM Wortmannin erhöhte sich der Sekretionsindex von α -amylase-sporamin im Vergleich zur Kontrolle um ein Vielfaches (Abb. 3.33). Dieser Wortmannin-Hintergrund wurde für alle weiteren Proben beibehalten. Zusätzlich zum Reporter wurden BP80, GFP-BP80 als Konkurrent des endogenen BP80 und die BP80-Konstrukte BP80FL-Cerulean und BP80-CNX in verschiedenen Konzentrationen koexprimiert und über Nacht in 10 μM Wortmannin inkubiert. Die beiden BP80-Konstrukte erhöhten den Sekretionsindex nicht weiter, sondern verringerten die Wirkung der Droge Wortmannin ähnlich wie BP80 (Abb. 3.33). Dies ließ darauf schließen, dass sie mit Liganden interagierten.

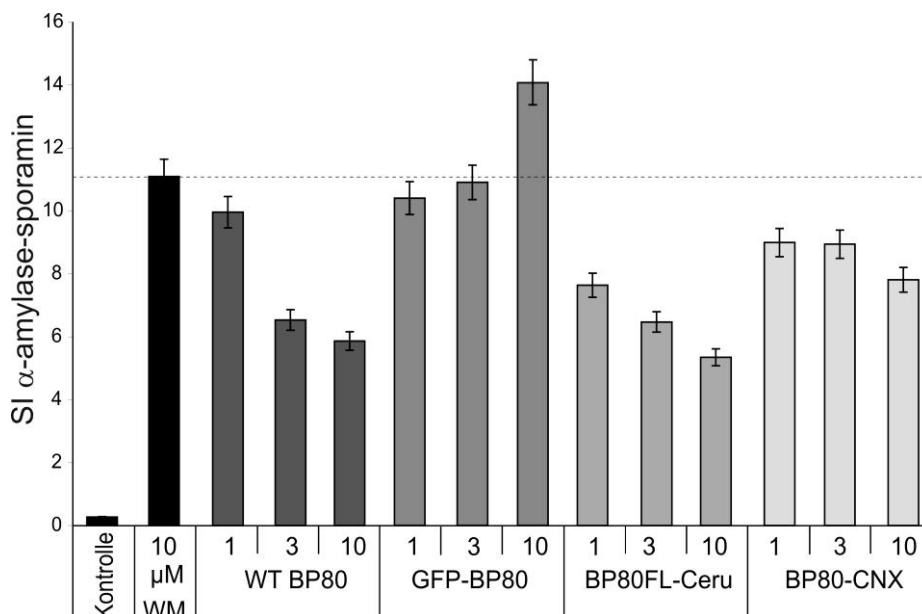


Abb. 3.33 Einfluss der BP80-Konstrukte im Vergleich zu Wildtyp BP80 und GFP-BP80 auf den durch Wortmannin erhöhten Sekretionsindex von amy-spo. Auf der Y-Achse ist der Sekretionsindex aufgetragen, auf der X-Achse ist die Konzentration der zur Transformation eingesetzte Plasmid-DNA von Wildtyp BP80, GFP-BP80, BP80FL-Cerulean und BP80-CNX aufgetragen. Die erste Spalte zeigt die Kontrolle, die amy-spo exprimiert aber nicht in Wortmannin inkubiert wurde. In den folgenden Spalten ist der Sekretionsindex von amy-sporamin unter Einfluss von Wortmannin als Positivkontrolle (zweite Spalte) oder bei Kotransformation mit der jeweiligen Plasmid-DNA gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (n=4)

3.6.3 BP80 bindet Liganden bereits im ER

Die Inhibierung des retromer-vermittelten Rezeptor-Rezyklirens durch Hemmung beider bzw. aller Sorting Nexine führte zu einer Akkumulierung der vakuolären Reporter im ER (siehe Abb. 3.28). Auch eine Koexpression von BP80-CNX-Cerulean mit aleurain-GFP oder GFP-sporamin zeigte eine Anreicherung im ER (Abb. 3.34). Zudem sind die BP80-Konstrukte dazu in der Lage, Liganden zu binden (siehe Abb. 3.33). Um zu überprüfen, ob eine Rezeptor-Liganden-Interaktion bereits im ER stattfinden könnte, wurden die BP80-Konstrukte nun in dem folgenden Versuch verwendet. Die fluoreszierenden vakuolären Markerproteine aleurain-GFP und GFP-sporamin wurden hierzu mit den BP80-CNX-Cerulean in Tabakprotoplasten koexpressiert. Interagiert das BP80-Konstrukt im ER mit den Liganden, müssten die vakuolären Markerproteine im ER akkumulieren und mit dem fluoreszierenden BP80-CNX-Cerulean kolokalisieren. Andernfalls würden die Liganden die Vakuole erreichen.

Die Kontrolle (Abb. 3.34 f) zeigte ein vakuoläres Signal für aleurain-GFP und ein ER-Signal für p24-RFP. Dies bestätigte, dass p24-RFP keinen Einfluss auf den Transport zur Vakuole hatte. Eine Koexpression mit BP80-CNX-Cerulean hingegen inhibierte den Transport zur Vakuole, und das Signal von aleurain-GFP akkumulierte im ER (Abb. 3.34 a-e). Auch das vakuoläre Markerprotein GFP-sporamin zeigte unter Einfluss des BP80-Konstrukts eine Anreicherung im ER (Abb. 3.34 g-i). Das im ER-verankerte BP80 mit Liganden-Bindungsdomäne ist also in der Lage, Liganden zu binden und im ER zu halten. Es handelt sich also um eine Bindung der Liganden durch die BP80-Chimäre im ER *in vivo*. Eine Bindung von Ligand und Rezeptor ist demnach bereits im ER möglich.

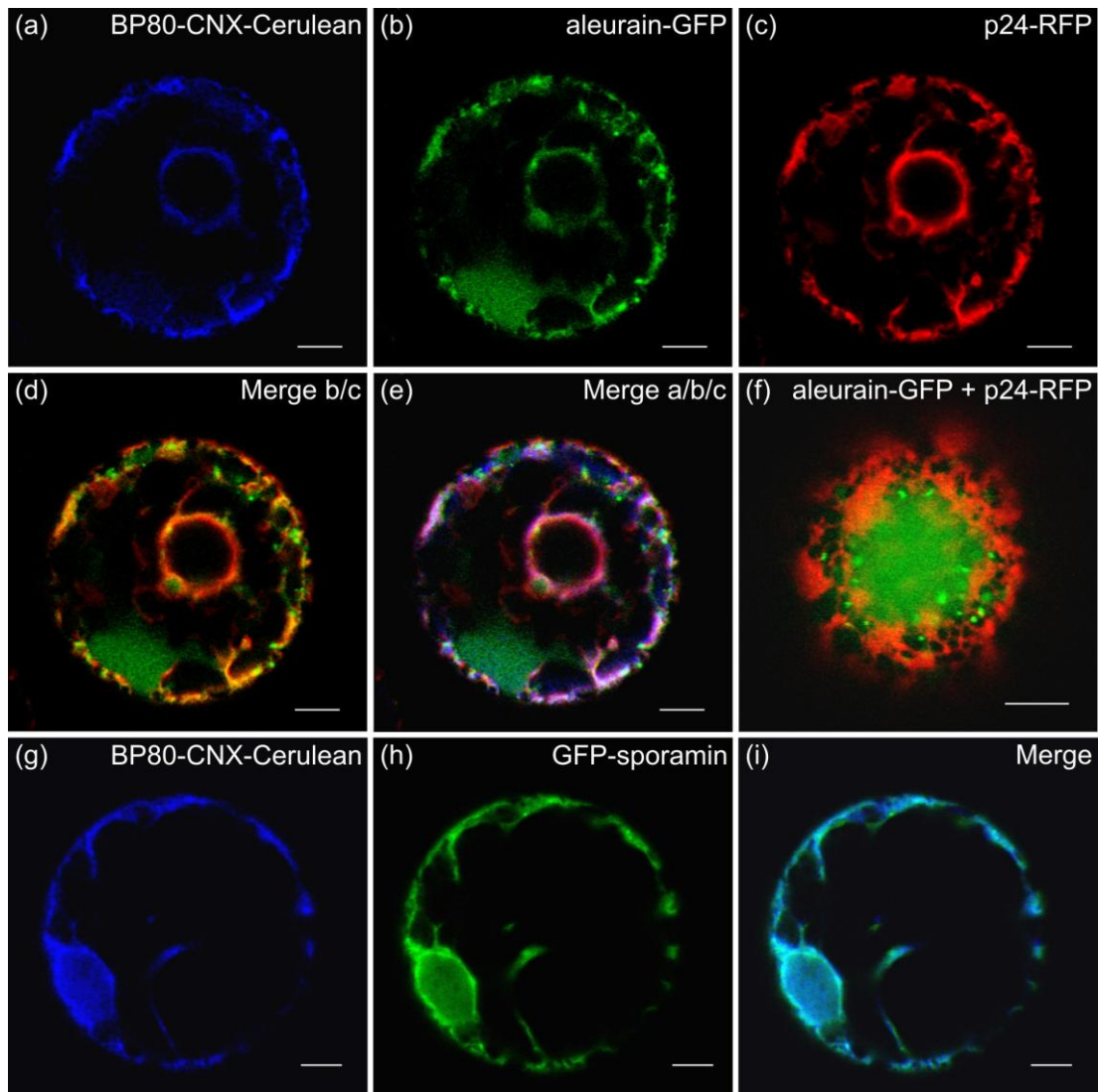


Abb. 3.34 Unter Einfluss von BP80-CNX-Cerulean zeigten die vakuolären Markerproteine ein ER-Signal. (a-e) Koexpression des vakuolären Markers aleurain-GFP (grün), des ER-Markers p24-RFP (rot) und BP80-CNX-Cerulean (blau) in Tabakprotoplasten. Merge aus b und c (d) oder a-c (e). Überlappende Signale erscheinen gelb (d) bzw. pink (e). (f) Koexpression von aleurain-GFP (grün) und p24-RFP (rot) zur Kontrolle. (g-i) Koexpression des vakuolären Markers GFP-sporamin (grün) und BP80-CNX-Cerulean (blau) in Tabakprotoplasten. Eine Kolokalisierung ist durch ein helles Türkis zu sehen. Maßstabsbalken = 5 µm.

Obwohl sich das Fluorophor des BP80-Konstrukts am zytosolischen Ende befand, wurde eine Variante der Chimäre ohne Fluorophor exprimiert, um sicher zu gehen, dass das Fluorophor die Interaktion der luminalen Bindungsdomäne mit den Liganden nicht beeinflusst. Daher wurden die vakuolären Marker aleurain-GFP und GFP-sporamin mit BP80-CNX koexprimiert. Während die Kontrollprotoplasten ein typisches vakuoläres Signal für die vakuolären Markerproteine zeigten (Abb. 3.35 a-c, g-i), erhielt man durch Koexpression mit BP80-CNX eine Anreicherung im ER (Abb.

3.35 d-f, j-l). Zusätzlich zu den vakuolären Markern wurde der Golgi-Marker Man1-RFP zur Feststellung des weiterhin funktionierenden COPII-Transports aus dem ER koexprimiert. Abbildung 3.32 zeigte bereits, dass BP80-CNX keinen Einfluss auf die Sekretion von α -amylase hatte. Der Golgi-Marker war auch in diesem Experiment durch die Chimäre nicht beeinflusst, d. h. es lag keine Hemmung des COPII-vermittelten Transportwegs vor (Abb. 3.35 d-f, j-l).

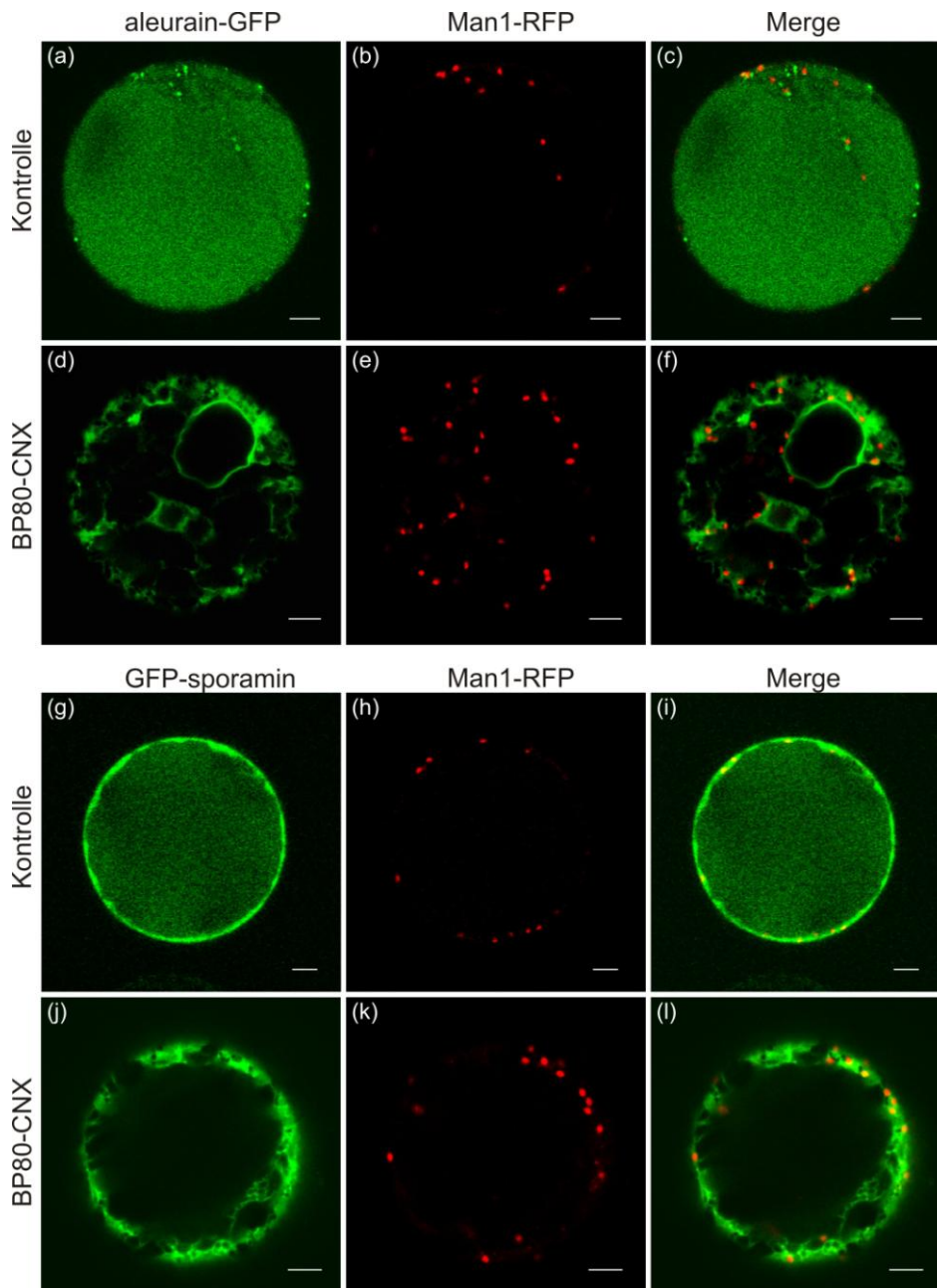


Abb. 3.35 Unter Einfluss von BP80-CNX akkumulierten die vakuolären Markerproteine im ER in Tabakprotoplasten. (a-f) Koexpression des vakuolären Markers aleurain-GFP (grün) und des Golgi-Markers Man1-RFP (rot) in Kontrollprotoplasten (a-c) oder koexprimiert mit BP80-CNX (d-f). (g-l) Koexpression des vakuolären Markers GFP-sporamin und des Golgi-Markers Man1-RFP alleine (g-i) oder mit BP80-CNX (j-l). Maßstabsbalken = 5 μ m.

Da es sich bei den beiden BP80-Konstrukten um Chimären handelte, wurde auch der Einfluss von BP80FL-Cerulean auf den Transport der Liganden getestet. Hierzu wurde BP80FL-Cerulean mit einem der beiden vakuolären Reporter aleurain-GFP (Abb. 3.36 a-d) oder GFP-sporamin (Abb. 3.36 e-h) und dem Golgi-Marker Man1-RFP koexprimiert. Beide Liganden akkumulierten im ER, während der Golgi-Marker in Punkten den Golgi-Apparat markierte, d. h. der ER-Export über COPII-Vesikel nicht blockiert war (Abb. 3.36 c, g).

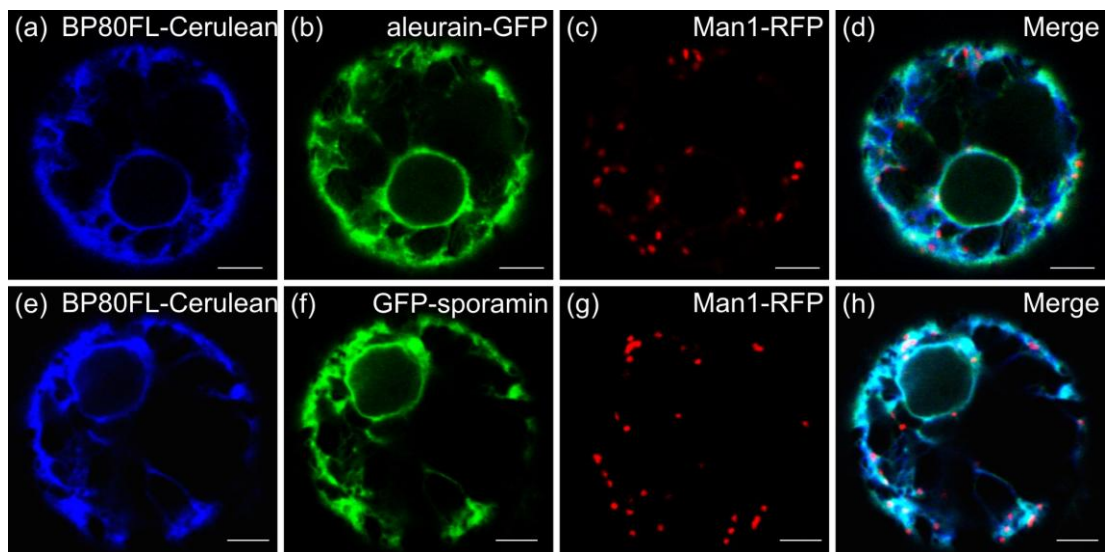


Abb. 3.36 Unter Einfluss von BP80FL-Cerulean akkumulierten die vakuolären Markerproteine im ER in Tabakprotoplasten. (a-d) Koexpression des vakuolären Markers aleurain-GFP, des Golgi-Markers Man1-RFP und BP80FL-Cerulean. (e-h) Koexpression des vakuolären Markers GFP-sporamin, des Golgi-Markers Man1-RFP und BP80FL-Cerulean. Maßstabsbalken = 5 μm .

Die drei BP80-Konstrukte konnten also mit dem Liganden im ER interagieren und ihn dort halten. Durch den Einfluss der BP80-Konstrukte auf die vakuolären Markerproteine konnte gezeigt werden, dass der vakuoläre Sortierungsrezeptor und seine Liganden bereits im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums miteinander interagieren und nicht erst im *trans*-Golgi.

3.7 Wildtyp BP80 hat keinen inhibierenden Effekt auf den COPII-vermittelten ER-Export

Die komplette Inhibierung des Retromer-vermittelten Rezyklierens führte zu einer Anreicherung der Liganden im ER. Die Erklärung für diesen Phänotyp lieferten die BP80-Konstrukte, mit denen gezeigt werden konnte, dass die Interaktion von Rezeptor und Liganden bereits im ER stattfindet. Es konnte aber noch nicht geklärt werden, wie es möglich ist, dass der vakuoläre Sortierungsrezeptor das ER nicht mehr verlassen konnte, während ein Golgi-Marker ungehindert den Golgi-Apparat erreichte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der VSR eine andere Transportmaschinerie als den COPII-Transport benutzt.

GFP-BP80, das keine Liganden-Bindungsdomäne besitzt ist dazu in der Lage, in Konkurrenz mit dem Wildtyp Rezeptor zu treten (daSilva et al., 2005). In diesem Fall entsteht die Konkurrenz durch die identischen zytosolischen Enden. Als Konsequenz dessen akkumuliert ein Teil der Liganden, während sie auf den nächsten Interaktionspartner zum Transport aus dem ER warten. Zur Identifikation möglicher Konkurrenten des Wildtyp BP80 wurden verschiedene Marker als Kontrolle alleine oder zusammen mit Wildtyp BP80 koexprimiert (Abb. 3.37). Folgende Marker wurden verwendet: GFP-HDEL, das zwischen ER und Golgi-Apparat über den COPII/COPI-Transport zyklisiert, der Ligand aleurain-GFP zusammen mit dem Golgi-Marker Man1-RFP, der TGN-Marker YFP-SYP61 und der bekannte Konkurrent des Wildtyp BP80 GFP-BP80.

Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abb. 3.37 a-d) zeigten nur GFP-BP80 und aleurain-GFP ein Signal im ER, wenn Wildtyp BP80 koexprimiert wurde (Abb. 3.37 f, g). Während diese beiden im Wettstreit für ER-Export standen, zeigten die anderen möglichen über COPII-Beförderten Proteine GFP-HDEL, Man1-RFP und YFP-SYP61 keinen Effekt (Abb. 3.37 e, f, h). Daher ergab sich die Vermutung, dass der ER-Export vakuolärer Cargos nicht über die COPII-Maschinerie geschieht, sondern ein anderer, COPII-unabhängiger Transportweg existiert.

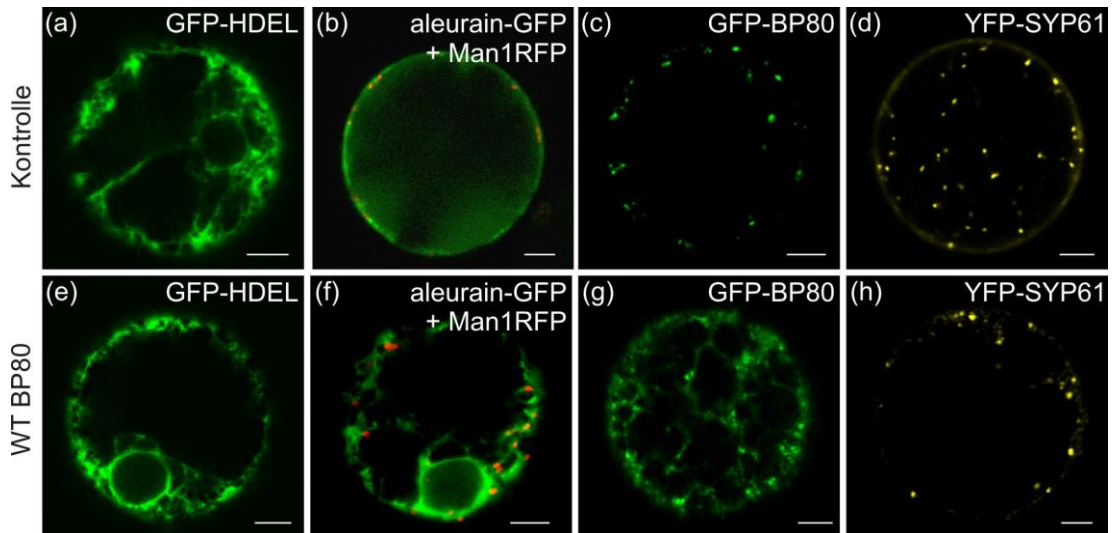


Abb. 3.37 Die Überproduktion von Wildtyp BP80 führte zu einer Akkumulierung von Rezeptor und Ligand im ER, hatte aber keinen Effekt auf den ER-Marker, Golgi- oder TGN-Marker in Tabakprotoplasten. Koexpression der Marker GFP-HDEL, aleurain-GFP und Man1-RFP, GFP-BP80 und YFP-SYP61 alleine als Kontrollen (a-d) und koexprimiert mit dem Wildtyp BP80 (e-h). Maßstabsbalken = 5 μ m.

Durch die Überproduktion von Wildtyp BP80 akkumulierte der Ligand im ER. Damit ist für den Rezeptor selbst gezeigt, dass dieser im ER mit den Liganden interagiert. Eine Akkumulierung im Golgi/TGN war hingegen nicht zu sehen. Also findet die Rezeptor-Liganden-Interaktion bereits im ER und nicht erst im Golgi/TGN statt.

4 Diskussion

4.1 Lokalisierung des Retromer-Komplexes

Der Retromer-Komplex besteht in Pflanzen aus zwei Subkomplexen, einem größeren aus VPS26, VPS29 und VPS35 sowie einem kleineren, der vermutlich aus den Sorting Nexinen SNX1, SNX2a und SNX2b besteht (Oliviusson et al., 2006). Die SNXs interagieren über ihre PX-Domäne mit membrangebundenem Phosphoinositol-3-Monophosphat (PI-3P) (Carlton et al., 2005a; Cullen, 2008; Lemmon, 2008; Worby and Dixon, 2002). In Säugern befindet sich PI-3P in der äußeren Membran aber auch in den internen Vesikeln früher Endosomen, im späten Endosom hingegen ist es nur in sehr geringen Mengen detektierbar (Gillooly et al., 2000; Gillooly et al., 2003). In Pflanzen wird PI-3P am TGN synthetisiert und über das PVC zur Vakuole transportiert (Kim et al., 2001). Daher konnten zwei Populationen unterschiedlich großer PI-3P-angereicherter Strukturen in Tabak-BY2-Zellen identifiziert werden (Vermeer et al., 2006). Eine dieser Strukturen repräsentiert das prävakuoläre Kompartiment, die andere wurde als zum Golgi-Apparat benachbart beschrieben und stellt vermutlich das TGN dar. Aufgrund der Verteilung ihrer Lipid-Bindungspartner befinden sich somit die Sorting Nexine vermutlich an beiden Kompartimenten, also sowohl am TGN und als auch am PVC. Die Interaktion der BAR-Domänen der Sorting Nexine führen zu einer Membrankrümmung (Bonifacino and Hurley, 2008). Auf Grund dessen wäre eine Lokalisierung der SNXs an das TGN anstatt an das PVC wahrscheinlicher, da das PVC sphärisch, multivesikulär und komplett ohne tubuläre Ausstülpungen ist (Haas et al., 2007; Tse et al., 2004). Tatsächlich befinden sich die SNXs in Säugern ausschließlich an den tubulären Ausstülpungen des frühen Endosoms und des Recycling-Endosoms (Bonifacino and Hurley, 2008; Carlton et al., 2004; Carlton et al., 2005b; Rojas et al., 2007).

Die Lokalisierung fluoreszierender Sorting Nexine in *Arabidopsis* in unterschiedlichen Veröffentlichungen ist widersprüchlich. Während SNX2b gleichmäßig am PVC, TGN und einem noch nicht identifizierten, dritten endosomalen Kompartiment zu finden ist (Phan et al., 2008), wurde SNX1 jedoch auch an einem Wortmannin-sensitiven Endosom und in einem BFA-Kompartiment lokalisiert (Jaillais et al., 2008; Jaillais et al., 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich SNX1 am PVC befindet, aber auch am TGN lokalisiert ist, da nur das PVC in Pflanzen Wortmannin-sensitiv ist (Robinson et al., 2008; Tse et al., 2004), während das TGN den Kern der BFA-Kompartimente darstellt (Robinson et al., 2008). Zur Aufklärung

dieser widersprüchlichen Lokalisierungsdaten, wurden die Sorting Nexine zum Einen als XFP-Fusionen in Tabakprotoplasten zusammen mit verschiedenen Markern für PVC, Golgi-Apparat und TGN koexprimiert. Zum Anderen konnten die SNXs mittels Immunfluoreszenz in stabil-transformierten Tabak-BY2-Zelllinien und *Arabidopsis*-Linien endogen nachgewiesen werden, die Marker für PVC, Golgi-Apparat und TGN enthielten. In allen Fällen wurden SNXs am TGN, jedoch nicht am Golgi-Apparat oder an dem PVC lokalisiert. Die Analyse der endogenen und transient-exprimierten SNXs in *Arabidopsis* und in Tabak ergab somit eine Lokalisierung von SNX1 und SNX2a ausschließlich am TGN in Pflanzenzellen (Abb. 3.5 - 3.9). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die kleine Retromer-Untereinheit am TGN und nicht am PVC befinden.

Da die beiden Subkomplexe zusammen den Retromer-Komplex bilden, ist zu vermuten, dass sie sich an dem gleichen Kompartiment befinden müssen. Nun wurden jedoch die Sorting Nexine am TGN lokalisiert, während eine Lokalisierung des großen Subkomplexes an dem PVC angenommen wird (Oliviusson et al., 2006; Yamazaki et al., 2008). VPS29 wurde in *Arabidopsis*-Wurzeln zusammen mit SNX1 in einem Wortmannin- und BFA-sensitiven Kompartiment lokalisiert (Jaillais et al., 2007). Dieses noch nicht näher charakterisierte Kompartiment befindet sich vermutlich im Transportweg nach dem Kompartiment, das durch den Marker GNOM gekennzeichnet ist, welches ein mögliches Recycling-Endosom markiert (Geldner et al., 2003). Bestandteile der großen Retromer-Untereinheit wurden in BY2-Zellen am PVC lokalisiert (Oliviusson et al., 2006; Yamazaki et al., 2008). In beiden Fällen resultierten diese Erkenntnisse jedoch aus Doppelimmunmarkierung, bei denen jeweils mit einem Antikörper gegen die große Retromer-Untereinheit und einem Antikörper gegen ein Markerprotein des PVCs – entweder BP80 oder SYP21 – Kolokalisationsstudien durchgeführt worden waren. Da die Erstantikörper von der gleichen Tierart stammten und das gleiche Protokoll verwendet wurde (Paris et al., 1996), könnte diese beobachtete Kolokalisierung auch das Resultat von unzureichender Blockierung der gebundenen Primärantikörper sein. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunmarkierung mit nur einem Antikörper gegen das zu lokalisierende VPS29 in Tabak-BY2-Zelllinien durchgeführt, die fluoreszierende Marker für PVC, Golgi-Apparat und TGN stabil exprimierten. Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass keine Überlappung mit dem PVC-Marker aber eine eindeutige Kolokalisierung mit dem TGN-Marker SCAMP1-YFP stattfand (Abb. 3.10). Bestätigt wurde dieses Resultat durch die Lokalisierung von VPS35, das ein weiteres Protein des großen Retromer-Subkomplexes darstellt und ebenfalls nur am TGN detektiert werden konnte (Abb. 3.11).

Anhand der vorliegenden Daten konnte somit gezeigt werden, dass im Gegensatz zu vorherigen Annahmen sowohl die Sorting Nexine SNX1 und SNX2a als Bestandteile der kleinen Retromer-Untereinheit als auch zwei Proteine des großen Retromer-Subkomplexes, VPS29 und VPS35, sich ausschließlich am TGN befanden. Die bisher angenommene Funktion des Retromers, den vakuolären Sortierungsrezeptor vom PVC zurück zum TGN zu transportieren, ist auf Grund dieser Lokalisierung unwahrscheinlich. Wenn der Rezeptor vom PVC zurück zum TGN mit Hilfe des Retromers transportiert würde, müsste der Retromer-Komplex am PVC lokalisiert sein, um dort mit dem Rezeptor interagieren zu können. Da Retromer aber nicht am PVC nachweisbar war, kann es folglich auch nicht für das Rezyklieren des Rezeptors vom PVC zum TGN verantwortlich sein. Vielmehr deuten diese Lokalisierungen der Retromer-Komplexe auf eine Recyclingfunktion hin, die ihren Ursprung am TGN hat. Da jedoch bereits durch Koimmunpräzipitationsexperimente eine Interaktion von Retromer und VSR nachgewiesen wurden (Oliviusson et al., 2006), lassen somit die Lokalisierungsstudien auf einen Retromer-vermittelten Recyclingschritt des Rezeptors schließen, der als Ausgangspunkt jedoch nicht das PVC, sondern das TGN hat.

4.2 Das Retromer-vermittelte Rezyklieren des VSRs findet am TGN statt

In Säugern zyklisiert der MPR zwischen dem TGN und dem frühen Endosom. Der Rezeptor ist hierbei jedoch mehr oder weniger gleichmäßig zwischen den beiden Kompartimenten verteilt (Klumperman et al., 1993). Im Gegensatz dazu ist jedoch der Retromer-Komplex nur an tubulären Bereichen des frühen Endosom zu finden (Carlton et al., 2004). In Pflanzen ist der vakuoläre Sortierungsrezeptor BP80 am frühen (TGN) und am späten (PVC) Endosom zu detektieren (Niemes et al., 2009). In Tabak-BY2-Zellen hingegen liegt der VSR ausschließlich am PVC vor (Tse et al., 2004). Diese Lokalisierung am PVC würde allerdings auf ein Rezyklieren des VSRs vom PVC zum TGN hinweisen, das wiederum nicht mit Hilfe des ausschließlich am TGN lokalisierten Retromer-Komplexes geschehen könnte. Daher sollte nun durch Inhibierung des Retromers auf den tatsächlichen Ort des Rezeptor-Rezyklierens geschlossen werden.

Durch Inhibierung des Rezeptor-Rezyklierens würde man eine Akkumulierung des Rezeptors in dem Kompartiment vermuten, in dem die Liganden dissoziieren und von dem aus das Rezyklieren beginnt. Nach dem klassischen Modell des VSR-

Rezyklirens in Pflanzen wäre dieses Kompartiment jedoch das PVC. Eine Inhibierung der Retromer-Funktion durch die Expression einer der SNX-Mutanten oder des SNX-RNAi-Konstrukts führte in der vorliegenden Arbeit hingegen zu einer Akkumulation des vakuolären Sortierungsrezeptors im TGN (Abb. 3.14, 3.15 und 3.16). Dies deutet darauf hin, dass das TGN das Kompartiment darstellt, von dem der Rezeptor mit Hilfe des Retromers rezykliert. Dieses würde jedoch auch bedeuten, dass in diesem Kompartiment der Komplex aus Rezeptor und Ligand dissoziiert und nicht – wie allgemein angenommen – assembliert. Des Weiteren stellte sich auch die Frage, wohin der Rezeptor rezykliert bzw. in welchem Kompartiment die Rezeptor-Liganden-Interaktion stattfindet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Konstrukt - bestehend aus der luminalen Bindungsdomäne von BP80 zusammen mit dem ER-Retensionssignal HDEL - die durch Wortmannin verursachte Sekretion löslicher vakuolärer Moleküle reduziert (daSilva et al., 2005). Da dieses VSR-HDEL-Konstrukt zwischen dem ER und dem *cis*-Golgi zyklisiert, ist es möglich, dass die VSR-Liganden-Interaktion bereits im *cis*-Golgi oder sogar im ER erfolgen kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieses Konstrukt zu einer Akkumulation vakuolärer Enzyme in der ER-Fraktion führt (Watanabe et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass die Liganden-Bindung bereits im ER stattfinden könnte.

Die Lokalisierung von VSRs der BP80-Familie in BY2-Zellen und in Tabakprotoplasten im PVC ermöglicht jedoch keine Aussage über den Ort der Liganden-Bindung: Zum Einen zeigt sich bei einer solchen Lokalisierung eine „steady-state“-Verteilung des Rezeptors. Zum Anderen besitzt der verwendete PVC-Marker GFP-BP80 keine Liganden-Bindungsdomäne; er ist also nicht funktionell und kann nicht mit den Liganden interagieren. Wenn also der VSR fälschlicherweise nicht am TGN sortiert wird, sondern das PVC erreicht, bedeutet das, dass das vorherrschende Signal des GFP-BP80 am PVC eine Akkumulation nicht-rezyklierter Rezeptoren zeigt. Diese nicht-rezyklierten Rezeptoren werden wahrscheinlich zur Vakuole transportiert, um dort degradiert zu werden. Diese Vermutung konnte - wie in Abbildung 3.23 dargestellt - dadurch bestätigt werden, dass GFP-BP80 nach kurzer Expression in Tabakprotoplasten zunächst ein Signal am TGN zeigte und erst nach über 20 Stunden die Verteilung am PVC überwiegte.

4.3 Die SNX-Mutanten verhindern das Anschwellen der PVCs durch Wortmannin

Wortmannin ist ein Phosphoinositidkinase-3(PI-3-Kinase)-Inhibitor (Stack and Emr, 1994), der den Proteintransport zur Vakuole stört und zu einer Sekretion löslicher, vakuolärer Frachtmoleküle führt (daSilva et al., 2005). Wortmannin kann ein Lysin innerhalb der ATP-Bindungsstelle alkylieren und somit eine permanente Inaktivierung der PI-3-Kinase verursachen. Des Weiteren verursacht Wortmannin eine Dissoziation der Sorting Nexine von der Membran aber nicht der großen Retromer-Untereinheit (Arighi et al., 2004; Oliviusson et al., 2006; Zhong et al., 2002). Wortmannin führt vermutlich durch homeotypische Fusion zu einer Vergrößerung später endosomaler Kompartimente (Bright et al., 2001; Lam et al., 2007b).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Expression der SNX-Mutanten diese Vergrößerung der PVCs verhindert, eine komplette Inhibierung der SNXs mittels RNAi-„knock-down“ hingegen nicht (Abb. 3.23). Die Sorting Nexine binden über ihre PX-Domäne an die Membran des TGN bzw. frühen Endosoms und rekrutieren die große Retromer-Untereinheit (Bonifacino and Hurley, 2008). Nach der Interaktion mit der zytosolischen Domäne des Rezeptors und Rezyklirens des Rezeptors dissoziieren die Retromer-Untereinheiten von der Oberfläche des möglichen retrograden Transportvesikels und können für einen weiteren Rezyklierungsschritt verwendet werden. Die dominant-negativen SNX-Mutanten können über ihre PX-Domäne an die Membran binden. Da sie aber entweder nicht miteinander (SNX- Δ CC) oder nicht mit der großen Retromer-Untereinheit (SNX- Δ N) interagieren können, kann kein Transportvesikel gebildet werden und die SNX-Mutanten verbleiben an der Membran. Die PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol-Diphosphat PIP₂ zu PIP₃ (Czech, 2000). Sind jedoch durch die SNX-Mutanten die PIP₃ blockiert, entstehen keine PIP₂ und die PI3-Kinase bindet nicht an die Membran. Dadurch befand sich das Zielenzym von Wortmannin, die PI-3-Kinase, nicht an der Membran des PVCs und damit konnte Wortmannin auch keinen Einfluss auf das PVC haben (Abb. 3.16). Wurde hingegen das RNAi-Konstrukt exprimiert, gab es keine bzw. zu wenige Sorting Nexine, die binden konnten und daher existierten sogar mehr freie PI3-Ps als unter Kontrollbedingungen. Die Wortmannin-Behandlung hatte wie in der Kontrolle ein Anschwellen der PVCs zur Folge, der PVC-Marker war als ringförmige Strukturen zu erkennen (Abb. 3.16). Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann eventuell auch erklärt werden, warum Wortmannin das PVC beeinflusst, aber nicht das TGN, obwohl die PI3-Kinase in beiden Kompartimenten vorhanden ist. Durch die Interaktion der am TGN lokalisier-

ten Sorting Nexine mit den PI3-Phosphaten der Membran kann hier Wortmannin die PI3-Kinase vermutlich schwerer erreichen. Dadurch schwillt das TGN nicht an. Am PVC hingegen liegen die PI3-Kinasen frei vor und Wortmannin kann hier wirken.

4.4 Der Transport vom TGN zur Vakuole ist VSR-unabhängig

Wenn das Rezyklieren des vakuolären Sortierungsrezeptors bereits am TGN erfolgt, dürfte eine Inhibierung des Rezeptor-Transports an der Stelle des Rezyklierens im Transportweg keinen Einfluss auf den weiteren Transport der Liganden haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der SNX-Mutanten zu keiner Inhibierung des Transports löslicher Frachtmoleküle zur Vakuole führte (Abb. 3.18 und 3.19); auch wurden diese nicht sekretiert (Abb. 3.17). Obwohl der Rezeptor unter diesen Bedingungen im TGN zurückgehalten wurde, konnten die vakuolären Marker die Vakuole noch erreichen. Dies wurde sowohl durch konfokal-mikroskopische Analysen (Abb. 3.19) als auch die Detektion des GFPs als Abbauprodukt des GFP-sporamin in der Vakuole durch Immundetektion nachgewiesen (Abb. 3.18). Die Überproduktion von SNX2b führte erstaunlicherweise zu einer Akkumulierung des Endozytosemarkers FM4-64 in vergrößerten, endosomalen Kompartimenten, die den TGN-Marker SYP41 und auch den PVC-Marker SYP21 enthielten (Phan et al., 2008). Der Transport löslicher biosynthetischer Frachtmoleküle zur Vakuole war auch unter diesen Bedingungen nicht inhibiert, was darauf hinweist, dass der VSR für den Transport ab dem Golgi-Apparat nicht mehr benötigt wird.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate über den Retromer-Komplex der Pflanzen entsprechen somit denen des Retromers in Säugern. So ist die Lokalisierung des Retromer-Komplexes am TGN, dem frühen endosomalen Kompartiment in Pflanzen, sowie die Funktion des Retromers bezüglich des Rezyklierens von VSRs, als auch der Rezeptor-unabhängige Transport saurer Hydrolasen vom frühen Endosom zum späten Endosom mit denen in Säugern vergleichbar (Braulke and Bonifacino, 2008). Daher könnte dieser Transportschritt in Pflanzen äquivalent zu dem Transport vom TGN zur Vakuole in Säugern sein. In Säugern geschieht der Transport vom TGN zur Vakuole möglicherweise durch Organellreifung. Übertragen auf den Transportweg in Pflanzen würde dies bedeuten, dass das PVC kontinuierlich neu gebildet und verbraucht wird. So könnte das PVC durch Reifung aus dem TGN entstehen und dann mit der Vakuole fusionieren. Das pflanzliche TGN übernimmt die Funktion eines frühen Endosoms (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007b). Dabei

scheint das TGN jedoch ein Kompartiment zu sein, das unabhängig vom Golgi-Apparat ist und durchaus auch unabhängig von Golgi-Apparaten vorliegen kann (Foresti and Denecke, 2008).

4.5 Die Inhibierung der Retromer-Funktion beeinflusst den ER-Export des Rezeptors und dessen Liganden

Die Inhibierung des Retromer-vermittelten Transports durch die Expression einer SNX1- oder einer SNX2a-Mutante führte zu der Anreicherung des VSRs im TGN. Durch die gleichzeitige Hemmung beider SNXs durch die Koexpression zweier SNX-Mutanten oder durch Inhibierung aller SNXs durch einen RNAi-„knock-down“ konnte hingegen eine Akkumulierung des VSRs im Endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden (Abb. 3.21 und 3.22). Diese beiden unterschiedlichen Effekte auf den vakuolären Sortierungsrezeptor wurden näher analysiert. Die Langzeitbeobachtung des Effekts der Inhibierung der Funktion aller SNXs mittels RNAi zeigte die beiden unterschiedlichen Effekte zeitversetzt. Zuerst trat eine Akkumulierung des VSRs am TGN 16 h nach Transfektion ein und 20-24 h nach Transfektion konnte eine Anreicherung des Rezeptors im ER beobachtet werden (Abb. 3.23). Mit Hilfe des Proteinsynthesehemmers Cycloheximid konnte zwischen diesen beiden Phänotypen unterschieden werden, da diese Droge nur die ER-Akkumulierung des VSRs aber nicht den anderen Effekt der Anreicherung des Rezeptors im TGN verhinderte. Dadurch wurde gezeigt, dass nur neusynthetisierte VSRs im ER akkumulierten. Die Anreicherung der VSRs im ER wurde demnach durch eine Inhibierung des Transports vakuolärer Sortierungsrezeptoren aus dem ER heraus erreicht. Die Hemmung des ER-Exports war spezifisch für VSRs und lösliche, vakuoläre Frachtmoleküle, die Liganden des VSRs. Eine Inhibierung des ER-Exports des Markers für den sekretorischen Massenstroms („bulk-flow“) α -Amylase oder des Golgi-Markers erfolgte jedoch nicht. Dies legt die Vermutung nahe, dass es einen COPII-unabhängigen Transportweg für die VSRs und dessen Liganden geben muss. Die ER-Retention der löslichen Liganden gegen den Massenstrom kann nur dadurch erklärt werden, dass ihre Interaktion mit dem Rezeptor bereits im Lumen des ER stattfinden muss (siehe 4.7).

4.6 Die kleine Retromer-Untereinheit in Pflanzen besteht aus einem Heterodimer

Eine Inhibierung des Transports löslicher, vakuolärer Proteine fand nur statt, wenn beide Sorting Nexine SNX1 und SNX2a durch die Expression beider SNX-Mutanten oder durch RNAi-„knock-down“ aller drei SNXs in ihrer Funktion inhibiert wurden (Abb. 3.28). Trotz Hemmung eines der SNXs wurde dagegen keine Blockierung des vakuolären Transports beobachtet. Hier konnte der VSR noch das TGN erreichen und daher konnten seine Liganden in einem Rezeptor-unabhängigen Schritt zur Vakuole gelangen, während die Hemmung beider SNXs den Rezeptor und damit auch dessen Ligand im ER akkumulierte. Durch die Expression einer der dominant-negativen SNX-Mutanten konnte das jeweilige SNX1 oder SNX2 seine Funktion nicht mehr erfüllen, da der Wildtyp durch die Mutante titriert wurde. Das nicht-inhibierte Sorting Nexin hingegen war nicht beeinflusst. Vermutlich konnte durch die Bildung eines Homodimers aus zwei gleichen Sorting Nexinen der Ausfall von dem anderen SNX kompensiert werden, wobei der Retromer-vermittelte Transport noch stattfinden konnte, wenn auch weniger effektiv. Der Transport der Liganden zur Vakuole wurde dann nicht geblockt, aber durch den weniger effizienten Rücktransport des Rezeptors kam es zu einer Anreicherung von Rezeptoren im TGN. Dies zeigt, dass die kleine Untereinheit in Pflanzen wahrscheinlich aus einem Heterodimer aus SNX1 und SNX2 besteht. Eine Interaktion gleicher Sorting Nexine und damit die Bildung eines Homodimers ist generell möglich, wird aber nicht bevorzugt.

Durch Sequenzanalysen der SNXs in *Arabidopsis thaliana* konnten jeweils eine PX-Domäne und zwei CC-Domänen identifiziert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass SNX2b *in vitro* mit Phosphoinositiden interagieren kann (Phan et al., 2008). In Hefen interagieren die CC-Domänen von Vps5p und Vps17p in ihrer C-terminalen Region miteinander und bilden ein Heterodimer (Seaman and Williams, 2002). Durch die Dimerisierung wird der der Membran zugewandte Teil der BAR-Domänen positiv geladen und dadurch an die Membran angelagert (Gallop and McMahon, 2005). Dies führt zu einer Ausstülpung der Membran und damit zur Vesikelabknospung (Seaman and Williams, 2002). Die Sorting Nexine in Pflanzen könnten auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Bestandteilen der kleinen Untereinheit in Hefen und in Säugern vergleichbar miteinander interagieren (siehe Abb. 4.1). Der pflanzliche Retromer-Komplex besteht aus einem großen heterotetrameren Subkomplex aus VPS26, VPS29 und VPS35 (Oliviusson et al., 2006) und nach den vorliegenden Daten aus einem kleinen heterodimeren Subkomplex aus SNX1 und SNX2 (siehe Abb. 4.1).

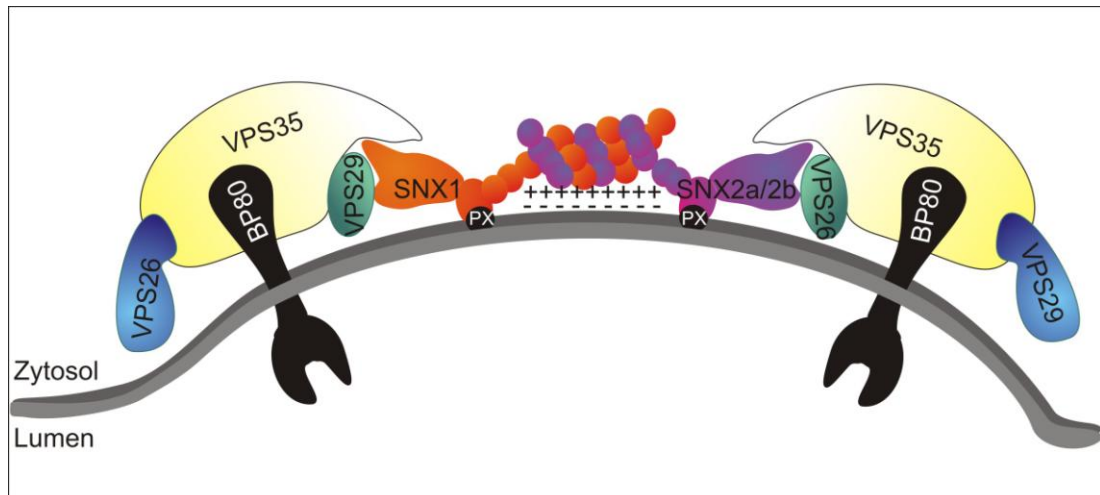


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Dimerisierung der Sorting Nexine zweier Retromer-Komplexe und Krümmung der Membran. Durch die Dimerisierung der Sorting Nexine werden die CC-Domänen positiv geladen und dadurch an die Membran angelagert, die sich daraufhin krümmt. (vacuolar protein sorting protein (VPSp), binding protein 80 kDa (BP80), Sorting Nexin (SNX), phox homology domain (PX))

4.7 Die Rezeptor-Liganden-Interaktion findet bereits im ER statt

Ein eindeutiger Beweis dafür, dass die Interaktion der VSRs mit dessen Liganden erst im TGN stattfindet, konnte bisher noch nicht erbracht werden. Durch die hier gezeigte Lokalisierung des Retromer-Komplexes an das TGN sowie der Rezeptor-unabhängige Transport vom TGN zur Vakuole widerlegen zudem diese Hypothese. Die Interaktion von Rezeptor und Ligand muss demnach schon früher im Transportweg stattfinden. Zwei Beobachtungen lassen die direkte Vermutung zu, dass die löslichen, vakuolären Frachtmoleküle bereits im ER an die BP80-Rezeptoren bindet. Zum Einen konnte gezeigt werden, dass ein Konstrukt, das aus der luminalen Bindungsdomäne (LBD) von BP80 sowie dem ER-Retensionssignal HDEL besteht (BP80LBD-HDEL), wenn es in *Arabidopsis* exprimiert wird, den Transport vakuolärer Enzyme inhibiert und diese anstatt dessen in der ER-Fraktion in größerer Anzahl als unter Kontrollbedingungen zu finden sind (Watanabe et al., 2004). Zum Anderen wurde ein bestätigendes Ergebnis bei daSilva et al. (2005) erzielt. Hier konnte eine mikrosomale Retention des vakuolären Reporterkonstrukts α -Amylase-sporamin durch Expression von BP80LBD-HDEL in Tabakprotoplasten gezeigt werden. Wortmannin, das unter Normalbedingungen die Sekretion des Reporters α -Amylase-sporamin verursacht, hatte in diesen Protoplasten keinen signifikanten

Effekt. Obwohl durch diesen Versuch α -Amylase-sporamin als BP80-Ligand identifiziert werden konnte, kann aus diesen Experimenten jedoch nicht eindeutig auf den Ort der Rezeptor-Liganden-Interaktion geschlossen werden, da BP80LBD-HDEL auf Grund des HDEL-Signals zwischen ER und Golgi-Apparat zyklisiert. Daher wurden für diese Arbeit zur Analyse der VSR-Liganden-Bindung im Lumen des ER unterschiedliche BP80-Konstrukte hergestellt, die ausschließlich im ER lokalisiert sind.

Das im ER-verankerte BP80-CNX-Konstrukt wurde durch den Austausch der Transmembran-Domäne (TMD) und der zytosolischen Domäne (CT) des BP80 durch die Domänen des ER-Residenten Chaperons Calnexin kreiert. Für Calnexin konnte bereits gezeigt werden, dass es auch ohne die eigene luminale Domäne weiterhin der ER-Retention unterliegt und daher z. B. GFP-Calnexin als ER-Marker fungieren kann (Irons et al., 2003). Die Expression der BP80-CNX-Chimäre führte zu einer Akkumulation löslicher, vakuolärer Frachtmoleküle im ER (Abb. 3.34). Es konnte also mit seiner Liganden-Bindungsdomäne Liganden binden und im ER halten, während der ER-Export über COPII weiterhin funktionell war. Auch eine mit einem fluoreszierenden Protein versehene Version der Chimäre (BP80-CNX-Cerulean) verursachte eine Anreicherung der BP80-Liganden im ER (Abb. 3.35). Damit konnte bewiesen werden, dass die Liganden-Bindungsdomäne des Rezeptor bereits im ER Liganden binden kann, und folglich dort die Rezeptor-Liganden-Interaktion stattfindet.

Da es sich bei dem verwendeten Konstrukt um eine Chimäre handelte, wurde ein weiteres BP80-Konstrukt hergestellt, das in seinem strukturellen Aufbau dem Wildtyp-BP80 entspricht. Hierzu wurde an den C-Terminus von BP80 das fluoreszierende Protein Cerulean fusioniert und so ein fluoreszierendes Konstrukt mit allen Domänen des BP80 geschaffen (BP80FL-Cerulean). Die Liganden-Bindungsdomäne liegt hierbei im Kontext des nativen BP80 vor. Im Gegensatz zu dem PVC-Marker GFP-BP80, der keine Liganden-Bindungsdomäne besitzt, wurde BP80FL-Cerulean am ER lokalisiert und führte zu einer Akkumulation der Liganden im ER (Abb. 3.36). Es verhält sich somit dem Wildtyp-BP80 gegenüber ähnlicher als GFP-BP80. Dies konnte auch durch den Einfluss der BP80-Konstrukte auf einen durch Wortmannin-Behandlung bereits erhöhten Sekretionsindex von α -Amylase-sporamin bestätigt werden. Während die Überproduktion des Wildtyp-BP80 die Wirkung von Wortmannin auf den vakuolären Transportweg abschwächte und somit der Sekretionsindex sank (daSilva et al., 2005), erhöhte sich im Gegensatz dazu der Sekretionsindex bei Koexpression von GFP-BP80 noch weiter (daSilva et al., 2005). Die BP80-Konstrukte BP80-CNX und BP80FL-Cerulean, die eine LBD besitzen,

verhielten sich wie der Wildtyp-BP80 (Abb. 3.33). Im Gegensatz zu GFP-BP80 konnten diese BP80-Konstrukte die Liganden im ER binden und dort anreichern. Dies wirkte der durch die Wortmannin-Behandlung induzierte Sekretion der löslichen, vakuolären Frachtmoleküle entgegen. Durch das Fehlen der LBD ist GFP-BP80 kein funktioneller Rezeptor, während BP80-CNX-Cerulean und BP80FL-Cerulean wie der Wildtyp BP80 dazu in der Lage waren, Liganden im ER zu binden. Noch deutlicher wurde die Rezeptor-Liganden-Interaktion im ER dadurch bestätigt, dass auch die Überproduktion des Wildtyp-BP80 zu einer Akkumulierung der löslichen, vakuolären Frachtmoleküle führte (Abb. 3.37). Wildtyp-BP80 interagiert demnach mit seinen Liganden im ER und der Rezeptor-Liganden-Komplex wurde auf Grund der Sättigung des Transportes im ER zurückgehalten.

Ein weiterer Hinweis, der das ER als Ort der Interaktion von Rezeptor und Liganden dem TGN bevorzugt, kommt von einer Studie über die Eigenschaften der Liganden-Bindung der VSRs. Die luminaire Domäne von BP80 besitzt drei EGF(epidermal growth factor)-Repeats, von denen einer eine hohe Affinität zur Calcium-Bindung hat (Cao et al., 2000). Die Calcium-Bindung stabilisiert den Rezeptor-Liganden-Komplex selbst bei niedrigem pH-Wert. Es wird angenommen, dass der minimal saurere pH-Wert von 5.6 - 6 im PVC, der über Anlieferung der vakuolären H⁺-ATPase in die endosomale Membran herbeigeführt wurde (Clarke and Maddera, 2006), im Vergleich zum TGN (pH 5.9 - 6) zum Dissoziieren der Liganden vom Rezeptor führt (Mellman et al., 1986; Yamashiro and Maxfield, 1984). Anscheinend ist aber die Calcium-Konzentration wichtiger für die Liganden-Bindung als der pH-Wert (Watanabe et al., 2002). Die Ca²⁺-Konzentration im ER ist generell bedeutend höher als im Golgi-Apparat (Montero et al., 1997; Pinton et al., 1998). Obwohl die Ca²⁺-Konzentration im TGN nicht bekannt ist, könnte die Änderung der Konzentration an Calcium-Ionen zu der Dissoziation der Liganden in diesem *post*-Golgi-Kompartiment führen.

4.8 Das Retromer rezykliert den VSR zurück zum ER

Trotz der morphologischen Unterschiede von Pflanzen, Hefen und Säugern folgt der Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Sortierung dem gleichen Grundprinzip: Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem Ligand findet im Donor-Kompartiment statt, danach wird der Rezeptor-Liganden-Komplex zu dem Akzeptor-Kompartiment transportiert. Dort dissoziieren die Komplexe und der Rezeptor wird zurück zum Donor-Kompartiment transportiert, um für einen weiteren Transportschritt wieder-

verwendet zu werden. *In vivo* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die VSR-Liganden-Interaktion bereits im ER stattfindet, und dass das Retromer-vermittelte Rezyklieren des Rezeptors bereits am TGN beginnt. Somit stellt das TGN das Akzeptor-Kompartiment in der VSR-vermittelten Sortierung dar (Abb. 4.2).

Die Hemmung der Retromerfunktion führte zu einer speziellen Inhibierung des ER-Exports von VSRs mit seinen Liganden, ohne dass hierbei der COPII-vermittelte Transport beeinflusst wurde. Da die VSRs unter diesen Bedingungen im ER akkumulierten, ist zu vermuten, dass diese Akkumulation der VSRs und Liganden nicht durch das einfache Fehlen der VSRs für den Transport zustande kommt, sondern andere Komponenten der Transportmaschinerie limitierend werden. Obwohl der ER-Export für die VSRs und seine Liganden blockiert war, erreichten Marker für den Golgi-Apparat oder für das TGN weiterhin ihre Zielkompartimente. Der ER-Export der VSRs geschieht daher vermutlich über einen anderen Transportmechanismus als COPII (siehe Abb. 4.2).

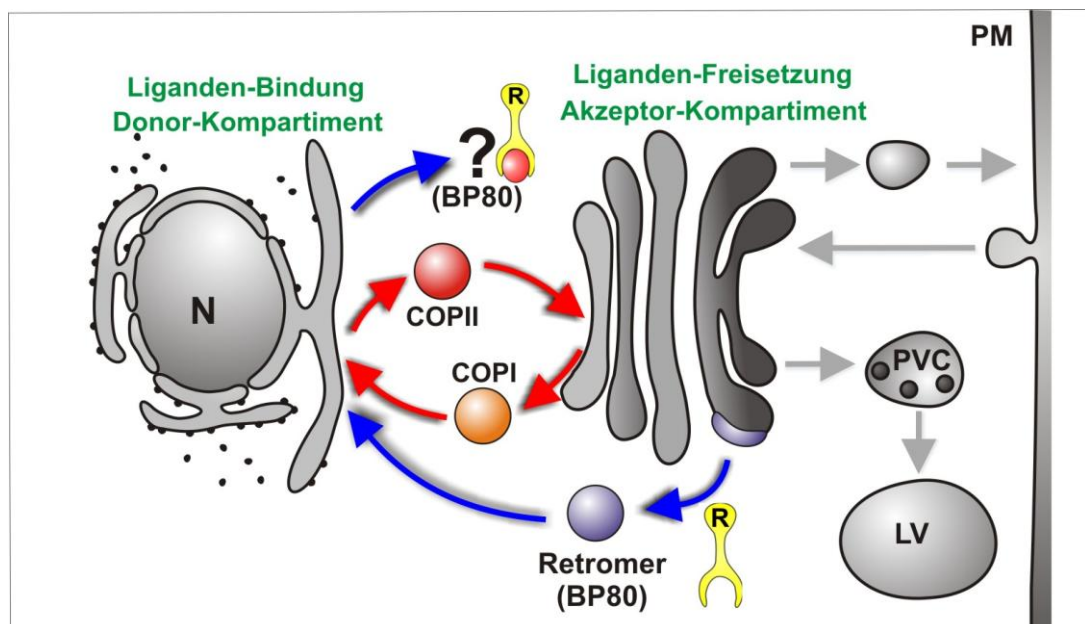


Abb. 4.2 Rezeptor-vermittelte Proteinsortierung zur lytischen Vakuole in Pflanzen. Proteine, die die lytische Vakuole oder die Plasmamembran erreichen sollen, betreten den sekretorischen Transportweg am ER. Vakuoläre Proteine und der vakuoläre Sortierungsrezeptor interagieren im ER und werden dann weiter transportiert (blauer Pfeil). Vermutlich passiert der Rezeptor-Ligand-Komplex den Golgi-Apparat und dissoziiert im TGN. Während der Ligand Rezeptor-unabhängig weiter zur Vakuole transportiert wird, rezykliert der Rezeptor (R) zurück zum ER. Dieser Schritt ist retromer-abhängig (blauer Pfeil). Die beiden Routen des vakuolären Sortierungsrezeptors (blaue Pfeile) sind unabhängig vom COPII/COPI-Transport (rote Pfeile). (Nukleus (N), prävakuläres Kompartiment (PVC), lytische Vakuole (LV), Plasmamembran (PM))

Durch Inhibierung der Retromerfunktion wird das Rezyklieren des VSRs und möglicher anderer Moleküle, die auf diesem Weg transportiert werden, inhibiert. Durch das Fehlen von benötigten Komponenten bricht daraufhin vermutlich auch der anterograde Transport des VSRs und seiner Liganden zusammen. Der COP-Transport war aber davon nicht betroffen, da trotz Inhibierung der Retromerfunktion der Golgi-Marker weiterhin den Golgi-Apparat erreichen konnte und auch die Sekretion nicht inhibiert wurde. Daher kann man davon ausgehen, dass der COP-Transport unabhängig von dem Transportweg des VSRs ist. Die beiden Transportrouten des COPI- und COPII-vermittelten Transports zwischen ER und Golgi-Apparat stehen in direkter Abhängigkeit zueinander. So kollabiert der COPII-Transport, wenn die COPI-Route gestört ist (Pimpl et al., 2003; Stefano et al., 2006). Der molekulare Mechanismus, der dieser Abhängigkeit zu Grunde liegt, ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung könnte das Fehlen von SNAREs sein, die nicht rezykliert wurden. Da eine Inhibierung des Retromers die COPII-Route nicht blockierte, ist davon auszugehen, dass auch der retrograde Transport über COPI-Vesikel nicht gestört wurde. Dies lässt vermuten, dass die Limitierung am ER, die zu der Akkumulierung der VSRs im ER führte, nicht durch den noch funktionierenden COPI-vermittelten Transport ausgeglichen werden konnte. Proteine wie das p24-Protein, das über COPI-vermittelten Transport vom Golgi-Apparat rezykliert, besitzen ein Dileucin-Motif (Langhans et al., 2008), das in der zytosolischen Domäne des BP80 nicht vorkommt. Daher geht der Retromer-vermittelte Transport der VSRs vermutlich direkt zurück zum ER und nicht über den Golgi-Apparat zurück (siehe Abb. 4.2).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass neben dem COPII-Transport in reifen Kürbissamen noch ein weiterer Transportweg über sogenannte PAC-Vesikel (precursor-accumulating vesicles) existiert. Der mit BP80 verwandte Rezeptor PV72 bindet an das Speicherprotein 2S-Albumin (Shimada et al., 1997) und ist in der Membran der PAC-Vesikel vorhanden (Hara-Nishimura et al., 1998). Diese PAC-Vesikel knospen direkt vom ER ab (Hara-Nishimura et al., 1993). PV72 ist somit ein Beispiel für einen Rezeptor, der mit seinen Liganden bereits im ER interagiert. Interessant ist dabei auch, dass PV72 genau wie die luminale Domäne von BP80 (Cao et al., 2000) auch drei EGF-Repeats besitzt (Shimada et al., 2002). Die Bindung des Rezeptors PV72 an den Liganden 2S-Albumin ist ebenfalls Calcium-abhängig (Watanabe et al., 2002). Daraus folgt nicht nur, dass es in diesem speziellen Beispiel einen weiteren COPII-unabhängigen Transportweg gibt, sondern auch, dass hier - wie in dieser Arbeit für BP80 vermutet - die Rezeptor-Liganden-Bindung vermutlich Calcium-abhängig ist. In Pflanzen wurde bisher noch nicht festgestellt, welcher pH-Wert und welche Calcium-Konzentration im ER, Golgi-Apparat, TGN

oder im PVC tatsächlich vorherrschen. Bisher ist man von den bekannten Werten in Säugern und Hefen ausgegangen. Für die optische pH-Wert-Bestimmung könnten Fluorophore eingesetzt werden, die in Abhängigkeit des vorherrschenden pH-Wertes ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern. Fusioniert man diese Fluorophore an Marker für die verschiedenen Kompartimente kann man so den pH-Wert des jeweiligen Kompartiments feststellen. Zur Bestimmung der Calcium-Konzentration könnten entsprechend Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Mit Hilfe der so erhaltenen Daten zum pH-Wert und der Calcium-Konzentration in den verschiedenen Kompartimenten könnte so ein Hinweis über die Abhängigkeit der Rezeptor-Liganden-Interaktion zum pH-Wert oder zur Calcium-Konzentration erhalten werden.

Das vakuoläre Protein Phytapsin stellt ein weiteres Beispiel für COPII-unabhängigen Transport dar. So kann Phytapsin sowohl über COPII vom ER über den Golgi-Apparat zur Vakuole oder direkt vom ER zur Vakuole in einem COPII-unabhängigen ER-Export-Mechanismus transportiert werden (Tormakangas et al., 2001).

Bisher ist jedoch nicht bekannt, welche Art von Vesikel für den Transport des VSRs und seiner Liganden vom ER zum Golgi-Apparat oder TGN verantwortlich ist. Auch ist nicht klar, ob der anterograde Transport zum Golgi-Apparat oder direkt zum TGN geht. Um den VSR-Transport besser verstehen zu können, wäre es wichtig, diese Fragen zu beantworten. Weitere konfokal-mikroskopische Analysen mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen könnten zeigen, welche weiteren Moleküle über diesen Transportweg transportiert werden. So könnte man auch feststellen, ob eventuell der Rücktransport bestimmter SNAREs durch die Inhibierung des Retromer-Komplexes blockiert ist und daher auch der anterograde Transport durch das Fehlen der SNAREs inhibiert wird.

Um einen tiefgreifenden Einblick in die noch unverstandene Komplexität der vakuolären Sortiermechanismen zu erhalten, sind noch weiterführende Untersuchungen erforderlich. Die genannten Ansätze könnten Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein, mit deren Hilfe der Sortiermechanismus in Pflanzen besser verstanden werden könnte.

5 Literaturverzeichnis

- Abazeed, M.E., and R.S. Fuller. 2008. Yeast Golgi-localized, gamma-Ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins are but adaptor protein-1 is not required for cell-free transport of membrane proteins from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol. Biol. Cell.* 19:4826-36.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.
- Antonny, B., D. Madden, S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat. Cell Biol.* 3:531-7.
- Arighi, C.N., L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, and J.S. Bonifacino. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* 165:123-33.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M.F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 77:895-907.
- Barlowe, C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404:67-76.
- Barlowe, C. 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* 13:295-300.
- Bliilou, I., J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, and B. Scheres. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature.* 433:39-44.
- Boevink, P., K. Oparka, S. Santa Cruz, B. Martin, A. Betteridge, and C. Hawes. 1998. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15:441-7.
- Bonifacino, J.S., and R. Rojas. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:568-79.
- Bonifacino, J.S., and J.H. Hurley. 2008. Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:427-36.
- Bowers, K., and T.H. Stevens. 2005. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744:438-54.
- Brandizzi, F., E.L. Snapp, A.G. Roberts, J. Lippincott-Schwartz, and C. Hawes. 2002. Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell.* 14:1293-309.
- Brandizzi, F., S. Hanton, L.L. DaSilva, P. Boevink, D. Evans, K. Oparka, J. Denecke, and C. Hawes. 2003. ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J.* 34:269-81.
- Braulke, T., and J.S. Bonifacino. 2008. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
- Bright, N.A., M.R. Lindsay, A. Stewart, and J.P. Luzio. 2001. The relationship between lumenal and limiting membranes in swollen late endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation. *Traffic.* 2:631-42.

- Brodsky, F.M., C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, and D.E. Wakeham. 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:517-68.
- Brown, J.C., N.A. Jolliffe, L. Frigerio, and L.M. Roberts. 2003. Sequence-specific, Golgi-dependent vacuolar targeting of castor bean 2S albumin. *Plant J.* 36:711-9.
- Burda, P., S.M. Padilla, S. Sarkar, and S.D. Emr. 2002. Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J. Cell Sci.* 115:3889-900.
- Cao, X., S.W. Rogers, J. Butler, L. Beevers, and J.C. Rogers. 2000. Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell.* 12:493-506.
- Carlton, J., M. Bujny, B.J. Peter, V.M. Oorschot, A. Rutherford, H. Mellor, J. Klumperman, H.T. McMahon, and P.J. Cullen. 2004. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high-curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr. Biol.* 14:1791-800.
- Carlton, J., M. Bujny, A. Rutherford, and P. Cullen. 2005a. Sorting nexins--unifying trends and new perspectives. *Traffic.* 6:75-82.
- Carlton, J.G., M.V. Bujny, B.J. Peter, V.M. Oorschot, A. Rutherford, R.S. Arkell, J. Klumperman, H.T. McMahon, and P.J. Cullen. 2005b. Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. *J. Cell Sci.* 118:4527-39.
- Casadaban, M.J., and S.N. Cohen. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138:179-207.
- Chrispeels, M.J., and A. von Schaewen. 1992. Sorting of proteins in the secretory system of plant cells. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 61:161-5.
- Clarke, M., and L. Maddera. 2006. Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and killing of bacteria by *Dictyostelium amoebae*. *Eur. J. Cell Biol.* 85:1001-10.
- Collins, B.M., C.F. Skinner, P.J. Watson, M.N. Seaman, and D.J. Owen. 2005. Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat Struct. Mol. Biol.* 12:594-602.
- Collins, B.M., S.J. Norwood, M.C. Kerr, D. Mahony, M.N. Seaman, R.D. Teasdale, and D.J. Owen. 2008. Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic.* 9:366-79.
- Cozier, G.E., J. Carlton, A.H. McGregor, P.A. Gleeson, R.D. Teasdale, H. Mellor, and P.J. Cullen. 2002. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 277:48730-6.
- Crofts, A.J., N. Leborgne-Castel, S. Hillmer, D.G. Robinson, B. Phillipson, L.E. Carlsson, D.A. Ashford, and J. Denecke. 1999. Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell.* 11:2233-2248.
- Cullen, P.J. 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:574-82.
- Czech, M.P. 2000. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell.* 100:603-6.
- daSilva, L.L., J.P. Taylor, J.L. Hadlington, S.L. Hanton, C.J. Snowden, S.J. Fox, O. Foresti, F. Brandizzi, and J. Denecke. 2005. Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell.* 17:132-48.

- Denecke, J., R. De Rycke, and J. Botterman. 1992. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* 11:2345-55.
- Denecke, J., L.E. Carlsson, S. Vidal, A.S. Høglund, B. Ek, M.J. van Zeijl, K.M. Sinjorgo, and E.T. Palva. 1995. The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell.* 7:391-406.
- Dettmer, J., A. Hong-Hermesdorf, Y.D. Stierhof, and K. Schumacher. 2006. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell.* 18:715-30.
- Di Cola, A., L. Frigerio, J.M. Lord, A. Ceriotti, and L.M. Roberts. 2001. Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:14726-31.
- Doray, B., I. Lee, J. Knisely, G. Bu, and S. Kornfeld. 2007. The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol. Biol. Cell.* 18:1887-96.
- Dupree, P., and D.J. Sherrier. 1998. The plant Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404:259-70.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8:2-10.
- Foresti, O., and J. Denecke. 2008. Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic.* 9:1599-612.
- Frigerio, L., N.A. Jolliffe, A. Di Cola, D.H. Felipe, N. Paris, J.M. Neuhaus, J.M. Lord, A. Ceriotti, and L.M. Roberts. 2001. The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Phys.* 126:167-75.
- Gallop, J.L., and H.T. McMahon. 2005. BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem. Soc. Symp.*:223-31.
- Geldner, N., N. Anders, H. Wolters, J. Keicher, W. Kornberger, P. Müller, A. Delbarre, T. Ueda, A. Nakano, and G. Jurgens. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell.* 112:219-30.
- Gillooly, D.J., I.C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N.J. Bryant, J.M. Gaullier, R.G. Parton, and H. Stenmark. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19:4577-88.
- Gillooly, D.J., C. Raiborg, and H. Stenmark. 2003. Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes. *Histochem. Cell Biol.* 120:445-53.
- Grebe, M., J. Xu, W. Mobius, T. Ueda, A. Nakano, H.J. Geuze, M.B. Rook, and B. Scheres. 2003. Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr. Biol.* 13:1378-87.
- Gruenberg, J., and H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:317-23.
- Haas, T.J., M.K. Sliwinski, D.E. Martinez, M. Preuss, K. Ebine, T. Ueda, E. Nielsen, G. Odorizzi, and M.S. Otegui. 2007. The Arabidopsis AAA ATPase SKD1 is involved in multivesicular endosome function and interacts with its positive regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5. *Plant Cell.* 19:1295-312.
- Hadlington, J.L., and J. Denecke. 2000. Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3:461-8.

- Haft, C.R., M. de la Luz Sierra, R. Bafford, M.A. Lesniak, V.A. Barr, and S.I. Taylor. 2000. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol. Biol. Cell.* 11:4105-16.
- Happel, N., S. Honing, J.M. Neuhaus, N. Paris, D.G. Robinson, and S.E. Holstein. 2004. Arabidopsis micro A-adaptin interacts with the tyrosine motif of the vacuolar sorting receptor VSR-PS1. *Plant J.* 37:678-693.
- Hara-Nishimura, I., Y. Takeuchi, and M. Nishimura. 1993. Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell.* 5:1651-9.
- Hara-Nishimura, I., T. Shimada, K. Hatano, Y. Takeuchi, and M. Nishimura. 1998. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell.* 10:825-836.
- Haywood, V., F. Kragler, and W.J. Lucas. 2002. Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell.* 14 Suppl:S303-25.
- Hebert, D.N., J.F. Simons, J.R. Peterson, and A. Helenius. 1995. Calnexin, calreticulin, and Bip/Kar2p in protein folding. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 60:405-15.
- Hebert, D.N., B. Foellmer, and A. Helenius. 1996. Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J.* 15:2961-8.
- Hierro, A., A.L. Rojas, R. Rojas, N. Murthy, G. Effantin, A.V. Kajava, A.C. Steven, J.S. Bonifacino, and J.H. Hurley. 2007. Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature.* 449:1063-7.
- Hillmer, S., A. Movafeghi, D.G. Robinson, and G. Hinz. 2001. Vacuolar storage proteins are sorted in the cis-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 152:41-50.
- Hinz, G., S. Hillmer, M. Baumer, and I. Hohl. 1999. Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell.* 11:1509-1524.
- Hinz, G., S. Colanesi, S. Hillmer, J.C. Rogers, and D.G. Robinson. 2007. Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic.* 8:1452-64.
- Hofmann, C., A. Sambade, and M. Heinlein. 2007. Plasmodesmata and intercellular transport of viral RNA. *Biochem. Soc. Trans.* 35:142-5.
- Hohl, I., D.G. Robinson, M.J. Chrispeels, and G. Hinz. 1996. Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 10):2539-50.
- Holwerda, B.C., H.S. Padgett, and J.C. Rogers. 1992. Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell.* 4:307-18.
- Hong, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744:493-517.
- Hopkins, C.R., A. Gibson, M. Shipman, and K. Miller. 1990. Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature.* 346:335-9.
- Horazdovsky, B.F., B.A. Davies, M.N. Seaman, S.A. McLaughlin, S. Yoon, and S.D. Emr. 1997. A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol. Biol. Cell.* 8:1529-41.
- Humair, D., D. Hernandez Felipe, J.M. Neuhaus, and N. Paris. 2001. Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell.* 13:781-92.

- Hurley, J.H., and S.D. Emr. 2006. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:277-98.
- Hurley, J.H. 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:4-11.
- Irons, S.L., D.E. Evans, and F. Brandizzi. 2003. The first 238 amino acids of the human lamin B receptor are targeted to the nuclear envelope in plants. *J. Exp. Bot.* 54:943-50.
- Jackson, M.R., T. Nilsson, and P.A. Peterson. 1993. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 121:317-33.
- Jaillais, Y., I. Fobis-Loisy, C. Miege, C. Rollin, and T. Gaude. 2006. AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature.* 443:106-9.
- Jaillais, Y., M. Santambrogio, F. Rozier, I. Fobis-Loisy, C. Miege, and T. Gaude. 2007. The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell.* 130:1057-70.
- Jaillais, Y., I. Fobis-Loisy, C. Miege, and T. Gaude. 2008. Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. *Plant J.* 53:237-47.
- Jauh, G.Y., T.E. Phillips, and J.C. Rogers. 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell.* 11:1867-82.
- Jiang, L., T.E. Phillips, C.A. Hamm, Y.M. Drozdowicz, P.A. Rea, M. Maeshima, S.W. Rogers, and J.C. Rogers. 2001. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *J. Cell Biol.* 155:991-1002.
- Katzmann, D.J., G. Odorizzi, and S.D. Emr. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:893-905.
- Kim, D.H., Y.J. Eu, C.M. Yoo, Y.W. Kim, K.T. Pih, J.B. Jin, S.J. Kim, H. Stenmark, and I.I. Hwang. 2001. Trafficking of Phosphatidylinositol 3-Phosphate from the trans-Golgi Network to the Lumen of the Central Vacuole in Plant Cells. *Plant Cell.* 13:287-301.
- Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 69:699-727.
- Kirsch, T., N. Paris, J.M. Butler, L. Beevers, and J.C. Rogers. 1994. Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3403-3407.
- Klumperman, J., A. Hille, T. Veenendaal, V. Oorschot, W. Stoorvogel, K. von Figura, and H.J. Geuze. 1993. Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* 121:997-1010.
- Kostova, Z., and D.H. Wolf. 2003. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* 22:2309-17.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lam, S.K., C.L. Siu, S. Hillmer, S. Jang, G. An, D.G. Robinson, and L. Jiang. 2007a. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell.* 19:296-319.
- Lam, S.K., Y.C. Tse, D.G. Robinson, and L. Jiang. 2007b. Tracking down the elusive early endosome. *Trends Plant Sci.* 12:497-505.
- Langhans, M., M.J. Marcote, P. Pimpl, G. Virgili-Lopez, D.G. Robinson, and F. Aniento. 2008. In vivo Trafficking and Localization of p24 Proteins in Plant Cells. *Traffic.*

- Langhans, M., S. Niemes, P. Pimpl, and D.G. Robinson. 2009. Oryzalin bodies: in addition to its anti-microtubule properties, the dinitroaniline herbicide oryzalin causes nodulation of the endoplasmic reticulum. *Protoplasma*. 236:73-84.
- Lemmon, S.K., and L.M. Traub. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:457-66.
- Lemmon, M.A. 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:99-111.
- Lewis, M.J., and H.R. Pelham. 1996. SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 85:205-15.
- Lipka, V., C. Kwon, and R. Panstruga. 2007. SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:147-74.
- Lucas, W.J., and S. Wolf. 1993. Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* 3:308-15.
- Lupashin, V., and E. Sztul. 2005. Golgi tethering factors. *Biochim. Biophys. Acta*. 1744:325-39.
- Luzio, J.P., B.A. Rous, N.A. Bright, P.R. Pryor, B.M. Mullock, and R.C. Piper. 2000. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 9):1515-24.
- Marty, F. 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell*. 11:587-600.
- Matsuoka, K., S. Matsumoto, T. Hattori, Y. Machida, and K. Nakamura. 1990. Vacuolar targeting and posttranslational processing of the precursor to the sweet potato tuberous root storage protein in heterologous plant cells. *J. Biol. Chem.* 265:19750-7.
- Matsuoka, K., L. Orci, M. Amherdt, S.Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, and T. Yeung. 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 93:263-75.
- Matsuoka, K., and K. Nakamura. 1999. Large alkyl side-chains of isoleucine and leucine in the NPIRL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Mol. Biol.* 41:825-35.
- Maxfield, F.R., and T.E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:121-32.
- McNew, J.A., F. Parlati, R. Fukuda, R.J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*. 407:153-9.
- Mellman, I., R. Fuchs, and A. Helenius. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55:663-700.
- Meyer, D.I., E. Krause, and B. Dobberstein. 1982. Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature*. 297:647-50.
- Montero, M., J. Alvarez, W.J. Scheenen, R. Rizzuto, J. Meldolesi, and T. Pozzan. 1997. Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum: coexistence of high and low [Ca²⁺] subcompartments in intact HeLa cells. *J. Cell Biol.* 139:601-11.
- Munro, S., and H.R. Pelham. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*. 46:291-300.
- Munro, S., and H.R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 48:899-907.

- Napier, R.M., L.C. Fowke, C. Hawes, M. Lewis, and H.R. Pelham. 1992. Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 102 (Pt 2):261-71.
- Nebenfuhr, A., L.A. Gallagher, T.G. Dunahay, J.A. Frohlick, A.M. Mazurkiewicz, J.B. Meehl, and L.A. Staehelin. 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Phys.* 121:1127-42.
- Nebenfuhr, A., and L.A. Staehelin. 2001. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6:160-7.
- Neuhaus, J.M., and J.C. Rogers. 1998. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 38:127-44.
- Niemes, S., M. Langhans, C. Viotti, D. Scheuring, M.S.W. Yan, L. Jiang, S. Hillmer, D.G. Robinson, and P. and Pimpl. 2009. Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant J.* in press.
- Nilsson, T., M. Jackson, and P.A. Peterson. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 58:707-18.
- Oliviusson, P., O. Heinzerling, S. Hillmer, G. Hinz, Y.C. Tse, L. Jiang, and D.G. Robinson. 2006. Plant retromer, localized to the prevacuolar compartment and microvesicles in Arabidopsis, may interact with vacuolar sorting receptors. *Plant Cell.* 18:1239-52.
- Orci, L., B.S. Glick, and J.E. Rothman. 1986. A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell.* 46:171-84.
- Otegui, M.S., and C. Spitzer. 2008. Endosomal functions in plants. *Traffic.* 9:1589-98.
- Page, L.J., and M.S. Robinson. 1995. Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J. Cell Biol.* 131:619-30.
- Paris, N., C.M. Stanley, R.L. Jones, and J.C. Rogers. 1996. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell.* 85:563-72.
- Park, M., D. Lee, G.J. Lee, and I. Hwang. 2005. AtRMR1 functions as a cargo receptor for protein trafficking to the protein storage vacuole. *J. Cell Biol.* 170:757-67.
- Park, J.H., M. Oufattole, and J.C. Rogers. 2007. Golgi-mediated vacuolar sorting in plant cells: RMR proteins are sorting receptors for the protein aggregation/membrane internalization pathway. *Plant Sci.* 172:728-745.
- Pelham, H.R. 1988. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* 7:913-8.
- Pfeffer, S.R., and J.E. Rothman. 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56:829-52.
- Pfeffer, S.R. 2001. Membrane transport: retromer to the rescue. *Curr. Biol.* 11:R109-11.
- Phan, N.Q., S.-J. Kim, and D.C. Bassham. 2008. Overexpression of Arabidopsis Sorting Nexin AtSNX2b Inhibits Endocytic Trafficking to the Vacuole. *Mol. Plant.* 1:961-976.
- Phillipson, B.A., P. Pimpl, L.L. daSilva, A.J. Crofts, J.P. Taylor, A. Movafeghi, D.G. Robinson, and J. Denecke. 2001. Secretory bulk flow of soluble proteins is COPII dependent. *Plant Cell.* 13:2005-2020.
- Pimpl, P., S.L. Hanton, J.P. Taylor, L.L. Pinto-DaSilva, and J. Denecke. 2003. The GTPase ARF1p Controls the Sequence-Specific Vacuolar Sorting Route to the Lytic Vacuole. *Plant Cell.* 15:1242-56.

- Pimpl, P., J.P. Taylor, C. Snowden, S. Hillmer, D.G. Robinson, and J. Denecke. 2006. Golgi-mediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *Plant Cell*. 18:198-211.
- Pinton, P., T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 17:5298-308.
- Prescianotto-Baschong, C., and H. Riezman. 1998. Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell*. 9:173-89.
- Reddy, J.V., and M.N. Seaman. 2001. Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Mol. Biol. Cell*. 12:3242-56.
- Robinson, D.G., G. Hinz, and S.E. Holstein. 1998. The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* 38:49-76.
- Robinson, D.G., and G. Hinz. 1999. Golgi-mediated transport of seed storage proteins. *Seed Sci. Res.* 9:267-283.
- Robinson, M.S., and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:444-53.
- Robinson, D.G., P. Oliviussen, and G. Hinz. 2005. Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic*. 6:615-25.
- Robinson, D.G., Herranz, M. C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C. 2007. Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 199-225.
- Robinson, D.G., L. Jiang, and K. Schumacher. 2008. The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Phys.* 147:1482-92.
- Rojas, R., S. Kametaka, C.R. Haft, and J.S. Bonifacino. 2007. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol. Cell Biol.* . 27:1112-24.
- Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen, and P. Nyren. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242:84-9.
- Rothman, J.E., and F.T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272:227-34.
- Rouille, Y., W. Rohn, and B. Hoflack. 2000. Targeting of lysosomal proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:165-71.
- Rutherford, S., and I. Moore. 2002. The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:518-28.
- Saalbach, G., R. Jung, G. Kunze, I. Saalbach, K. Adler, and K. Muntz. 1991. Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals. *Plant Cell*. 3:695-708.
- Salama, N.R., T. Yeung, and R.W. Schekman. 1993. The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J*. 12:4073-82.
- Sanderfoot, A.A., and N.V. Raikhel. 1999. The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell*. 11:629-642.
- Sanderfoot, A.A., and N.V. Raikhel. 2001. Arabidopsis could shed light on human genome. *Nature*. 410:299.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-7.
- Schekman, R., and L. Orci. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science.* 271:1526-33.
- Schroeder, S., and E. Ungewickell. 1991. Subunit interaction and function of clathrin-coated vesicle adaptors from the Golgi and the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266:7910-8.
- Seaman, M.N., J.M. McCaffery, and S.D. Emr. 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J. Cell Biol.* 142:665-81.
- Seaman, M.N., and H.P. Williams. 2002. Identification of the functional domains of yeast sorting nexins Vps5p and Vps17p. *Mol. Biol. Cell.* 13:2826-40.
- Seaman, M.N. 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J. Cell Biol.* 165:111-22.
- Seaman, M.N. 2005. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* 15:68-75.
- Seaman, M.N. 2007. Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J. Cell Sci.* 120:2378-89.
- Shelness, G.S., and G. Blobel. 1990. Two subunits of the canine signal peptidase complex are homologous to yeast SEC11 protein. *J. Biol. Chem.* 265:9512-9.
- Shi, H., R. Rojas, J.S. Bonifacino, and J.H. Hurley. 2006. The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:540-8.
- Shimada, T., M. Kuroyanagi, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 1997. A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol.* 38:1414-1420.
- Shimada, T., E. Watanabe, K. Tamura, Y. Hayashi, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2002. A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol.* 43:1086-95.
- Shimada, T., Y. Koumoto, L. Li, M. Yamazaki, M. Kondo, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2006. AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins. *Plant Cell Physiol.* 47:1187-94.
- Singer-Krueger, B., R. Frank, F. Crausaz, and H. Riezman. 1993. Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *J. Biol. Chem.* 268:14376-86.
- Sogaard, M., K. Tani, R.R. Ye, S. Geromanos, P. Tempst, T. Kirchhausen, J.E. Rothman, and T. Sollner. 1994. A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell.* 78:937-48.
- Sollner, T., S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 362:318-24.
- Stack, J.H., and S.D. Emr. 1994. Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J. Biol. Chem.* 269:31552-62.
- Staehelin, L.A. 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* 11:1151-65.
- Stefano, G., L. Renna, L. Chatre, S.L. Hanton, P. Moreau, C. Hawes, and F. Brandizzi. 2006. In tobacco leaf epidermal cells, the integrity of protein export from the endoplasmic

- reticulum and of ER export sites depends on active COPI machinery. *Plant J.* 46:95-110.
- Swanson, S.J., P.C. Bethke, and R.L. Jones. 1998. Barley aleurone cells contain two types of vacuoles. Characterization Of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell.* 10:685-98.
- Tooze, J., and M. Hollinshead. 1991. Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J. Cell Biol.* 115:635-53.
- Tormakangas, K., J.L. Hadlington, P. Pimpl, S. Hillmer, F. Brandizzi, T.H. Teeri, and J. Denecke. 2001. A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell.* 13:2021-32.
- Tse, Y.C., B. Mo, S. Hillmer, M. Zhao, S.W. Lo, D.G. Robinson, and L. Jiang. 2004. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell.* 16:672-93.
- Tse, Y.C., S.W. Lo, S. Hillmer, P. Dupree, and L. Jiang. 2006. Dynamic response of prevacuolar compartments to brefeldin A in plant cells. *Plant Phys.* 142:1442-59.
- Ueda, T., M. Yamaguchi, H. Uchimiya, and A. Nakano. 2001. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 20:4730-41.
- Ueda, T., T. Uemura, M.H. Sato, and A. Nakano. 2004. Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *Plant J.* 40:783-9.
- Vanoosthuyse, V., G. Tichtinsky, C. Dumas, T. Gaude, and J.M. Cock. 2003. Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* S locus receptor kinase. *Plant Phys.* 133:919-29.
- Verges, M., I. Sebastian, and K.E. Mostov. 2007. Phosphoinositide 3-kinase regulates the role of retromer in transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *Exp. Cell Res.* 313:707-18.
- Vermeer, J.E., W. van Leeuwen, R. Tobena-Santamaria, A.M. Laxalt, D.R. Jones, N. Divecha, T.W. Gadella, Jr., and T. Munnik. 2006. Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J.* 47:687-700.
- Vitale, A., and J. Denecke. 1999. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell.* 11:615-28.
- Vitale, A., and G. Hinz. 2005. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci.* 10:316-23.
- Walter, P., and G. Blobel. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91:551-6.
- Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91:545-50.
- Wang, D., M. Guo, Z. Liang, J. Fan, Z. Zhu, J. Zang, X. Li, M. Teng, L. Niu, Y. Dong, and P. Liu. 2005. Crystal structure of human vacuolar protein sorting protein 29 reveals a phosphodiesterase/nuclease-like fold and two protein-protein interaction sites. *J. Biol. Chem.* 280:22962-7.
- Wassmer, T., N. Attar, M.V. Bujny, J. Oakley, C.J. Traer, and P.J. Cullen. 2007. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J. Cell Sci.* 120:45-54.

- Watanabe, E., T. Shimada, M. Kuroyanagi, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2002. Calcium-mediated association of a putative vacuolar sorting receptor PV72 with a propeptide of 2S albumin. *J. Biol. Chem.* 277:8708-15.
- Watanabe, E., T. Shimada, K. Tamura, R. Matsushima, Y. Koumoto, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2004. An ER-Localized Form of PV72, a Seed-Specific Vacuolar Sorting Receptor, Interferes the Transport of an NPIR-Containing Proteinase in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell Physiol.* 45:9-17.
- Watson, J.M., A.F. Fusaro, M. Wang, and P.M. Waterhouse. 2005. RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett.* 579:5982-7.
- Whyte, J.R., and S. Munro. 2002. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* 115:2627-37.
- Wink, M. 1993. The plant vacuole: A multifunctional compartment. *J. Exp. Botany.* 44, 231-246.
- Worby, C.A., and J.E. Dixon. 2002. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:919-31.
- Yamashiro, D.J., and F.R. Maxfield. 1984. Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J. Cell. Biochem.* 26:231-46.
- Yamazaki, M., T. Shimada, H. Takahashi, K. Tamura, M. Kondo, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2008. Arabidopsis VPS35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence. *Plant Cell Physiol.* 49:142-56.
- Zhong, Q., C.S. Lazar, H. Tronchere, T. Sato, T. Meerloo, M. Yeo, Z. Songyang, S.D. Emr, and G.N. Gill. 2002. Endosomal localization and function of sorting nexin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:6767-72.
- Ziman, M., J.S. Chuang, M. Tsung, S. Hamamoto, and R. Schekman. 1998. Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 9:1565-76.

6 Anhang

6.1 Geräte

Benchmark Microplate Reader	Bio Rad, München
Digitalkamera, Canon Power Shot S3 15	Canon, Krefeld
Eismaschine MF22	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Kühlschränke 4 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Feinwaage BP 121S	Sartorius, Göttingen
Filmentwickler Agfa Curix 60	Agfa, Rummelsburg
Gefrierschränke -20 °C und -80 °C	Heraeus, Hanau
	Liebherr, Ochsenhausen
Gelkammer für Agarosegel-Elektrophorese	Werkstatt der Uni. Heidelberg
Gelkammer für SDS-PAGE	Werkstatt der Uni. Heidelberg
Gene Pulser II	Bio Rad, München
Illuminator	Benda, Wiesloch
Impfbank HeraeusR HERA guard HPH12	Heraeus, Hanau
Laborwippe	Elmi, Lettland
Megafuge 1.0R	Kendro laboratory, Osterode
Mikrowelle	Privileg, Fürth
Netzteil Blue Power 500 für Elektrophorese	Serva, Heidelberg
Peltier Thermocycler für PCR	MJ Research, Waltham, MA, USA
pH-Meter	Sartorius, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Labnet, Berlin
Heizblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Peristaltische Pumpe, 313U	Watson Marlow, Wilmington, MA, USA
	Bio-Rad, München
Semidry Blotting System	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Photometer DU 640b	
	Eppendorf, Hamburg
Tischmischer, Vortexgenie 2	Bandelin, Berlin
Ultraschall-Gerät Sonoplus	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Heraeus Instruments, Hanau
Wärmeschranke 37 °C	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Zellkulturschüttler Innova 4230	
	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf 5417R	
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont, Bad Homburg
Zeiss LSM510 Konfokal-Mikroskop	Zeiss, Jena

6.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier	Whatman, USA
Glaswaren	Schott, Mainz
Mikrotiterplatten	Bio-Rad, München
Nitrocellulosemembran	Pall Corporation, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Österreich
Petrischalen klein	Sterilin, London, U.K
Pipettenspitzen, steril, 0 ml und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 µl	Greiner Bio-one, Österreich
Reaktionsgefäße 2,0 µl	Greiner Bio-one, Österreich
Röntgenfilm, Hyperfilm	Amersham Bioscience, Freiburg
Sterile Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Reaktionsgefäße, 10 ml,	Sterilin, London, U.K
Sterilfilter, 0,22 µm	Roth, Karlsruhe
Weck Gläser	Weck, Wehr

6.3 Chemikalien

Applichem	Darmstadt
Fermentas Life Sciences	Heidelberg
Merck	Darmstadt
Roth	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	Taufkirchen

6.4 Enzyme und Kits

Alkalische Phosphatase (Cip)	Fermentas, Heidelberg
Cereal α -amylase assay-Kit	Megazyme, Irland
DNA-Aufreinigungskit, NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
DNA Größenmarker (Gene ruler 1kb ladder)	Fermentas, Heidelberg
Phusion high fidelity DNA Polymerase	Bio-Cat, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Heidelberg
Wizard Plus Midiprep	Promega, Mannheim
Macerozym R10	Yakult, Japan
Zellulase R10	Yakult, Japan

7 Symbole und Abkürzungen

α	Alpha
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ARF	ADP Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BFA	Brefeldin A
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCV	"Clathrin coated vesicle"
°C	Grad Celsius
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nucleotid Triphosphat
DTT	1-4-Dithiothreitol
E	Extinktion
ECL	"enhanced chemiluminescence"
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
g _{max}	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Isopropanol	2-Propanol
l	Liter
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
min	Minute
MVB	Multivesikulärer Körper ("multivesicular body")
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PM	Plasmamembran

PVC	Prävakuoläres Kompartiment
RP	Restriktionspuffer
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Sekretionsindex
SNAP	“soluble NSF attachment protein“
SNARE	“soluble NSF attachment protein receptor“
SNX	“sorting nexin“
ST	Sialyltransferase
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzymeinheit
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VPSp	“vacuolar protein sorting protein“
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

Symbole für Aminosäuren:

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Die Abkürzungen A, T, G und C stehen für die Nukleinsäure-Basen der DNA:

A	Adenin	G	Guanin
T	Thymin	C	Cytosin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 03.11.09