



Centre for  
Organismal  
Studies  
Heidelberg

# Funktionelle Charakterisierung pflanzlicher Endosomen

David Scheuring

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht–Karls–Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe David Scheuring

aus Kirchheimbolanden

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# Funktionelle Charakterisierung pflanzlicher Endosomen

Gutachter: Prof. Dr. David G. Robinson

Prof. Dr. Rüdiger Hell

## **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, 7.Juni 2011

---

(David Scheuring)

**Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht bzw. sind eingereicht:**

Shahriari, M., Keshavaiah, C., Scheuring, D., Sabovljevic, A., Pimpl, P., Hausler, R.E., Hulskamp, M., and Schellmann, S. (2010). The AAA-ATPase AtSKD1 contributes to vacuolar maintenance of *A. thaliana*. *Plant J.* 64, 71-85.

Robinson, D.G., Scheuring, D., Naramoto, S., Friml, J. (2011). ARF1 Localizes to the Golgi and the Trans-Golgi Network. *Plant Cell.* 23, 846-850.

Scheuring, D., Viotti, C., Bubeck, J., Sturm, S., Krueger, F., Robinson, D.G., Pimpl, P., and Schumacher, K. (2011). Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi-Network/Early Endosome in *Arabidopsis*. Eingereicht bei *Plant Cell*.

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und gefördert haben und so zur Erarbeitung dieser Dissertation beitragen konnten. Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Dr. David G. Robinson für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die wissenschaftliche Betreuung und die fortwährende Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit. Außerdem möchte ich ihm für die Teilnahme an mehreren Konferenzen und Fortbildungen sowie für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes in Hongkong danken.

Bei Herrn Professor Dr. Rüdiger Hell möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates dieser Arbeit und für Ratschläge und Hilfestellungen auch abseits des wissenschaftlichen Projektes bedanken.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Peter Pimpl (ZMBP, Universität Tübingen) für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die hervorragende Betreuung im Labor und für alle Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen. Weiterhin möchte ich mich für konstruktive Kritik und Freiräume innerhalb des Projektes bedanken.

I would like to thank Prof. Dr. Liwen Jiang for the warm welcome in Hong Kong and the chance to work in his laboratory. Genauso Danke ich Herrn Dr. Swen Schellmann für interessante Diskussionen und eine fruchtbare Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Silke Sturm für die Hilfe bei Western-Blot Analysen sowie für alle Korrekturvorschläge bedanken. Bei Fabian Künzl bedanke ich mich ebenfalls für alle Korrekturen und zudem für eine gute und spannende Zusammenarbeit. Allen anderen Kollegen möchte ich für alle Hilfe, gemeinsame Problemlösungen und für die gute Zeit danken: Dr. Markus Langhans, Dr. Stefan Hillmer, Dr. Giselbert Hinz, Dr. Maria Goretti Virgili Lopez, Barbara Jesenofsky, Stephanie Gold, Paulien van Bentum, Anne Olbrich, Alexander Lerich, Faran Durrani, Emel Bostanci und Ines Steins. Für Anregungen, gute Zusammenarbeit und Hilfe im Laboralltag spreche ich der Arbeitsgruppe Schumacher mit Prof. Dr. Karin Schumacher, Dr. Corrado Viotti, Falco Krüger, Dr. Julia Bubeck, Dr. Nana Keinath, Dr. Melanie Krebs, Christoph Neubert, Esther Görlich, Anne Kriegel und Beate Schöfer ebenfalls meinen Dank aus.

Mein herzlichster Dank geht an Nadine und meine Familie. Schön, dass es Euch gibt.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Endomembransystem	1
1.1.1	Das endoplasmatische Retikulum	1
1.1.2	Der Golgi-Apparat	2
1.1.3	Die endosomalen Kompartimente	3
1.1.4	Die vakuolären Kompartimente	5
1.2	Transportwege des Endomembransystems	6
1.2.1	Mechanismen des Vesikeltransportes	6
1.2.2	Der sekretorische Weg	7
1.2.3	Der endocytische Weg	10
1.3	Ubiquitin als Sortierungssignal für die Endocytose	10
1.4	Die Rolle des ESCRT im Abbau von Membranproteinen	11
1.4.1	Die molekulare Funktion der ESCRT-Maschinerie	12
1.4.2	ESCRT-O: Erkennung und Akkumulierung von Frachtmolekülen	13
1.4.3	ESCRT-I und ESCRT-II: Membran-Einstülpung und Sortierung	14
1.4.4	ESCRT-III und assoziierte Proteine: MVB-Bildung	15
1.4.5	Deubiquitinierung	16
1.5	Die ESCRT-Maschinerie in Pflanzen	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
2.1	Charakterisierung der ESCRT-I Komponente VPS28	21
2.2	Charakterisierung der ESCRT-II Komponente VPS22	24
2.3	Charakterisierung der ESCRT-III Komponente VPS2	28
2.4	Funktionelle Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie	32
2.5	An welchem Kompartiment erfolgt eine Fehlsortierung?	36
2.6	Ein Reportersystem zur ESCRT-Charakterisierung	42
2.7	Ein Reportersystems für den Transport zur Vakuole	45

---

2.8	ESCRT-Abhängigkeit des Reportersystems .....	48
2.9	Der Ubiquitinierungs-Status bei Protein-Internalisierung .....	48
2.10	Untersuchungen von VPS28 in <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	50
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
3.1	Lokalisierung von ESCRT-Komponenten .....	55
3.2	ESCRT und der Transport zur Vakuole .....	58
3.3	ESCRT-abhängiger Transport vom TGN/EE zum MVB/LE .....	61
3.4	ESCRT-Lokalisierung und Biogenese des MVBs/LEs .....	63
3.5	Ubiquitin als Sortierungssignal in Pflanzen .....	65
3.6	Ubiquitin-vermittelte Sortierung und ESCRT.....	67
3.7	Untersuchungen an <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	69
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>71</b>
4.1	Material .....	71
4.1.1	Geräte.....	71
4.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	72
4.1.3	Chemikalien .....	72
4.1.4	Enzyme und Kits.....	72
4.2	Bakterienmaterial .....	73
4.2.1	Bakterienstämme.....	73
4.2.2	Anzucht von <i>E.coli</i> -Kulturen.....	73
4.2.3	Herstellung kompetenter Bakterienstämme.....	74
4.2.4	Transformation kompetenter Bakterienstämme.....	75
4.3	Pflanzenmaterial .....	75
4.3.1	Kultivierung von Tabakpflanzen.....	75
4.3.2	Kultivierung von <i>Arabidopsis</i> auf Erde.....	76
4.3.3	Anzucht und Kultivierung von Tabak-Suspensionskulturen.....	76
4.4	Methoden der Entwicklungsbiologie.....	76
4.4.1	Messung des Hypokotylwachstums.....	76
4.4.2	Genotypisierung von t-DNA-Insertionslinien.....	77

---

4.4.3	Kreuzung von stabil transformierten <i>Arabidopsis</i> -Linien.....	78
4.5	Klonierungen.....	78
4.5.1	Vektoren.....	78
4.5.2	Oligonukleotidprimer.....	80
4.6	Molekularbiologische Methoden.....	82
4.6.1	DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial.....	82
4.6.2	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial.....	82
4.6.3	Synthese von cDNA aus RNA.....	82
4.6.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	82
4.6.5	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	83
4.6.6	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	84
4.6.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	84
4.6.8	Agarosegel-Elektrophorese.....	84
4.6.9	Aufreinigung von DNA.....	85
4.6.10	DNA Aufreinigung aus Agarosegelen.....	85
4.6.11	Sequenzierung von DNA.....	85
4.6.12	Digitale Sequenzabgleichung.....	86
4.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	86
4.7.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	86
4.7.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	87
4.7.3	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	87
4.8	Zellbiologische Methoden.....	88
4.8.1	Herstellung von Protoplasten aus Tabakblättern.....	88
4.8.2	Transformation von Protoplasten durch Elektroporation.....	89
4.8.3	Sekretionsanalyse.....	90
4.8.4	Messung enzymatischer Aktivität.....	90
4.8.5	Vakuolenpräparation aus Tabakmesophyllprotoplasten.....	91
4.9	Proteinbiochemische Methoden.....	92
4.9.1	Herstellung von Antikörpern.....	92
4.9.2	SDS-PAGE.....	92
4.9.3	Western-Blot.....	94
4.9.4	Verwendete Antikörper.....	95

---

4.10	Immunologische Untersuchung von Pflanzenzellen.....	96
4.10.1	BY2 Immunmarkierung nach Paraformaldehyd-Fixierung .....	96
4.10.2	BY2 Immunmarkierung nach Glutaraldehyd-Fixierung.....	97
4.10.3	Verwendete Antikörper .....	98
4.11	Digitale Bildbearbeitung und Fotografie .....	98
4.12	Mikroskopie .....	98
4.12.1	Konfokalmikroskopie.....	98
4.12.2	Verwendete Markerproteine- und Linien.....	100
4.12.3	Elektronenmikroskopie.....	100
4.13	Datenbanken sowie Sequenzvergleich– und Analyse.....	101
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Symbole und Abkürzungen.....</b>	<b>117</b>

## Zusammenfassung

Synthese und Abbau von Proteinen müssen in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, damit die Zelle sowohl ihre grundlegenden Funktionen wahrnehmen als auch auf externe Stimuli reagieren kann. Während der Abbau von löslichen Proteinen Ubiquitin-abhängig über das Proteasom im Cytosol vermittelt wird, erfordert der Abbau von Membranproteinen Wechselwirkungen mehrerer Proteinkomplexe, zusammenfassend als ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) bezeichnet und beinhaltet mehrere Transportprozesse an endosomalen Membranen. Dabei übernimmt die ESCRT-Maschinerie die Sortierung von Membranproteinen in die intraluminalen Vesikel (ILV) der multivesikulären, späten Endosomen (*multivesicular body*, MVB) und ermöglichen so den Transport in das vakuoläre Lumen und damit letztlich den Abbau zu degradierender Proteine. In Hefe und Säugern konnte gezeigt werden, dass ubiquitinierte Proteine der Plasmamembran internalisiert und von der ESCRT-Maschinerie erkannt werden. In Pflanzen wurden bislang nur wenige Komponenten dieser Maschinerie funktionell charakterisiert und es konnte weder eine Ubiquitin-vermittelte Internalisierung von Membranproteinen noch eine Interaktion mit ESCRT-Komponenten an endosomalen Kompartimenten gezeigt werden.

Für die Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie und zur Untersuchung ihrer Rolle an der Biogenese verschiedener Kompartimente, wurden biochemische, genetische und ultrastrukturelle Methoden kombiniert. Durch die Produktion von Antikörpern gegen ESCRT-Komponenten und durch die Expression bestimmter ESCRT-Proteine, wurden Lokalisierungsstudien durchgeführt und eine graduelle Verteilung der ESCRT-Maschinerie entlang der Kompartimente des vakuolären Transportwegs gefunden. Die funktionelle Analyse von ESCRT-Mutanten zeigte, dass der vakuoläre Transport von diesen Komplexen abhängt und der Transport vom frühen Endosom (TGN/EE) zum späten Endosom (MVB/LE) nicht durch Transportvesikel sondern durch einen Reifungsprozess erfolgt. Die Reifung des MVB/LE aus Membranen des TGN/EE wurde durch den Nachweis von TGN-MVB Hybrid-Strukturen bestätigt. Des Weiteren konnte Ubiquitin als Sortierungssignal für endocytischen Transport in Pflanzen identifiziert und Erkenntnisse über die Bedeutung des Ubiquitinierungs-Status von zu degradierenden Proteinen gewonnen werden. Untersuchungen am Gesamtorganismus (*Arabidopsis* t-DNA-Insertionslinien) zeigten, dass die Funktionalität der ESCRT-Maschinerie nicht nur auf molekularbiologischer Ebene, sondern auch für die Entwicklung der Pflanze von großer Bedeutung ist.

## Summary

In order to maintain homeostasis and to react to external stimuli, synthesis and degradation of proteins have to be dynamically balanced. While degradation of soluble proteins is dependent on the proteasome, far less is known about the turnover of membrane proteins. For degrading a membrane protein several large protein complexes – the ESCRTs (*endosomal sorting complex required for transport*) have to work hand in hand to mediate transport events at endosomal membranes. Especially the sorting of membrane proteins into so called intraluminal vesicles (ILVs) of multivesicular late endosomes (MVB/LE) is crucial for the subsequent degradation in the lumen of the vacuole. In yeast it has been shown that the ESCRT-machinery binds and internalizes ubiquitinated proteins of the plasma membrane. In plants only a few components of this machinery have been functionally characterized. Neither an ubiquitin-dependent internalization of membrane proteins, nor the interaction of the ESCRT-machinery at endosomal membranes has been described so far.

For the characterization of the ESCRT-machinery and to investigate its role in the biogenesis of endosomal compartments, biochemical, molecular and genetic methods have been combined. The production of antibodies and expression of selected ESCRT-subunits led the way for localization studies which revealed a gradual distribution of the ESCRT-machinery along compartments of the vacuolar transport route. Functional analysis of ESCRT-mutants showed that vacuolar transport and in particular transport steps from early endosomes (TGN/EE) to late endosomes (MVB/LE) require the functionality of ESCRT. This and the existence of TGN-MVB hybrid-structures suggest, that transport between early and late endosomes occurs *via* maturation rather than *via* vesicular transport. Electron microscopical evidence confirmed that MVBs/LEs mature from the TGN/EE. Furthermore, ubiquitin could be identified as a sorting signal for internalization and endocytic uptake of membrane proteins in plants. The importance of the two C-terminal glycines of ubiquitin for internalization was examined. Finally, the functionality of the ESCRT-machinery for developmental processes at the level of the entire plant was investigated.

# 1 Einleitung

Im Laufe der Evolution haben eukaryotische Zellen ein komplexes, inneres Membransystem entwickelt. Dieses Endomembransystem gewährleistet eine Unterteilung der Zelle in funktionell distinkte Reaktionsräume. Die als Organellen oder Kompartimente bezeichneten Reaktionsräume enthalten eine spezifische Ausstattung an Lipiden, Enzymen und anderen Molekülen und stehen untereinander durch dynamische und komplexe Transportvorgänge in Verbindung. Das pflanzliche Endomembransystem besteht im Wesentlichen aus dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, den Endosomen, der Plasmamembran, den vakuolären Kompartimenten und allen am Transport beteiligten Vesikeln (Palade, 1975).

## 1.1 Das Endomembransystem

Die Kompartimentierung und dadurch erforderlichen Transportprozesse sind in allen eukaryotischen Zellen konserviert. Trotz des hohen Konservierungsgrades gibt es einige Besonderheiten des pflanzlichen Endomembransystems. Neben der Existenz verschiedener Vakuolentypen, gibt es spezielle Mechanismen, wie die Sekretion von Polysacchariden für den Aufbau der Zellwand, die nur in Pflanzenzellen nachgewiesen wurden.

### 1.1.1 Das endoplasmatische Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) hat, als Synthese- und Eintrittsort für Proteine des Endomembransystems, eine zentrale Rolle im Transportsystem der Zelle. Es erstreckt sich als ausgedehntes Membransystem von der Kernhülle bis in die kortikalen Regionen der Zelle. Das pflanzliche ER erstreckt sich durch die Plasmodesmata der Zellwand sogar über die Zellgrenzen hinaus und ermöglicht so einen interzellulären Stoffaustausch (Lucas und Wolf, 1993; Haywood et al., 2002). Das ER kann in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt werden: in transitorisches ER, glattes ER, raues ER und die Kernhülle (Staehein, 1997). Obwohl das transitorische ER als Bildungsort für Transportvesikel vermutet wurde, konnte dieser Befund in Pflanzen ultrastrukturell nicht nachgewiesen werden (Robinson et al., 2007). Verzweigte, netzartige Bereiche des ER ohne Ribosomen werden als glattes ER bezeichnet und dienen der Lipidsynthese (Staehein, 1997). Das mit Ribosomen besetzte, raue ER stellt den Syntheseort für Proteine dar, deren kotranslationale Translokation direkt in das Lumen des ERs und damit in das

Endomembransystem, erfolgt. Die Kernhülle trennt das Nukleoplasma vom Cytosol ab und Transportprozesse können deshalb nur über die nukleären Porenkomplexe erfolgen.

Die kotranslationale Translokation neu synthetisierter Proteine am rauen ER erfolgt mehrstufig. Zuerst werden N-terminale Signalpeptide von freien Ribosomen synthetisiert und durch Signal-Erkennungs-Partikel (*signal recognition particle*, SRP) im Cytosol gebunden. Damit wird die Translation gestoppt und der gesamte Komplex wird mit Hilfe eines SRP-Rezeptors zu den Membranen des ER geleitet (Meyer, 1982). Nach Dissoziation des SRP wird die Translation wieder aufgenommen und das naszierende Protein durch das so genannte Translokon in das Lumen des ERs transportiert (Walter und Blobel, 1981a, b; Walter et al., 1981). Während des Membrandurchtrittes werden die N-terminalen Signalpeptide von Signalpeptidasen abgespalten und die Proteine zur weiteren Modifizierung in das Lumen des ER entlassen (Shelness und Blobel, 1990). Hier werden die linearen Polypeptide durch mehrstufige Modifikationen in ihre native Konformation gefaltet. Bei dieser Faltung sind so genannte Chaperone beteiligt, die vorübergehend an hydrophobe, ungefaltete Bereiche der Polypeptide binden können und so eine Überführung in die korrekte Raumstruktur ermöglichen (Hartl, 1996). Die am besten charakterisierten Chaperone sind BiP (*binding immunoglobulin protein*, Munro und Pelham, 1986), Calreticulin (Denecke et al., 1995) und Calnexin (Hebert et al., 1995). Ebenfalls im Lumen des ER findet eine weitere Protein-Modifizierung, die N-Glykosylierung statt. Diese Modifizierung trägt zur korrekten Faltung von Proteinen, sowie der Assemblierung von Protein-Komplexen bei und ist zudem für die Qualitätskontrolle des ER relevant (Vitale und Denecke, 1999). Fehlgefaltete Proteine und inkorrekt assemblierte Komplexe werden von einem Kontrollsystem erkannt und mittels ERAD (*ER-associated protein degradation*) über die Translokons zurück in das Cytosol geschleust und dort abgebaut (Brandizzi et al., 2003b). Erst nach abgeschlossener Modifikation, korrekter Faltung bzw. Assemblierung und Qualitätskontrolle, werden Proteine durch vesikulären Transport zum Golgi-Apparat befördert.

### 1.1.2 Der Golgi-Apparat

Als pflanzlichen Golgi-Apparat versteht man die Gesamtheit aller Dictyosomen einer Zelle. Dictyosomen bestehen aus Stapeln membranumschlossener Zisternen, den Golgi-Stapeln. Die Anzahl der Zisternen je Dictyosom, sowie die Anzahl der Dictyosomen selbst, variiert sowohl innerhalb verschiedener Pflanzenarten als auch innerhalb verschiedener Zelltypen stark (Dupree und Sherrier, 1998). Dictyosomen

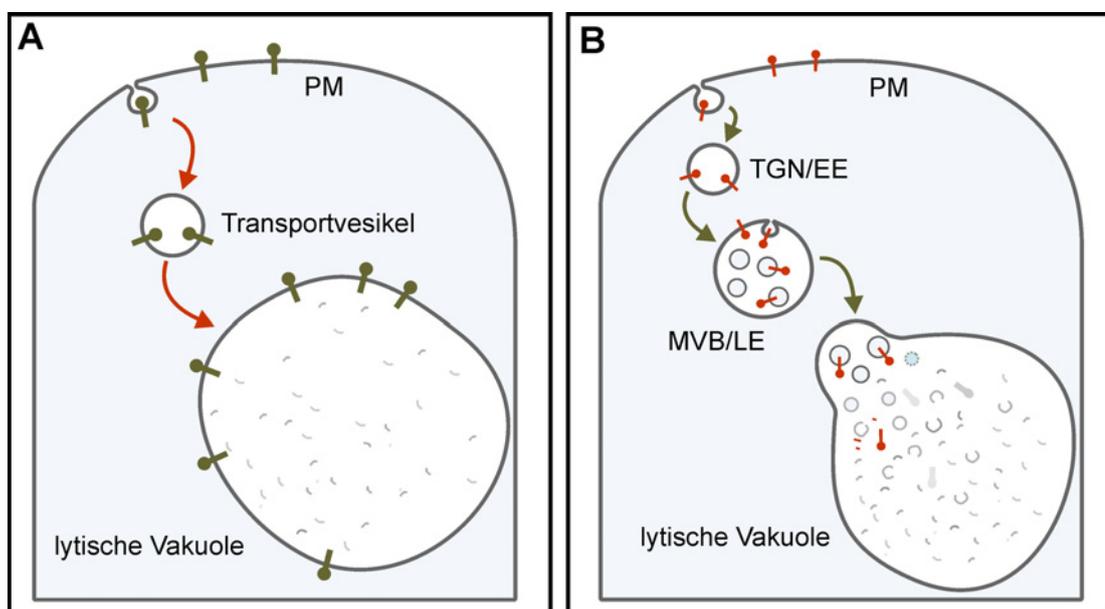
zeigen einen polaren Aufbau und werden in einen *cis-*, *medial-*, und *trans-*Golgi unterteilt; dem sich das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) anschließt (Nebenfuehr und Staehelin, 2001). Diese, klar von den Zisternen abgegrenzte, tubulo-vesikuläre Struktur wird auf Grund seiner Funktion innerhalb des Endomembransystems den endosomalen Kompartimenten zugeordnet (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007). Der Golgi-Apparat ist ein zentrales Kompartiment des Endomembransystems und übernimmt eine Vielzahl von Aufgaben. Neben der Synthese und Sortierung von Zellwandpolysacchariden und der Modifizierung sekretorischer Proteine (Dupree und Sherrier, 1998), besteht seine Hauptaufgabe in der Proteinsortierung zu den verschiedenen Kompartimenten des Endomembransystems.

Der pflanzliche Golgi-Apparat unterscheidet sich in einigen wichtigen Eigenschaften strukturell und funktionell vom Golgi-Apparat der Hefe und Säuger (Robinson et al., 2007). So sind Golgi-Stapel nicht statisch um den Zellkern angeordnet, sondern polydispers im Cytosol verteilt (Boevink et al., 1998; Nebenfuehr et al., 1999) und hoch mobil (Boevink et al., 1998; Brandizzi et al., 2003a).

### 1.1.3 Die endosomalen Kompartimente

Das endosomale System in Säugern und Hefe besteht aus mehreren Kompartimenten, welche in Struktur, Zusammensetzung und Funktion variabel sind (Gruenberg und Stenmark, 2004). Recycling-Endosomen (RE) sind für die Sortierung und das Rezyklieren von Proteinen, frühe Endosomen (*early endosomes*, EE) für die Aufnahme endocytierter Vesikel und späte Endosomen (*late endosomes*, LE) für den Transport zu den Lysosomen bzw. den Vakuolen verantwortlich. Wegen der Beteiligung am Proteintransport zur Vakuole werden LE auch als prävakuoläre Kompartimente (PVC) bezeichnet. In Pflanzen wurde gezeigt, dass ein endosomales, multivesikuläres Kompartiment die Funktion eines PVC ausübt (Tse et al., 2004). Diese multivesikulären Körper (*multivesicular body*, MVB) sind durch die Abschnürung von Vesikeln in das eigene Lumen gekennzeichnet (Gruenberg und Stenmark, 2004; Wollert und Hurley, 2010). Verantwortlich für die Bildung dieser intraluminalen Vesikel (ILV) sind heterologe Proteinkomplexe, die als *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) bezeichnet werden (Hurley und Emr, 2006). Nur durch die Fusion der äußeren Membran der MVBs/LEs könne integrale Membranproteine der ILV in das vakuoläre Lumen entlassen und so für die Degradierung zugänglich gemacht werden (siehe Abb. 1.1, B). Werden Membranproteine in Vesikeln ohne ILV transportiert, fusionieren sie mit dem Tonoplasten und können nicht degradiert werden (siehe Abb. 1.1, A).

EE sind die ersten Kompartimente auf dem endocytischen Transportweg. Es konnte gezeigt werden, dass die tubulo-vesikulären Strukturen des TGNs und das EE funktionelle Subdomänen des gleichen Kompartiments sind (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007; Otegui und Spitzer, 2008, Robinson et al., 2008). Da es zudem räumlich getrennt vom Golgi-Apparat auftreten kann, ist es als unabhängiges Kompartiment zu betrachten (Foresti und Denecke, 2008; Viotti et al., 2010). In Pflanzen stellt das TGN/EE ein *en route*-Kompartiment auf dem Weg zur Vakuole dar. Über den sekretorischen Transportweg erhält es vakuoläre Proteine, die mittels Rezeptor-Liganden-Interaktion sortiert werden müssen (Robinson und Hinz, 1997; Neuhaus und Rogers, 1998; Rojo und Denecke, 2008).



**Abb. 1.1: Mechanismus zur Degradierung von Membranproteinen.** Ein direkter Vesikeltransport von der Plasmamembran (PM) zur Vakuole würde dazu führen, dass die zu degradierenden Proteine in den Tonoplast inseriert werden (A) und nicht abgebaut werden können. Ein Transport von frühen Endosomen (TGN/EE) über die intraluminalen Vesikel (ILV) des MVB/LE ist notwendig, damit Membranproteine das Lumen der lytischen Vakuole erreichen und somit zugänglich für Hydrolasen und andere degradierende Enzyme sind (B).

Das TGN/EE fungiert somit als Schnittstelle zwischen vakuolärem Transport und der Endocytose. Obwohl es Befunde gibt, die für einen sekretorischer Transport über das TGN/EE zur Plasmamembran (PM) sprechen (Viotti et al., 2010), ist die Beteiligung des TGN/EE an der Sekretion noch unzureichend untersucht. So ist beispielsweise die Sekretion von Untereinheiten des Zellulase-Synthase-Komplexes über den Golgi-Apparat, aber ohne Beteiligung des TGN/EE, zur Zellwand möglich (Crowell et al., 2009). Analog zur Situation in Säugern scheint auch das pflanzliche TGN/EE zu einem späten Endosom zu reifen (Niemes et al., 2010b; Scheuring et al., Manuskript eingereicht). Auch eine weitere Reifung der späten Endosomen (PVCs) zu einem späten PVC (*late PVC*) vor der Fusion mit der Vakuole scheint möglich (Foresti et al., 2010).

Viele der endocytierten Membranproteine, wie zum Beispiel verschiedene Transporter oder Rezeptoren wie BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive 1*), müssen für eine Wiederverwendung ständig rezyklieren (Viotti et al., 2010). In Säugern ist sowohl ein direktes Rezyklieren zwischen dem EE und der PM als auch ein Zyklus über das EE zum RE und erst dann zur PM beschrieben (Maxfield und McGraw, 2008). Während das Rezyklieren von Membranproteinen zwischen TGN/EE und PM in Pflanzen gezeigt werden konnte (Geldner et al., 2003; Kleine-Vehn et al., 2006; Geldner et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2008), sind RE bisher morphologisch nicht beschrieben worden. Allerdings mehren sich in den letzten Jahren die Indizien für die Existenz pflanzlicher Recycling-Endosomen (Geldner et al., 2003; Chow et al., 2008; Jaillais et al., 2008).

#### 1.1.4 Die vakuolären Kompartimente

Neben ihren lytischen Funktionen nehmen pflanzliche Vakuolen weitere Aufgaben, wie die Erhaltung des Zellurgors oder Speicherfunktionen von Proteinen, Ionen und anderen Stoffwechselmetaboliten wahr (Wink, 1993). Vakuolen sind von einer Membran, dem Tonoplasten, umgeben und können sich morphologisch und funktionell unterscheiden (Marty, 1999; Hinz et al., 1999). Funktionell kann man Vakuolen in zwei Hauptklassen unterteilen (Zouhar und Rojo, 2009): in lytische Vakuolen (LV) und Proteinspeichervakuolen (PSV). Verschiedene Vakuolen können nicht nur in unterschiedlichen Geweben, sondern sogar innerhalb derselben Zelle vorkommen (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996) und besitzen charakteristische Proteinausstattungen (Hwang et al., 2005). Anhand spezifischer Membranproteine des Tonoplasten, den *tonoplast intrinsic proteins* (TIPs), können LV von PSV unterschieden werden: So sind LV durch die Isoform  $\gamma$ -TIP und PSV durch die Isoformen  $\delta$ -TIP und  $\alpha$ -TIP charakterisiert (Swanson et al., 1998; Jauh et al., 1999).

Der Transport zu den verschiedenen Vakuolentypen erfolgt durch unterschiedliche Sortierungssignale vakuolärer Proteine. Die Signale zur Sortierung (*vacuolar sorting signals*, VSSs) resultieren aus der Aminosäuresequenz und lassen sich in drei Kategorien einteilen: in sequenzspezifische VSS (ssVSS), die am N- und C-Terminus funktionieren, in C-terminale VSS (ctVSS) und in strukturelle VSS (*physical structures*, psVSS) (Matsuoka et al., 1990; Holwerda et al., 1992). Für die N-terminalen sequenzspezifischen vakuolären Sortierungssignale gibt es einen Konsens, die Aminosäuresequenz NPIR (Matsuoka und Neuhaus, 1999). Für einen Gesamtüberblick sei auf die Fachliteratur verwiesen (Robinson et al., 2005; Vitale und Hinz, 2005; Zouhar und Rojo, 2009). Die Sortierungssignale löslicher vakuolärer Hydrolasen werden von Rezeptoren der VSR-Familie (*vacuolar sorting receptor*) am

*trans*-Golgi bzw. am TGN/EE gebunden und dieser Ligand-Rezeptor-Komplex anschließend zum MVB/LE/PVC transportiert (Neuhaus und Rogers, 1998, Robinson et al., 1998). Dieser Transportschritt erfordert die Rekrutierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes über ein Tyrosin-Motiv (YXX $\Phi$ ) der VSR in spezielle Transportvesikel, die CCVs (*clathrin-coated vesicles*; Happel et al., 2004). Neuere Befunde stellen dieses Szenario jedoch in Frage und stellen dem Clathrin-vermittelten Transport zwischen *trans*-Golgi bzw. TGN/EE und MVB/LE eine Reifung des TGN/EE zum MVB/LE gegenüber (Niemes et al., 2010b; Scheuring et al., Manuskript eingereicht). Neben dem Clathrin-vermittelten Transport zur LV wurde ein Transportweg über elektronendichte Vesikel (*dense vesicles*, DVs), ausgehend vom *cis*-Golgi zur PSV identifiziert (Hinz et al., 1999; Hillmer et al., 2001). In diesem Fall erfolgt die Ligandenbindung über Rezeptoren der RMR-Familie (*lumenal Receptor homology domain, trans Membrane domain and Ring-H2 motif in the cytoplasmic tail protein*; Hinz et al., 2007; Park et al., 2007). Als weitere Klasse von Vesikeln wurden in Kürbiszellen (*Cucurbita*) so genannte *precursor-accumulating* (PAC) Vesikel identifiziert, die den Transport von Speicherproteinen vom ER direkt zur PSV vermitteln (Hara-Nishimura et al., 1998; Shimada et al., 2002).

## 1.2 Transportwege des Endomembransystems

### 1.2.1 Mechanismen des Vesikeltransportes

Transportprozesse des Endomembransystems werden durch verschiedene Transportvesikel, die von einer charakteristischen Proteinhülle umgeben sind, vermittelt. Für die Proteinsortierung in diese Vesikel, bedarf es komplexer Sortierungsmechanismen. Das zugrunde liegende Prinzip lässt sich in drei Teilschritte gliedern (Rothman und Wieland, 1996): Zuerst werden Hüllproteine aus dem Cytosol an bestimmte Membranbereiche rekrutiert und es erfolgt die Bildung und Ablösung eines Transportvesikels. Im zweiten Schritt dissoziieren die Hüllproteine und ermöglichen so die Anlagerung des Vesikels an die Zielmembran. Im letzten Schritt erfolgen die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran und die Freigabe der Fracht in das entsprechende Kompartiment (Robinson und Hinz, 1999; Kirchhausen, 2000). Die Regulierung des gesamten Mechanismus setzt die Wechselwirkung verschiedener Einzelkomponenten voraus. Allein für die Vesikelbildung müssen mehrere Proteine interagieren. Im Fall der mit COP (*coat-proteins*) beschichteten Vesikel, kontrollieren GTPasen die Rekrutierung von Hüllproteinen. Diese GTPasen müssen durch GDP/GTP-austauschende Proteine

(*GDP/GTP exchange factor*, GEF) aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert werden, bevor sie aktiviert werden und Hüllproteine binden können (Rutherford und Moore, 2002; Lupashin und Sztul, 2005). Komponenten der Hüllproteine interagieren direkt mit für den Transport bestimmten Membranproteinen, während lösliche Proteine durch Rezeptoren gebunden werden müssen. Die Fusion der Transportvesikel mit der Zielmembran schließt die Interaktion von SNARE-Proteinen (*soluble NSF attachment protein receptor*) mit SNAP (*soluble NSF attachment protein*) und NSF Proteinen (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) ein (Hong 2005, Jahn und Scheller, 2006; Lipka et al., 2007). Neben den SNARE-Proteinen sind Rab-GTPasen (Sogaard et al., 1994; Rutherford und Moore, 2002; Lupashin und Sztul, 2005) und so genannte *Tethering*-Faktoren (Whyte und Munro, 2002) für die Spezifität der Vesikelfusion entscheidend.

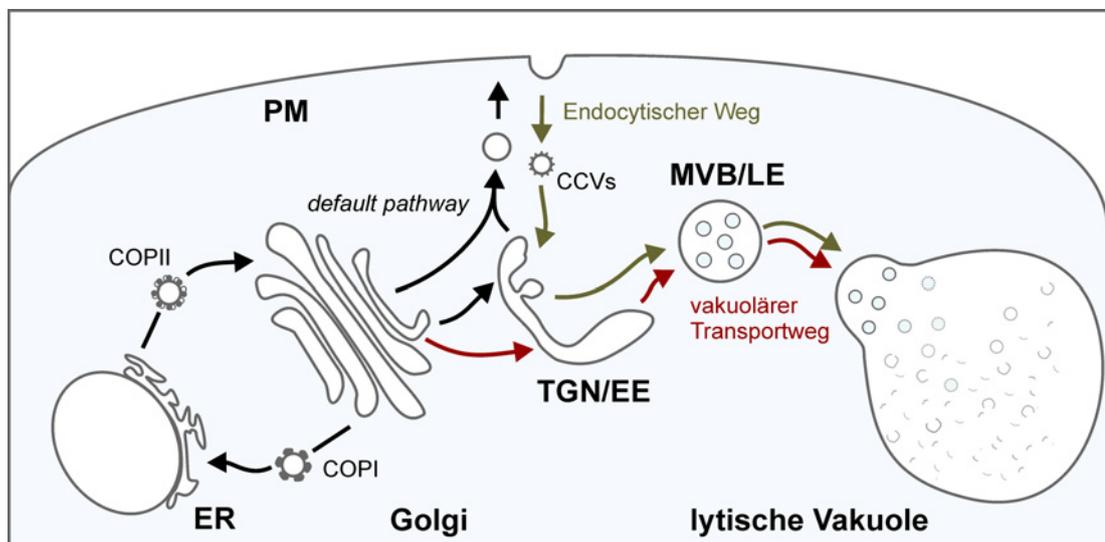
### 1.2.2 Der sekretorische Weg

Als sekretorischer Weg wird der Transportweg von Proteinen und Lipiden vom ER zum Golgi-Apparat und von dort zur PM, also bis in den Extrazellularraum bezeichnet. Der frühe sekretorische Weg beschreibt den Transport zwischen ER und Golgi-Apparat; als späten sekretorischen Weg bezeichnet man die Transportvorgänge ausgehend vom TGN/EE zur PM und die Sortierung zu den vakuolären Kompartimenten. Eine Selektivität der Transportschritte erfolgt über verschiedene Vesikeltypen, die sich in der Zusammensetzung ihrer Hüllproteine unterscheiden (Schekman und Orci, 1996; Robinson et al., 1998a). Verschiedene Klassen von Transportvesikeln sind bekannt: COPI-Vesikel bestimmen den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER; COPII-Vesikel sind für den anterograden Transport zwischen ER und Golgi-Apparat verantwortlich und CCVs vermitteln Transportschritte am TGN/EE. Für das Recycling der vakuolären Sortierungsrezeptoren gibt es eine weitere Klasse von Transportvesikeln, die mit einer als Retromer bezeichneten Proteinhülle die Spezifität des Transportes gewährleisten.

### Der frühe sekretorische Weg

Der anterograde Transport über COPII-Vesikel stellt für lösliche Proteine den Standardtransportweg (*default pathway*) dar. Ihr Transport erfordert kein Sortierungssignal und findet an definierten ER-Exportstellen (*ER export sites*, ERES) statt (Barlowe, 1998). Von hier werden löslichen Proteine ohne Signal kontinuierlich vom ER über den Golgi-Apparat bis in den Extrazellularraum transportiert (Chrispeels, 1991; Denecke et al., 1992). Um von diesem Hauptstrom

(*bulk flow*) des Transportes abzweigen zu können, benötigen Proteine spezifische Sortierungssignale (Pfeffer und Rothman, 1987), wie beispielsweise die besprochenen vakuolären Sortierungssignale (siehe 1.1.4). Lösliche ER-residente Proteine, die das ER über den *default pathway* (siehe Abb. 1.2) verlassen haben, müssen demnach am Golgi-Apparat aussortiert und für eine Anreicherung zurück zum ER transportiert werden. Dieser Mechanismus ist als ER-Retention beschrieben (Vitale und Denecke, 1999). Für den Export von Membranproteinen aus dem ER gibt es keinen Standardweg; COPII-Hüllproteine können mit unterschiedlichen ER-Exportsignalen in den cytosolischen Bereichen von Membranproteinen interagieren und diese so in entstehende Vesikel sortieren (Überblick in Barlowe, 2003; Matheson et al., 2006; Robinson et al., 2007).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Transportprozesse des pflanzlichen Endomembransystems.** Ausgehend vom ER wird der anterograde Transport zum Golgi durch COPII-Vesikel und der retrograde Transport durch COPI-Vesikel vermittelt. Lösliche Proteine ohne Sortierungssignal treten automatisch in den *default pathway* ein und verlassen über den *trans*-Golgi bzw. das *trans*-Golgi Netzwerk/frühe Endosom (TGN/EE) die Zelle. Proteine mit vakuolärem Sortierungssignal werden am *trans*-Golgi bzw. TGN/EE aussortiert und gelangen über das multivesikuläre späte Endosom (MVB/LE) zur Vakuole. Ausgehend von der Plasmamembran (PM) werden Proteine endocytiert und in *clathrin-coated vesicles* (CCVs) zum frühen Endosom (TGN/EE) transportiert. Hier fusionieren der endocytische und der vakuoläre Transportweg und endocytierte Proteine können über das MVB/LE die Vakuole erreichen.

Der retrograde Transport vom *cis*-Golgi zum ER erfolgt durch COPI-Vesikel und gewährleistet zudem, dass der Membranfluss zwischen ER und Golgi-Apparat ausgeglichen bleibt (Lewis und Pelham, 1996). Das notwendige Signal zum Rücktransport löslicher Proteine wurde als C-terminale Aminosäuresequenz HDEL in Säugern (Munro und Pelham, 1987), respektive als C-terminale Aminosäuresequenz KDEL in Hefe (Pelham, 1998) identifiziert. In Pflanzen führt sowohl das Tetrapeptid HDEL als auch die KDEL-Sequenz zur Retention von Proteinen im ER (Denecke et al., 1992). Für Membranproteine konnte eine Sequenz

bestehend aus zwei Lysinen (KKXX oder KXKXX), in den cytosolischen Domänen als ER-Retentionssignal identifiziert werden, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt (Nilsson et al., 1989; Jackson et al., 1993).

### **Der späte sekretorische Weg**

Ausgehend vom Golgi-Apparat, verzweigt sich der späte sekretorische Weg in den Transportweg zur PM und den Transportweg zur lytischen Vakuole (siehe Abb. 1.2). Die Rolle des multifunktionellen TGN/EE der Pflanzen ist hierbei noch unzureichend untersucht. Während gezeigt werden konnte, dass der Rezeptor BRI1 auf dem Weg zur PM über das TGN/EE transportiert wird (Viotti et al., 2010), erreichen andere Membranproteine, wie etwa Untereinheiten der Zellulase-Synthase-Komplexe die PM, ohne das TGN/EE passieren zu müssen (Crowell et al., 2009). Nach derzeitiger Lehrmeinung vermitteln hierbei die CCVs sowohl den selektiven Proteintransport vom *trans*-Golgi bzw. TGN/EE zu den multivesikulären, prävakuolären Kompartimenten (MVB/LE/PVC; Neuhaus und Rogers, 1998; Robinson et al., 1998) als auch den endocytischen Transport, ausgehend von der PM zum TGN/EE (Dhonukshe et al., 2007). Die Proteinhülle von CCVs besteht aus einem Clathrin-Gerüst und Adaptor-Komplexen, die als Bindeglied zwischen Membranproteinen und dem Clathrin-Gerüst dienen. Das Clathrin-Gerüst setzt sich aus den so genannten Clathrin-Triskelia zusammen, die wiederum aus drei leichten Clathrin-Ketten (*clathrin light chain*, CLC) und drei schweren Clathrin-Ketten (*clathrin heavy chain*, CHC) aufgebaut sind. Die heterotetramerischen Adaptor-Komplexe liegen im Cytosol vor und bestehen aus vier Untereinheiten, den Adaptinen (Kirchhausen und Harrison, 1981). Sie enthalten einerseits die Clathrin-Bindestelle, andererseits interagieren sie mit cytosolischen Domänen von Membranproteinen, wie beispielsweise Rezeptoren. Eines der häufigsten Sortierungssignale innerhalb dieser cytosolischen Domänen ist hierbei eine spezifische Aminosäuresequenz, die auf Tyrosin basiert. Diese so genannten Tyrosin-Motive (YXX $\Phi$ , wobei X eine beliebige und  $\Phi$  eine Aminosäure mit hydrophober Seitenkette darstellt) sind auch in den vakuolären Sortierungsrezeptoren der VSR-Familie zu finden (Happel et al., 2004). Folglich werden VSR in CCVs sortiert und zu den prävakuolären Kompartimenten transportiert. Hier wird eine Dissoziation von Rezeptor und Ligand, aufgrund des vermuteten sauren pH-Wertes angenommen. Während Liganden durch die Fusion des MVB/LE/PVC mit der Vakuole ihr Zielkompartiment erreichen, werden die VSR durch Interaktion mit Hüllproteinen des Retromers recycelt (Oliviusson et al., 2006; Foresti und Denecke, 2008). Neuere Befunde stellen das postulierte Retromer-vermittelte Recycling von VSR vom MVB/LE/PVC zum TGN/EE in Frage. So wurden Untereinheiten des Retromers am TGN/EE lokalisiert

und demzufolge wird wahrscheinlich sowohl die Assemblierung des Retromers als auch das VSR-Recycling an diesem Kompartiment initiiert (Niemes et al., 2010b). Obwohl es Hinweise auf ein VSR-Recycling vom TGN/EE zum ER gibt (Niemes et al., 2010a), konnte das Zielkompartiment des Recyclings bisher nicht eindeutig identifiziert werden.

### 1.2.3 Der endocytische Weg

Die Aufnahme von Proteinen und Lipiden in die Zelle ist sowohl für die Ausbildung und Erhaltung der Zellpolarität als auch für die Zellkommunikation und die Interaktion mit der Umgebung von immenser Bedeutung (Doherty und McMahon, 2009; Shivas et al., 2010). Der Prozess der Endocytose schließt die Bildung von Vesikeln an der PM, sowie deren Transport zu den endosomalen Kompartimenten (siehe 1.1.3) ein. Obwohl die Endocytose in Säugern durch die Entdeckung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Insulin schon seit Jahrzehnten bekannt ist (Gorden et al., 1982), wurde die Endocytose in Pflanzen erst in den letzten Jahren vollständig bewiesen. Die große Skepsis gegenüber pflanzlicher Endocytose basierte auf dem hohen Zellturgor in Pflanzenzellen: Eine Aufnahme von Molekülen entgegen des Druckgefälles schien unwahrscheinlich (Cram, 1980). Erste Indizien für die Existenz der Endocytose in Pflanzen lieferten die Aufnahme von Indikatorsubstanzen in Protoplasten (Hillmer et al., 1986; Tanchak und Fowke, 1987). Seit der Einführung amphiphiler, fluoreszierender Farbstoffe (z.B. FM4-64) und der Identifizierung endocytierter Frachtmoleküle, wie etwa PIN1 (*pin-formed 1*) oder den Rezeptoren BRI1 und FLS2 (*flagellin sensitive 2*), gilt die Existenz der Endocytose als bestätigt (Ruscinova und deVries, 2006; Altenbach und Robatzek, 2007; Dhonukshe et al., 2007). Sowohl die der Vesikelbildung vorausgehende Einstülpung der PM durch die Assemblierung von Clathrin-Molekülen (*clathrin coated pits*) als auch die Existenz der Clathrin-Maschinerie (siehe 1.2.2) wurde bereits in Pflanzen nachgewiesen (Robinson und Hillmer, 1990; Holstein, 2002, Barth und Holstein, 2004; Holstein und Oliviusson, 2005).

## 1.3 Ubiquitin als Sortierungssignal für die Endocytose

In Hefe ist die Aufnahme bestimmter Rezeptoren und Transporter von der Funktion des Ubiquitins als Internalisierungssignal abhängig (Rotin et al., 2000; Hicke, 2001). Auch in Säugern wurden analoge Mechanismen beschrieben (Hicke und Dunn, 2003). Ubiquitin ist ein konserviertes, aus 76 Aminosäuren aufgebautes Protein, welches in allen Eukaryoten vorliegt (Pickart und Eddins, 2004). Die in *Arabidopsis* beschriebenen 14 Mitglieder der Ubiquitin Gen-Familie kodieren alle für ein

identisches Protein (Callis et al., 1995). Die Verknüpfung von Ubiquitin mit verschiedenen Proteinen wird als Ubiquitinierung bezeichnet und stellt die häufigste posttranslationale Protein-Modifizierung dar. Hierdurch werden verschiedene Zellantworten, wie die Degradierung von löslichen Proteinen durch das Proteasom, Membran-Transport, DNA-Reparatur, Zell-Zyklus-Regulation und Signaltransmission eingeleitet (Hurley et al., 2006). Eine der wichtigsten Funktionen der Ubiquitinierung ist es, Ubiquitin kovalent mit Proteinen zu verknüpfen, die für den Abbau bestimmt sind. In einer Reihe von Einzelschritten vermitteln Ubiquitin-Ligasen die Bindung der Carboxyl-Gruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin an Amino-Gruppen der Lysine des Substrats. Sobald die erste Ubiquitin-Einheit gebunden hat, können weitere Ubiquitin-Einheiten durch Ubiquitin-Ligasen konjugiert werden (Peng et al., 2003; Xu und Peng, 2008). Die Anzahl und räumlicher Orientierung, der bei dieser Polyubiquitinierung hinzugefügten Ubiquitin-Einheiten, bestimmt dann das weitere Schicksal der modifizierten Proteine (Hicke und Dunn, 2003). Insgesamt finden sich 7 Lysine in der Aminosäuresequenz von Ubiquitin, die für eine Polyubiquitinierung in Frage kommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitin-Bindung an verschiedene Lysine eine Modulation der markierten Proteine bedingt (Kim et al., 2007; Ikeda und Dikic, 2008). Der erste gefundene Bindungstyp in Polyubiquitin-Ketten, war die Bindung an das Lysin an Position 48 von Ubiquitin. Diese Art der Verknüpfung markiert Proteine für die Degradierung durch das 26S-Proteasom im Cytosol (Chau et al., 1989; Finley et al., 1994). Ein weniger gut verstandener Mechanismus ist die Bindung monomerer Ubiquitin-Einheiten an Membranproteine. In Säugern konnte gezeigt werden, dass die Markierung von Membranproteinen durch monomeres Ubiquitin zur Sortierung in das Lumen des MVB/LE führt und diese anschließend in den Lysosomen degradiert werden (Raiborg und Stenmark, 2009; Stringer und Piper, 2011). Der zugrunde liegende Sortierungsmechanismus wird in mehreren Schritten von cytosolischen Protein-Komplexen, zusammen als ESCRT bezeichnet (*endosomal sorting complex required for transport*), ausgeführt (Raiborg und Stenmark, 2009).

#### **1.4 Die Rolle des ESCRT im Abbau von Membranproteinen**

Eines der bestuntersuchten Beispiele für die Interaktion von ubiquitinierten Membranproteinen mit der ESCRT-Maschinerie in Säugern ist die Regulierung (*down-regulation*) des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor*; Dupre et al., 2004). Basierend auf dieser Studie wurde postuliert, dass ubiquitinierte Membranproteine durch Interaktion mit Ubiquitin-bindenden Domänen (*ubiquitin binding domains*, UBDs) bestimmter ESCRT-Untereinheiten an Endosomen erkannt und

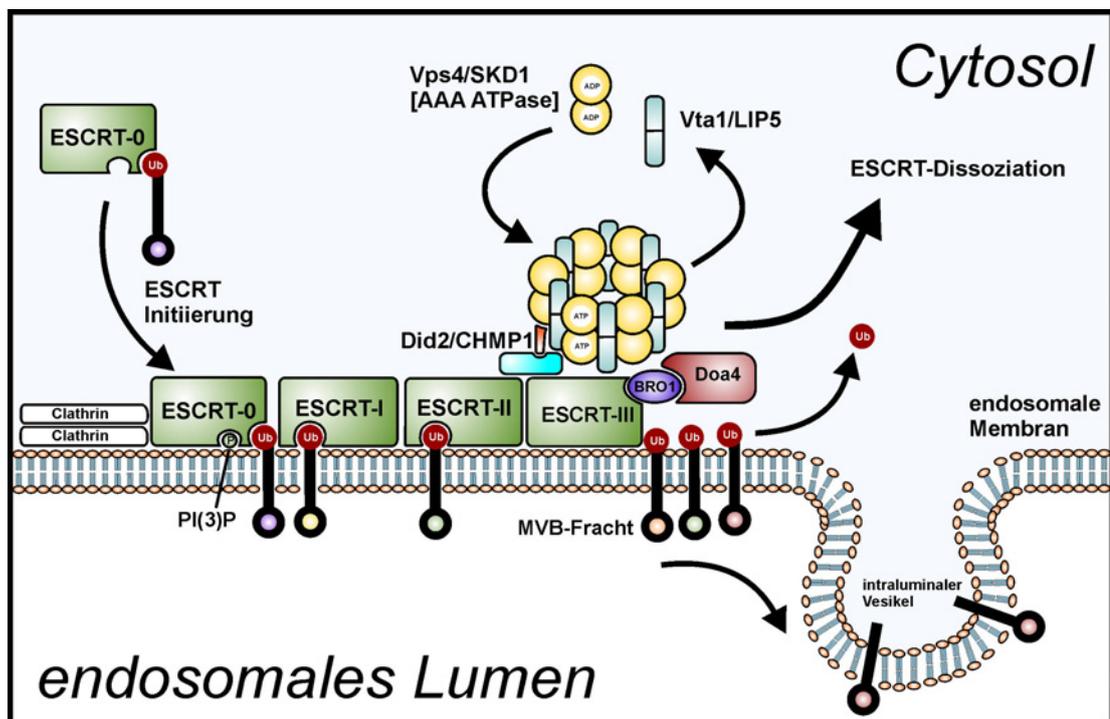
anschließend in intraluminale Vesikel (ILV) internalisiert werden (Hurley und Emr, 2006; Hurley et al., 2006; Raiborg und Stenmark, 2009). Die ESCRT-Maschinerie ist in allen Eukaryoten konserviert (Leung et al., 2008) und für nahezu alle in Säugern und Hefe beschriebenen ESCRT-Untereinheiten wurden pflanzliche Homologe gefunden (Spitzer et al., 2006; Winter und Hauser, 2006; Schellmann und Pimpl, 2009).

#### 1.4.1 Die molekulare Funktion der ESCRT-Maschinerie

Die ESCRT-Funktion kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Erkennung und Bindung ubiquitiniertes Proteine und deren Anreicherung an endosomalen Membranen (1), Sortierung in bestimmte Membranbereiche, sowie Einstülpung bzw. Krümmung dieser Bereiche (2) und Abschnürung der entstehenden ILV in das endosomale Lumen (3). Des Weiteren ist die ESCRT-Maschinerie an nicht-degenerativen Prozessen, wie etwa dem Transport von Hydrolasen in die Vakuole/Lysosomen beteiligt. Einige Hydrolasen werden als inaktive Vorläufer (*precursor*)-Formen transportiert und erreichen nur über eine Sortierung in die ILV des MVB/LE das Lumen der Vakuole, wo sie aktiviert werden (Odorizzi et al., 1998). Es konnte zudem gezeigt werden, dass ESCRT eine essentielle Funktion bei der Membranabschnürung entstehender Tochterzellen während der Cytokinese besitzt (Wollert et al., 2009; Elia et al., 2011). Insgesamt besteht die ESCRT-Maschinerie aus vier heterologen Protein-Komplexen: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III, sowie weiteren assoziierten Proteinen. Die ESCRT-assoziierten Proteine werden als Vps4-Vta1-Komplex bezeichnet und teilweise als eigener, fünfter ESCRT-Teilkomplex gesehen (Hurley und Ren, 2009). Komponenten der ESCRT-Maschinerie werden aus historischen Gründen als Vps-(*vacuolar protein sorting*) Proteine bezeichnet. Insgesamt sind 20 der 60 in Hefe gefundenen Vps-Gene an der Bildung der ESCRT-Teilkomplexe beteiligt. Defekte im vakuolären Transport der Hefe, führten zur Gruppierung der untersuchten Gene in die Klassen A-F. Vps-Gene, deren Mutation zu morphologischen Änderungen der MVBs/LEs, zu so genannten *class E compartment* führten, werden der Klasse E (*class E*) zugesprochen (Raymond et al., 1992; Hurley, 2008).

Das ursprüngliche Arbeitsmodell zur Interaktion der ESCRT-Teilkomplexe beschreibt die Assemblierung der ESCRT-Maschinerie als eine Kaskade gemäß ihrer numerischen Reihenfolge, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und schließlich ESCRT-III. Die serielle Abfolge der ESCRT-Bindung wird deshalb auch als Förderband-Modell (*conveyor belt model*) bezeichnet (Babst, 2005). In den letzten Jahren konnte auch eine parallele Abfolge der ESCRT-Interaktion gezeigt und dem

Förderband-Model das so genannte *concentric circle model* gegenüber gestellt werden (Nickerson et al., 2007). Hierfür spricht beispielsweise, dass ESCRT-I direkt mit ESCRT-III interagieren kann (Bowers et al., 2004; Pineda-Molina et al., 2006) und für die Degradierung des EGF-Rezeptors in Säugern ESCRT-II nicht notwendig ist (Bowers et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ESCRT-I und ESCRT-II gemeinsam für die Protein-Anreicherung an endosomalen Membranen verantwortlich sind und die Bildung von ILV parallel initiieren (Wollert und Hurley, 2010). Einen Überblick aller ESCRT-Komponenten gibt Tabelle 1. In den nächsten Abschnitten wird die Nomenklatur aus Hefe verwendet und das gängige Förderband-Model der molekularen ESCRT-Funktion besprochen (siehe Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Vereinfachtes Model der ESCRT-Maschinerie.** Die gesamte Maschinerie besteht aus 4 heterologen Protein-Komplexen (ESCRT-0, -I, -II und -III), sowie weiteren assoziierten Proteinen, die gemäß des Förderband-Modells (Babst, 2005) in Serie interagieren. Durch Ubiquitin (Ub) markierte Membranproteine werden von ESCRT-0 erkannt und an endosomale Phosphoinositide (PI(3)P) rekrutiert. ESCRT-I und -II konzentrieren die zu degradierenden Membranproteine mit Hilfe von Clathrin in Membraneinstülpungen. ESCRT-III und Interaktionspartner sind sowohl für die Abschnürung der ILV als auch für das Recycling der Ub-Moleküle zuständig (Bro1 bindet ESCRT-III und interagiert mit dem deubiquitinierenden Enzym Doa4). Did2 und CHMP1 binden an ESCRT-III und rekrutieren die AAA-ATPase Vps4, die funktionell als doppelter hexamerischer Ring vorliegt und Energie für die Dissoziation von ESCRT-III bereit stellt. Diese wiederum wird von Vta1 und LIP5 reguliert. (Abbildung modifiziert nach Hurley und Emr, 2006 und Otegui und Spitzer, 2008).

#### 1.4.2 ESCRT-0: Erkennung und Akkumulierung von Frachtmolekülen

ESCRT-0 besteht aus den Untereinheiten Vps27 und Hse1 und initiiert die ESCRT-Maschinerie (Williams und Urbe, 2007). Dabei interagieren verschiedene Ubiquitin-bindende Motive von Vps27 und Hse1, wie das *ubiquitin-interacting motif* (UIM) mit

ubiquitinierten Rezeptoren und anderen Membranproteinen (Wollert et al., 2009). Für die Interaktion von ESCRT-0 mit der ESCRT-I Komponente Vps23 ist Vps27 verantwortlich (Katzmann et al., 2003). Die FYVE-Domäne in Vps27 bindet an Phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) und rekrutiert damit ESCRT-0 an Endosomen (Raiborg et al., 2001). Hier wird eine Anreicherung ubiquitiniertes Proteine mit Hilfe einer Clathrin-Auflagerung (*clathrin plaque*) in Mikrodomänen vermutet (Clague, 2002). Diese Clathrin-Auflagerung ist sowohl an der Oberfläche früher als auch später Endosomen sichtbar (Sachse et al., 2002; Murk et al., 2003).

### 1.4.3 ESCRT-I und ESCRT-II: Membran-Einstülpung und Sortierung

#### ESCRT-I

ESCRT-I besteht aus den vier Untereinheiten Vps23, Vps28, Vps37 und Mvb12, die stöchiometrisch zu gleichen Teilen vorliegen (Chu et al., 2006). ESCRT-I bildet eine 25 nm lange Struktur, die aus einem Kopfteil und einem über einen starren Steg verbundenen Endstück besteht (Kostelansky et al., 2007). Der Kopfteil interagiert mit ESCRT-II und das Endstück (Vps23) übernimmt die Interaktion mit ubiquitinierten Proteinen und ESCRT-0 (Vps27; Kostelansky et al., 2007). Somit rekrutiert Vps23 durch Interaktion mit Vps27 ESCRT-I an Endosomen (Katzmann et al., 2003). Der weitere Verlauf der ESCRT-Assemblierung erfolgt dann durch die Vps28 Untereinheit, die an Vps36 bindet (Teo et al., 2006).

#### ESCRT-II

ESCRT-II setzt sich aus einer Vps36, einer Vps22 und zwei Vps25 Untereinheiten zusammen (Hierro et al., 2004). In Säugern erfolgt die Bindung von Vps28 durch eine, der GLUE-Domäne (*GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45*) benachbarten Helix von VPS36 (Slagsvold et al., 2005). Die GLUE-Domäne selbst bindet sowohl an PI(3)P als auch an Ubiquitin (Alam et al., 2006). In Hefe finden sich zwei sogenannte NZF-Zinkfinger Unterdomeänen innerhalb der GLUE-Domäne von Vps36, die eine Bindung mit Vps28 und gleichzeitig eine Interaktion mit Ubiquitin vermitteln (Teo et al., 2006). In Säugern konnte gezeigt werden, dass ESCRT-I und ESCRT-II gemeinsam für die Deformierung bzw. Einstülpung von Membranen zuständig sind. Eine Vesikel-Abschnürung in das Lumen später Endosomen (MVBs/LEs) nur mit ESCRT-I und ESCRT-II hingegen, konnte nicht gezeigt werden (Wollert und Hurley, 2010).

#### 1.4.4 ESCRT-III und assoziierte Proteine: MVB-Bildung

ESCRT-III besteht aus geladenen Untereinheiten, die in einem Multimer assemblieren. Jeder Komplex besteht aus vier heterologen Untereinheiten: Vps20, Vps32, Vps24 und Vps2. Vor der Assemblierung liegen die Untereinheiten als inaktive Monomere im Cytosol vor; wobei die C-Termini eine autoinhibitorische Funktion aufweisen und die eigenen N-Termini blockieren (Williams und Urbe, 2007; Lata et al., 2008). Während der Assemblierung wird die Inhibierung durch Konformationsänderungen aufgehoben, wodurch die Bindung anderer ESCRT-III Untereinheiten ermöglicht wird. Obwohl biochemische Untersuchungen in Hefe für eine feste Reihenfolge der Assemblierung sprechen (Teis et al., 2008), konnte die genaue Stöchiometrie der Komplexe bisher nicht bestimmt werden. Zunächst wird Vps20 durch Vps25 (ESCRT-II) rekrutiert und bindet dann durch eine Myristoylierung an endosomale Membranen (Teo et al., 2004). Vps20 wiederum kann mit ESCRT-I interagieren (Pineda-Molina et al., 2007). Innerhalb des ESCRT-III bindet Vps20 an Vps32, welches sich zu spiralförmigen Filamenten anordnet (Lin et al., 2005; Shim et al., 2007). Anschließend werden Vps24 und Vps2 assembliert und rekrutieren die ESCRT-III assoziierte AAA-ATPase Vps4 (Teis et al., 2008; Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009). Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Interaktion der MIT (*microtubule interacting and transport*)-Domäne von Vps4 mit dem MIT-interagierenden Motiv (MIM) des C-Terminus von Vps2 (Obita et al., 2007). Den noch unzureichend beschriebenen Protein-Komplexen Ist1-Did2 und Vta1-Vps60, wird eine regulatorische Funktion der Vps4-Aktivität zugesprochen (Rue et al., 2008; Teis et al., 2008;). Es konnte gezeigt werden, dass Vta1 Vps4 in seine funktionelle Form überführt und das die Bildung eines doppelten, hexamerischen Rings aus Vps4-Monomeren (siehe Abb. 1.3) mit der Disassemblierung der ESCRT-Komponenten einhergeht (Hurley, 2008).

Wenngleich der genaue Mechanismus der Vesikel-Abschnürung in das Lumen der MVBs/LEs noch unverstanden ist, sprechen sowohl experimentelle Befunde als auch die Konservierung durch alle Taxa der Eukaryoten dafür, dass ESCRT-III und Vps4 unbedingt notwendig für diesen Mechanismus sind (Hanson et al., 2008; Leung et al., 2008). Sogar in Archaeobakterien, die kein Endomembransystem besitzen, wurden analoge Mechanismen zu Vps4 und ESCRT-III gefunden (Samson et al., 2008).

### 1.4.5 Deubiquitinierung

Obwohl die Ubiquitinierung als Signal für den Eintritt in den degradativen Transportweg zur Vakuole dient, ist die Abspaltung von Ubiquitin durch deubiquitinierende Enzyme (*deubiquitylating enzymes*, DUBs) ebenso von großer Bedeutung für endocytischen und vakuolären Transport (Amerik et al., 2000). Das ESCRT-assoziierte Protein Bro1 ist an der Bindung und Aktivierung des ESCRT-spezifischen DUBs Doa4 beteiligt (Luhtala und Odorizzi, 2004; Richter et al., 2007). Dieses spaltet die reversible, kovalente Ubiquitin-Bindung an Membranproteinen und ESCRT-Komponenten (Dupre und Haguener-Tsapis, 2001). Auf diese Weise wird sowohl Ubiquitin rezykliert als auch die Autoinhibierung durch Ubiquitin von ESCRT-Komponenten verhindert (Swaminathan et al., 1999; Nikko und Andre, 2007). In Säugern sind die beiden strukturell nicht verwandten DUBs AMSH (*associated molecule with the SH3 domain of STAM*) und UBPY (*Ub-specific protease Y*) beschrieben. Neben der Rekrutierung an ESCRT-III wurde auch eine Interaktion mit der ESCRT-0 Untereinheit STAM (Hse1 in Hefe) gezeigt. Beide DUBs deubiquitinieren Polyubiquitin-Ketten, die über das Lysin an Position 63 (*Lys-63-linked*) verknüpft sind. UBPY deubiquitiniert zudem Polyubiquitin-Ketten, die an Position 48 (*Lys-48-linked*) verknüpft sind (Übersicht in Raiborg und Stenmark, 2009). Somit ist die Funktionalität des gesamten Ubiquitinierungs-Deubiquitinierungs-Zyklus essentiell für die Degradierung ubiquitinerter Proteine (Hurley, 2008).

## 1.5 Die ESCRT-Maschinerie in Pflanzen

Homologe der meisten ESCRT-Komponenten und ESCRT-assoziierten Proteine konnten anhand der *Arabidopsis* Genom Datenbank identifiziert werden (Winter und Hauser, 2006). Für ESCRT-0 und die ESCRT-I Untereinheit Mvb12 konnten keine Homologe gefunden werden (Winter und Hauser, 2006; Leung et al., 2008). Erst wenige pflanzliche ESCRT-Komponenten sind funktionell charakterisiert und die Beteiligung der ESCRT-Maschinerie an der Degradierung von ubiquitinierten Membranproteinen ist noch weitestgehend unverstanden. Eine Gegenüberstellung der ESCRT-Komponenten aus Hefe, Säugern und Pflanzen ist in Tabelle 1 zu finden.

Die bislang am besten charakterisierte Komponente der pflanzlichen ESCRT-Maschinerie ist die AAA-ATPase SKD1 (*suppressor of K<sup>+</sup> transport growth defect1*). Neben der Lokalisierung im Cytosol und am MVB/LE (Haas et al., 2007), konnte die

essentielle Bedeutung der AAA-ATPase für den Erhalt von MVBs/LEs, sowie für die Biogenese von Vakuolen gezeigt werden (Haas et al., 2007, Shahriari et al., 2010). Mutationen von SKD1 führten zur Bildung von *class E compartments* und erwiesen sich letztlich als letal (Haas et al., 2007). Auch eine Interaktion von SKD1 mit den ESCRT-assoziierten Proteinen, CHMP1A und B (*charged multivesicular body protein/chromatin modifying protein*), konnte gezeigt werden (Spitzer et al., 2009). Diesen beiden ESCRT-assoziierten Proteinen konnten Funktionen innerhalb des endocytischen Transportwegs zugewiesen werden. So wurden beispielsweise PIN1 und AUX1 (*auxin-resistant1*) in *chmp1a chmp1b* Doppelmutanten nicht in die ILV des MVB/LE sortiert, sondern stattdessen in den Tonoplasten inseriert (Spitzer et al., 2009).

**Tabelle 1: Übersicht der ESCRT-Untereinheiten und ESCRT-assoziierten Proteine in Säugern, Hefe und Pflanzen.** Die in Pflanzen gefundenen ESCRT-Untereinheiten beruhen auf Sequenzvergleiche mit den ESCRT-Untereinheiten der Hefe. (Übersicht basierend auf Leung et al., 2008; Isono et al., 2010 und Shahriari et al., 2011).

	<b>Säuger</b>	<b>Hefe</b>	<b><i>Arabidopsis</i></b>
<b>ESCRT-0</b>	HRS STAM1, 2	Vps27 Hse1	
<b>ESCRT-I</b>	TSG101 VPS28 VPS37A, B, C, D MVB12A, B	Vps23 (Stp22) Vps28 Vps37 Mvb12	VPS23-1, -2, -3 VPS28-1, -2 VPS37-1, -2
<b>ESCRT-II</b>	EAP30 EAP20 EAP45	Vps22 Vps25 Vps36	VPS22 VPS25 VPS36
<b>ESCRT-III</b>	CHMP2A, B CHMP6 CHMP3 CHMP4A, B, C	Vps2 Vps20 Vps24 Vps32 (Snf7)	VPS2-1, -2, -3 VPS20-1, -2 VPS24-1, -2 VPS32-1, -2
<b>Assoziierte Proteine (ESCRT-IV)</b>	SKD1A, B IST1 CHMP1A, B CHMP5 LIP5	Vps4 Ist1 Did2 (Vps46) Vps60 (Mos10) Vta1	SKD1  CHMP1A, B VPS60-1, -2 LIP5
<b>DUBs</b>	ALIX UBPY (USP8) AMSH	Bro1 (Vps31) Doa4	VPS31  AMSH1, 2, 3

Bereits 2006 wurde eine Untereinheit des ESCRT-I (VPS23) charakterisiert, die auf Grund ihres Phänotyps bei Mutation als *ELCH* bezeichnet wurde und an der Cytokinese beteiligt ist (Spitzer et al., 2006). Von der gleichen Forschungsgruppe wurde eine umfangreiche Protein-Protein Interaktionsstudie veröffentlicht, die nahezu alle VPS-Proteine der Klasse E einschließt (Shahriari et al., 2011).

Weiterhin wurden in den letzten Jahren die ersten Membranproteine identifiziert, die ESCRT-abhängig in die ILV des MVB/LE sortiert werden. Neben den erwähnten PIN1 und AUX1 (Spitzer et al., 2009) wurde das für die Cytokinese spezifische SNARE-Protein *KNOLLE* (Reichardt et al., 2007) und der Rezeptor BRI1 (Viotti et al., 2010) ultrastrukturell in ILV nachgewiesen. Mit der Identifizierung des deubiquitinierenden Enzyms AMSH3, wurde ein weiteres Protein gefunden, dass für die Endocytose und die Biogenese der Vakuole essentielles ist (Isono et al., 2010). Anders als in Säugern, konnte keine Interaktion von AMSH3 mit ESCRT-Untereinheiten gezeigt werden.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Für die Degradierung von Membranproteinen, sowie für die damit verbundenen Funktionen, wie etwa die Regulierung von Rezeptoren und Transportern, ist die Bildung intraluminaler Vesikel (ILV) des MVB/LE unabdingbar. Die Erkennung, Sortierung und Abschnürung ubiquitiniertes Membranproteine in die ILV wird hierbei durch die ESCRT-Maschinerie gewährleistet. In Pflanzen wurden bislang nur wenige Komponenten dieser molekularen Maschinerie charakterisiert und bisher konnte weder eine Ubiquitin-vermittelte Internalisierung von Membranproteinen noch eine Interaktion mit ESCRT-Untereinheiten gezeigt werden.

Da die ESCRT-Funktion mit der Entwicklung endosomaler Kompartimente verknüpft ist, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der ESCRT-Maschinerie an grundlegenden Mechanismen der Biogenese und des Proteintransportes des endosomalen Systems in Pflanzen zu untersuchen. Um den genauen Wirkort der einzelnen ESCRT-Teilkomplexe einzugrenzen, wurden Lokalisierungsstudien von ESCRT-Komponenten sowohl auf ultrastruktureller Ebene als auch in transienter Genexpression in *Nicotiana tabacum* angestrebt. Dazu sollten zunächst Antikörper gegen je eine Untereinheit der in Pflanzen bekannten ESCRT-Teilkomplexe (VPS28-ESCRT-I, VPS22-ESCRT-II und VPS2-ESCRT-III) hergestellt werden und die einzelnen Komponenten *in situ* lokalisiert werden. Um Lokalisierungsstudien *in vivo* zu ermöglichen, sollten die gleichen Untereinheiten mit fluoreszierenden Molekülen fusioniert und in transienter Genexpression analysiert werden. Für eine

funktionelle Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie sollten dominant-negative Mutanten der erwähnten Untereinheiten hergestellt werden. Die Analyse der Auswirkungen von Mutationen und bekannten Zellgiften, sollte biochemisch mittels Proteintransportstudien und zellbiologisch am konfokalen Lasermikroskop erfolgen. In einem zweiten Schwerpunkt der Arbeit, wurde die Etablierung eines fluoreszierenden Reportersystems angestrebt, um die Analyse des endocytischen Transportwegs unter definierten Bedingungen zu ermöglichen. Hierbei sollten die an der Endocytose beteiligten Kompartimente identifiziert und durch die Expression von ESCRT-Mutanten die Inhibierung spezifischer Transportschritte untersucht werden. Untersuchungen des Gesamtorganismus am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* erforderten Genotypisierung, Kreuzung und anschließende Analyse verschiedener t-DNA-Insertionslinien unter entwicklungsbiologischen Aspekten. Dadurch sollten Erkenntnisse gewonnen werden, inwieweit die Funktionalität der ESCRT-Maschinerie an Homöostase und Entwicklung der Pflanze beteiligt ist.

## 2 Ergebnisse

Um den komplexen Mechanismus des degradativen Abbaus von Membranproteinen in Pflanzen aufzuklären, sollte in einer Kombination aus biochemischen, genetischen und ultrastrukturellen Methoden die Rolle der ESCRT-Maschinerie an diesem Sortierungsmechanismus untersucht werden. Die Klonierung bestimmter ESCRT-Komponenten und die Herstellung von Antikörpern, sollten die Grundlage für *in vivo* Lokalisierungsstudien und ultrastrukturelle Analyse schaffen und als Bindeglied zwischen strukturellen und funktionellen Untersuchungen dienen.

Repräsentativ für jeden der drei pflanzlichen ESCRT-Teilkomplexe wurde ein Protein aus *Arabidopsis thaliana* für diese Arbeit ausgewählt: Für ESCRT-I VPS28, für ESCRT-II VPS22 und für ESCRT-III VPS2. Die für die Klonierung verwendeten ESCRT-Komponenten mit den korrespondierenden Datenbanknummern von TAIR (<http://www.arabidopsis.org>), sowie Sequenzlänge und Molekulargewicht sind in Tabelle 2.1 angegeben.

**Tabelle 2.1: Übersicht der untersuchten ESCRT-Proteine.** Datenbanknummer, Sequenzlänge und Molekulargewicht sind angegeben.

	VPS28	VPS22	VPS2
Datenbanknummer	At4g21560	At4g27040	At2g06530
Aminosäuren	209	250	229
Molekulargewicht	23,5 kDa	28 kDa	25,3 kDa

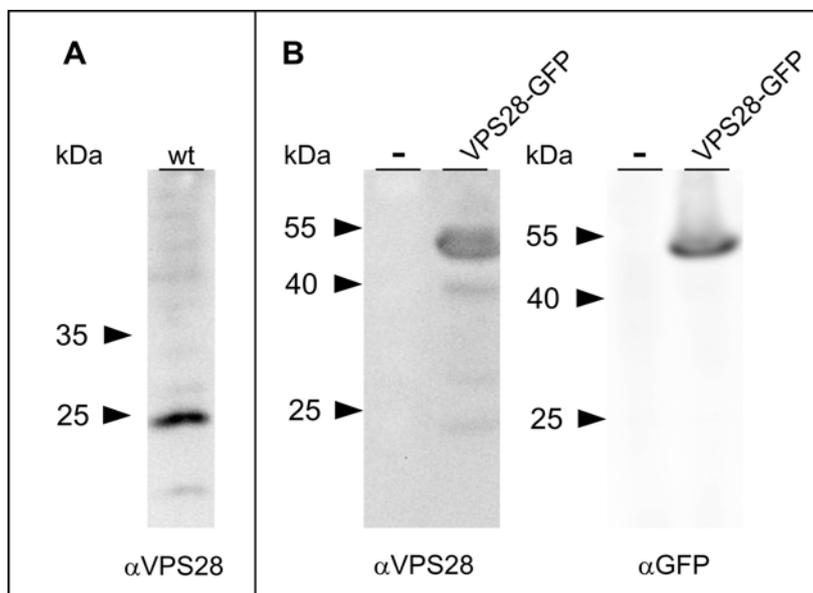
Um den Grad der Konservierung der ESCRT-Komponenten zu bestimmen, wurden die Sequenzen der pflanzlichen ESCRT-Proteine mit den homologen Proteinen aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Säugern (am Beispiel *Homo sapiens*) verglichen. Hierzu wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) paarweise abgeglichen und der resultierende Grad der Konservierung in % angegeben (siehe Tabelle 2.2). Generell ist die Konservierung zwischen pflanzlichen und Säugerproteinen höher als der Grad an Konservierung zwischen Pflanzen und Hefe. Die größte Übereinstimmung mit 54 % besteht zwischen VPS2 und dem Säuger-Homolog CHMP2a.

**Tabelle 2.2: Vergleich pflanzlicher ESCRT-Proteine mit ihren Homologen in Hefe und Säugern.** Alle Werte sind in Prozent angegeben.

Übereinstimmung [%]	VPS28	VPS22	VPS2
Hefe-Homolog (Name)	37 (S288c)	30 (Snf8)	44 (Did4)
Säuger-Homolog (Name)	38 (VPS28)	48 (SNF8)	54 (CHMP2a)

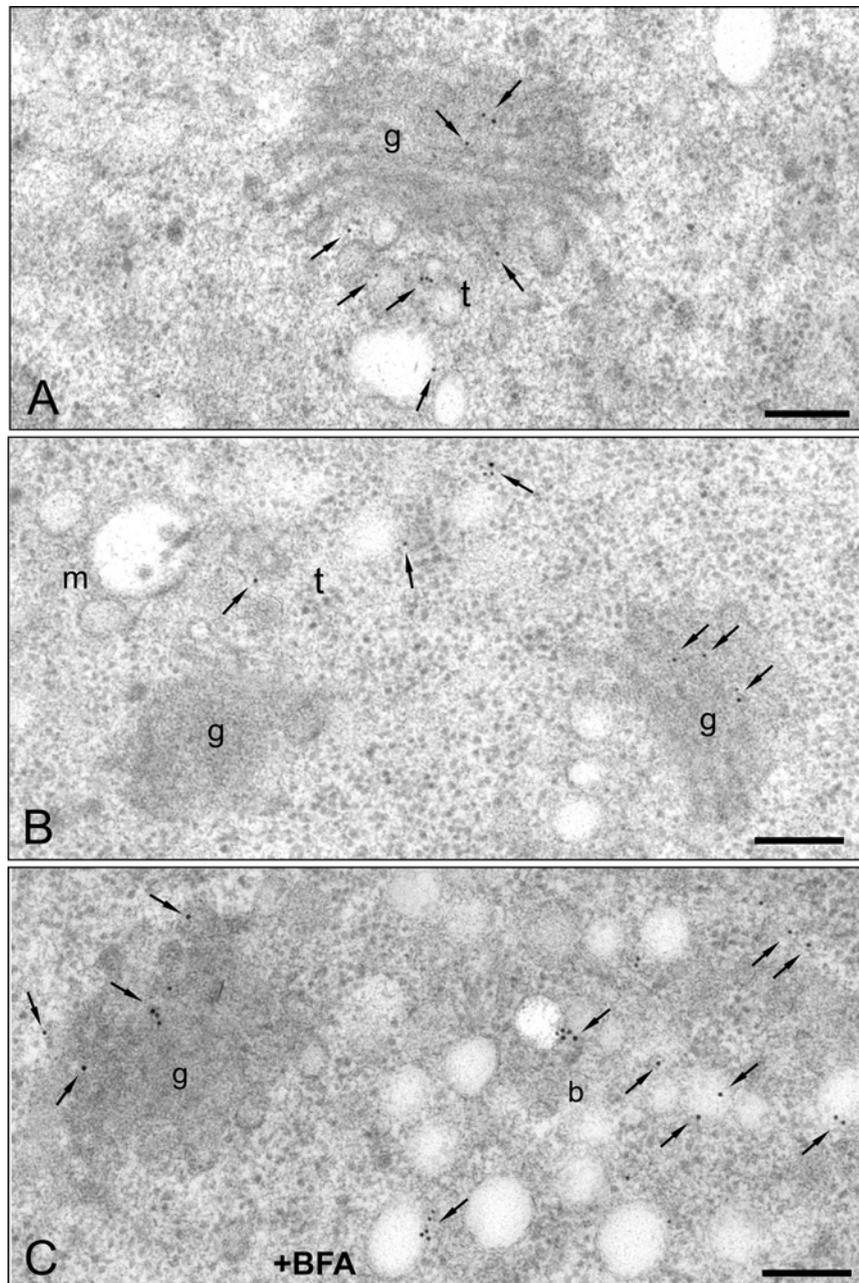
## 2.1 Charakterisierung der ESCRT-I Komponente VPS28

Für die Charakterisierung endogener ESCRT-Komponenten wurden Antikörper gegen die zu untersuchenden VPS-Proteine hergestellt (siehe 4.9.1). Um deren Antigen-Spezifität zu gewährleisten, wurden die VPS-Proteine sowohl endogen als auch in Überexpression als GFP-Fusionen analysiert. Mit Hilfe des VPS28-Antikörpers wurde im Gesamtproteinextrakt von BY2-Zellen ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa detektiert (Abb. 2.1, A), was dem erwarteten Molekulargewicht von VPS28 entspricht (vergleiche Tabelle 2.1). Wurde VPS28 als GFP-Fusion transient in Tabakprotoplasten exprimiert, konnte sowohl mit dem GFP-Antikörper als auch mit dem VPS28-Antikörper ein Protein detektiert werden, dessen Molekulargewicht der Summe der Molekulargewichte von GFP (ca. 30 kDa) und VPS28 (23,5 kDa) entspricht (Abb. 2.1, B).



**Abb. 2.1: Spezifität des VPS28-Antikörpers in Proteinextrakten von *N. tabacum*.** In BY2-Zellen wird ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa detektiert, das dem Molekulargewicht von endogenem VPS28 entspricht (A). In transformierten Tabakprotoplasten können sowohl mit dem VPS28-Antikörper ( $\alpha$ VPS28) als auch mit einem GFP-Antikörper ( $\alpha$ GFP) Proteine detektiert werden, die nach ihrem Molekulargewicht den exprimierten VPS28-GFP Fusionsproteinen zugeordnet werden können (B). Unter identischen Bedingungen wurden in den Negativkontrollen keine Signale gefunden (B, (-)).

Nachdem die Spezifität des Antikörpers bestätigt war, wurde die subzelluläre Lokalisierung des endogenen VPS28 in Hochdruck-gefrorenen HM20-eingebetteten Wurzelspitzen von *Arabidopsis thaliana* (siehe 4.12.3) untersucht.

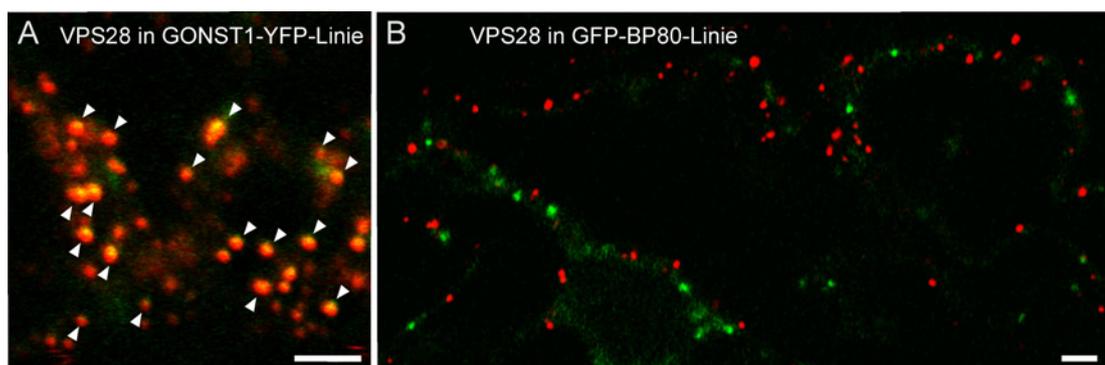


**Abb. 2.2: Immunlokalisierung der ESCRT-I Komponente VPS28.** In ultrastrukturellen Studien wurde die endogene Verteilung von VPS28 in Hochdruck-gefrorenen Wurzelspitzen von *Arabidopsis thaliana* untersucht. VPS28 befindet sich am Golgi (A) und an TGN-Strukturen (B). Nach Behandlung mit Brefeldin A (BFA) ist VPS28 in so genannten BFA-Kompartimenten zu finden (C), ein Befund, der die Lokalisierung am Golgi bzw. dem TGN/EE unterstützt. Schwarze Pfeile zeigen 15 nm Goldkörner an. g = Golgi, t = TGN/EE, m = Mitochondrium und b = BFA-Kompartiment. Die Größe der Maßstabsbalken entspricht 200 nm. Aufnahmen von Herrn Doktor Corrado Viotti.

Die ESCRT-I Komponente VPS28 wurde mehrheitlich am Golgi (Abb. 2.2, A und B) und am TGN/EE (Abb. 2.2, B) gefunden. Bisherige Lokalisierungsstudien in Pflanzen hatten gezeigt, dass ESCRT-Komponenten und ESCRT-assoziierte

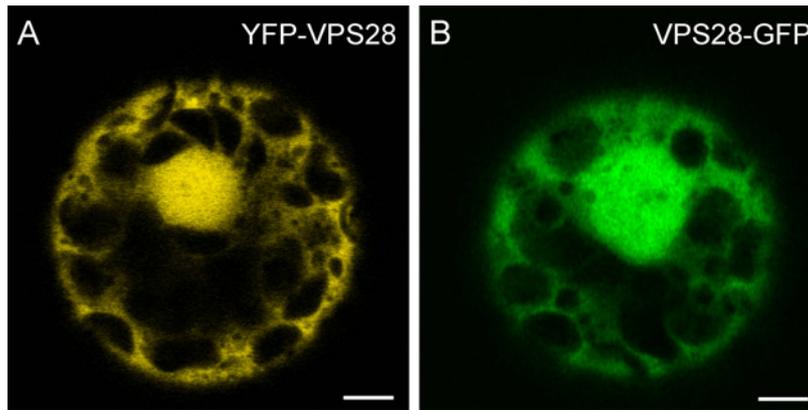
Proteine an Endosomen, besonders dem multivesikulären späten Endosom (MVB/LE), aber keinesfalls am Golgi lokalisiert sind (Haas et al., 2007; Spitzer et al., 2009; Shahriari et al., 2010). Um die unerwartete Lokalisierung von VPS28 am Golgi zu bestätigen, wurden Wurzelspitzen vor der Fixierung eine Stunde mit dem makrozyklischen Lakton Brefeldin A (BFA) behandelt. In *Arabidopsis*-Wurzeln führt BFA führt zu einer Vesikulierung des TGN/EE, welches dann von Golgi-Stapeln umgeben ist (Für eine Übersicht siehe Robinson et al., 2008b). Nach Inkubation mit BFA wurde VPS28 in BFA-Kompartimenten detektiert und konnte somit zweifelsfrei dem Golgi und dem TGN/EE zugeordnet werden (Abb. 2.2, C).

Zur komplementären Analyse wurden Immunfluoreszenz-Studien des endogenen VPS28 in Tabak-BY2-Zellen durchgeführt. In verschiedenen stabil transformierten und fixierten (siehe 4.10.1 und 4.10.2) BY2-Zelllinien, kolokalisierten Signale des VPS28-Antikörpers mit Signalen des Golgi-Markers GONST1-YFP (Abb. 2.3, A). Keine Kolokalisierung wurde hingegen mit dem MVB-Marker GFP-BP80 gefunden (Abb. 2.3, B).



**Abb. 2.3: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von VPS28 in stabil transformierten BY2-Zelllinien.** BY2-Zellen, die den Golgi-Marker GONST1-YFP (in grün) exprimieren, wurden mit dem VPS28-Antikörper untersucht (A, rote Signale). Ein hoher Grad an Kolokalisierung ist zu beobachten (gelbe Signale). Der MVB-Marker GFP-BP80 wurde als zweite Referenz bezüglich der VPS28-Lokalisierung analysiert (B). Hier zeigt sich keine Überlagerung von VPS28-Signalen und GFP-BP80-Signalen. Weiße Pfeilköpfe zeigen Kolokalisierung an. Die Größe der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

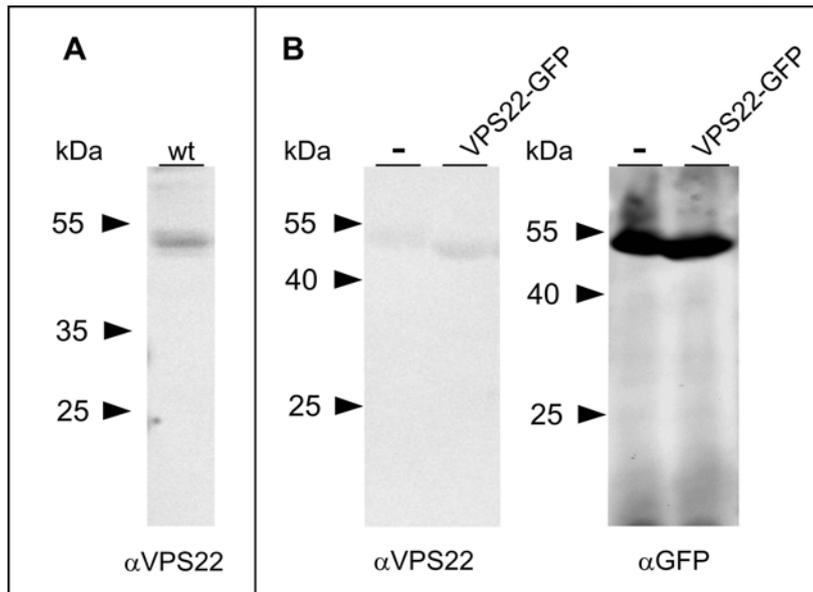
Um VPS28 mittels konfokaler Lasermikroskopie auch *in vivo* untersuchen zu können, wurde die ESCRT-I Komponente aus *Arabidopsis* cDNA amplifiziert und als N-terminales (YFP-VPS28) bzw. C-terminales (VPS28-GFP) Fusionsprotein kloniert (siehe 4.5). Die transiente Expression in Tabakprotoplasten zeigte für beide Fusionsproteine nach 18-24 h Inkubation eine rein cytosolische Verteilung (Abb. 2.4, A und B). Da beide Fusionsproteine augenscheinlich nicht an die Membranen ihrer Zielkompartimente rekrutiert werden konnten, musste auf weitere Lokalisierungsstudien verzichtet werden.



**Abb. 2.4: Transiente Genexpression von VPS28 in Tabakprotoplasten.** Für *in vivo* Untersuchungen am konfokalen Lasermikroskop wurde VPS28 entweder N- oder C-terminal mit einem Fluorophor fusioniert. Jeweils 2-5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden für die Transfektion eingesetzt und die Proben 18-24 h nach der Elektroporation analysiert. Sowohl als N-terminale YFP-Fusion (A) als auch als C-terminale GFP-Fusion (B) zeigte VPS28 eine cytosolische Verteilung. Maßstabsbalken = 5  $\mu\text{m}$ .

## 2.2 Charakterisierung der ESCRT-II Komponente VPS22

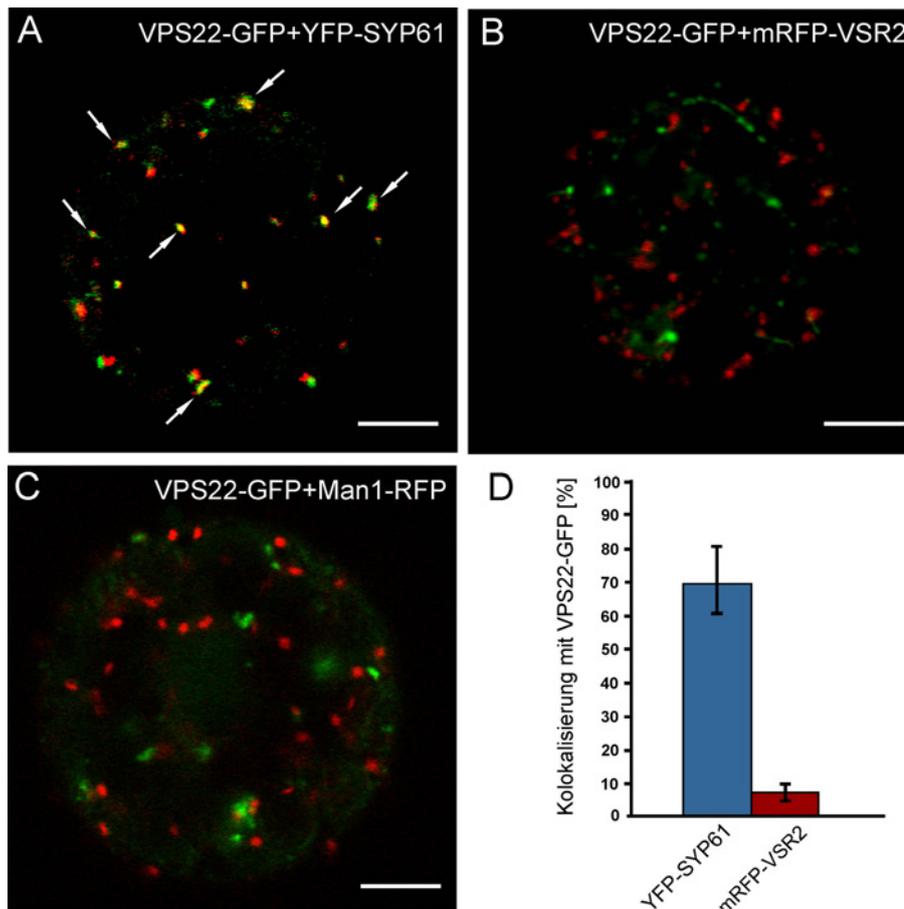
Die Spezifität des Antikörpers gegen die ESCRT-II Komponente VPS22 wurde in gleicher Art und Weise untersucht wie für VPS28 angegeben (siehe 2.1). Der VPS22-Antikörper detektiert im Gesamtproteinextrakt von BY2-Zellen ein Protein von ca. 50 kDa, das damit nicht dem kalkulierten Molekulargewicht des endogenen VPS22 von ca. 28 kDa entspricht (Abb. 2.5, A). Proteine mit etwa 55 kDa wurden in transienter Expression mit dem GFP-Antikörper und dem VPS22-Antikörper sowohl in den Negativkontrollen (-) als auch in den Bahnen mit den exprimierten GFP-Fusionen detektiert (Abb. 2.5, B). Hier stimmt das erwartete Molekulargewicht (Summe aus VPS22 mit ca. 28 kDa und GFP mit ca. 30 kDa) in etwa mit der gefundenen Bandengröße überein. Da sowohl endogenes VPS22 als auch die GFP-Fusion das gleiche Molekulargewicht aufwiesen und sich zudem Signale in den Negativkontrollen zeigten, wurde aufgrund der mangelnden Spezifität des Antikörpers auf Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz-Aufnahmen verzichtet.



**Abb. 2.5: Spezifität des VPS22 Antikörpers in Tabak-Proteinextrakten.** In BY2-Zellen wird ein spezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa detektiert, das nicht dem für VPS22 erwarteten Molekulargewicht von 28 kDa entspricht (A). In transformierten Tabakprotoplasten kann sowohl mit dem VPS22-Antikörper ( $\alpha$ VPS22) als auch mit einem GFP-Antikörper ( $\alpha$ GFP) ein Protein detektiert werden, das bezüglich seines Molekulargewichts in etwa der Summe aus VPS22 und der GFP-Fusion entspricht (B).

Da für endogenes VPS22 keine Lokalisierungsstudien möglich waren, wurde die ESCRT-II Komponente als Fusionsprotein *in vivo* analysiert. Nach erfolgreicher Klonierung des Fusionsproteins (VPS22-GFP, siehe 4.5) wurde VPS22-GFP in transienten Genexpressionsstudien in Tabakprotoplasten untersucht. Im Gegensatz zur Expression der VPS28-Fusionen, wurde eine punktförmige Verteilung der VPS22-GFP Signale detektiert; ein Indiz für eine Rekrutierung an das Zielkompartiment. Damit die VPS22-GFP-Signale einem Kompartiment zugeordnet werden konnten, wurde die ESCRT-II Komponente mit Markerproteinen für das TGN/EE und das MVB/LE koexprimiert. Das SNARE-Protein YFP-SYP61 wurde als TGN-Marker, der vakuoläre Sortierungsrezeptor 2 (VSR2), dessen Ligandenbindungsdomäne durch monomeres RFP ersetzt ist, als MVB-Marker (mRFP-VSR2) ausgewählt.

Koexpression von VPS22-GFP mit YFP-SYP61 zeigte einen hohen Grad an Kolokalisierung der Signale (Abb. 2.6, A, weiße Pfeile), der bei Koexpression mit dem MVB-Marker mRFP-VSR2 (Abb. 2.6, B) bzw. dem Golgi-Marker Man1-RFP (Abb. 2.6, C) nicht gegeben war. Für die endosomalen Kompartimente wurde die Kolokalisierungsrate zudem quantifiziert. Dafür wurden die Signale von  $n=20$  Protoplasten ausgezählt und bezüglich ihrer Kolokalisierung analysiert. VPS22-GFP und der TGN-Marker YFP-SYP61 zeigten etwa 70 % Kolokalisierung, VPS22-GFP und der MVB-Marker mRFP-VSR2 nur etwa 10 % Kolokalisierung (Abb. 2.6, D).

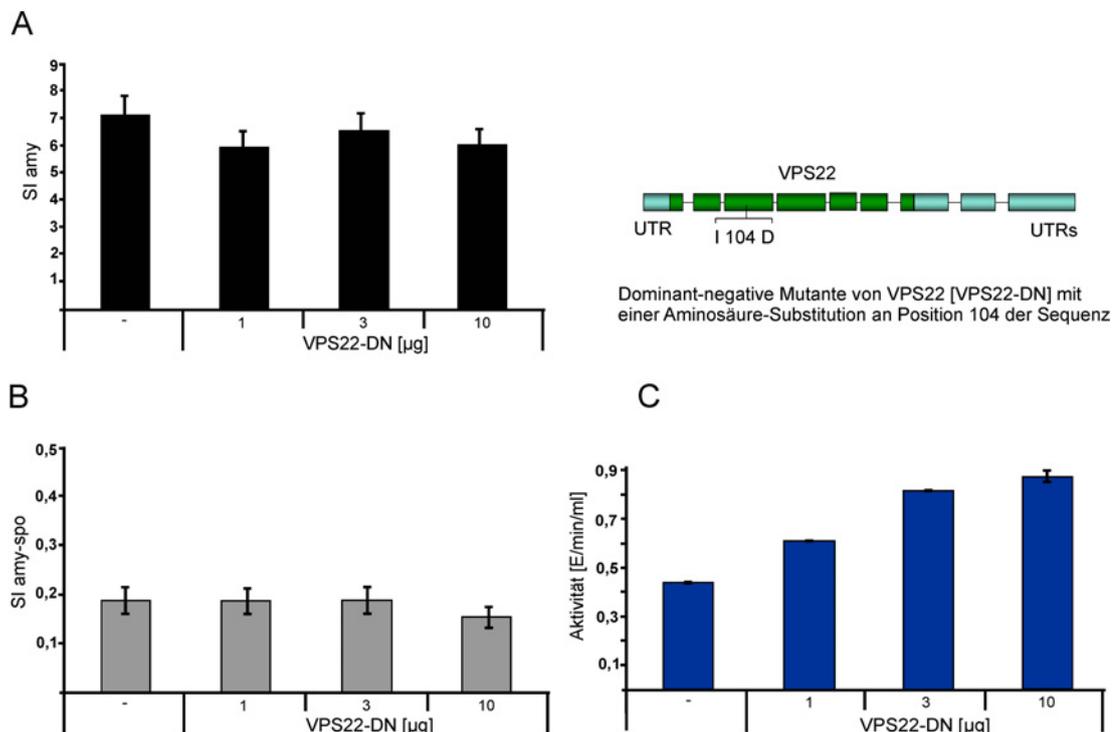


**Abb. 2.6: Lokalisierung von VPS22-GFP in Tabakprotoplasten.** Es wurden 1-10  $\mu$ g Plasmid-DNA elektroporiert und die Proben nach 18-24 h Expressionszeit am konfokalen Lasermikroskop analysiert. VPS22-GFP wurde mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 (A), dem MVB-Marker mRFP-VSR2 (B) oder dem Golgi-Marker Man1-RFP (C) koexprimiert. Die Lokalisierung von VPS22-GFP an Endosomen (TGN/EE und MVB/LE) wurde zudem quantitativ untersucht (D). VPS22-GFP kolokalisiert nicht mit dem Golgi-Marker und zeigt mit dem MVB-Marker nur eine Kolokalisierung von ca. 10 % (D). Eine Kolokalisierungsrate von etwa 70 % wird mit dem TGN-Marker erreicht (D). Weiße Pfeile zeigen Kolokalisierung an. Die Größe der Maßstab Balken entspricht 5  $\mu$ m.

Nachdem gezeigt wurde, dass VPS22 überwiegend am TGN/EE lokalisiert ist und dieses sowohl am sekretorischen Weg als auch am vakuolären Transportweg beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob beide Wege von der Funktionalität von VPS22 abhängen. Durch Proteintransportstudien bekannter Reporter, sollte daher der Einfluss einer VPS22-Mutante auf die Sekretion und den vakuolären Transport untersucht werden. Dafür wurde eine VPS22-Mutante (VPS22-DN) nach dem Vorbild einer dominant-negativen Substitutionsmutante des Vps22p der Hefe (Hierro et al., 2004) generiert (siehe 4.5). Hier wurde die Aminosäure Isoleucin (*single letter code* = I) an Position 104 der Peptidsequenz durch die Aminosäure Asparaginsäure (D) ersetzt und dadurch die Interaktionen mit Vps36p verhindert. Diese ESCRT-II Komponente ist für die Bindung an Vps28 und damit für die Rekrutierung an ESCRT-I verantwortlich (Teo et al., 2006). In Hefe führt diese Mutation zur Bildung

von *class E compartments* und vakuoläre Hydrolasen werden anstatt in das Lumen der Vakuole in den Tonoplasten transportiert.

Um den Einfluss der Mutante auf die Sekretion bzw. den vakuolären Transportweg zu testen, wurde VPS22-DN mit verschiedenen quantifizierbaren Reportern transient in Tabakprotoplasten koexprimiert. Als Reporter für den sekretorischen Weg wurde das Enzym  $\alpha$ -Amylase (*amy*) aus Gerste (*Hordeum vulgare*), für Untersuchungen des Transportweges zur Vakuole ein Derivat der  $\alpha$ -Amylase (*amy-spo*) mit dem sequenzspezifischen vakuolären Sortierungssignal (ssVSS) des Speicherproteins Sporamin (NPIRL) aus der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*), eingesetzt. Beide Reporter können anhand ihrer enzymatischen Aktivität detektiert und das Verhältnis von sekretierten, extrazellulären Molekülen zu intrazellulären Molekülen bestimmt werden (Pimpl et al., 2003, daSilva et al., 2005). Hierzu werden Medium und Zellen nach 18-24 h Inkubation getrennt, enzymatisch analysiert (4.8.3 und 4.8.4) und der Sekretionsindex (SI) als Quotient der Aktivität des Mediums und der Aktivität der Zellen angegeben.

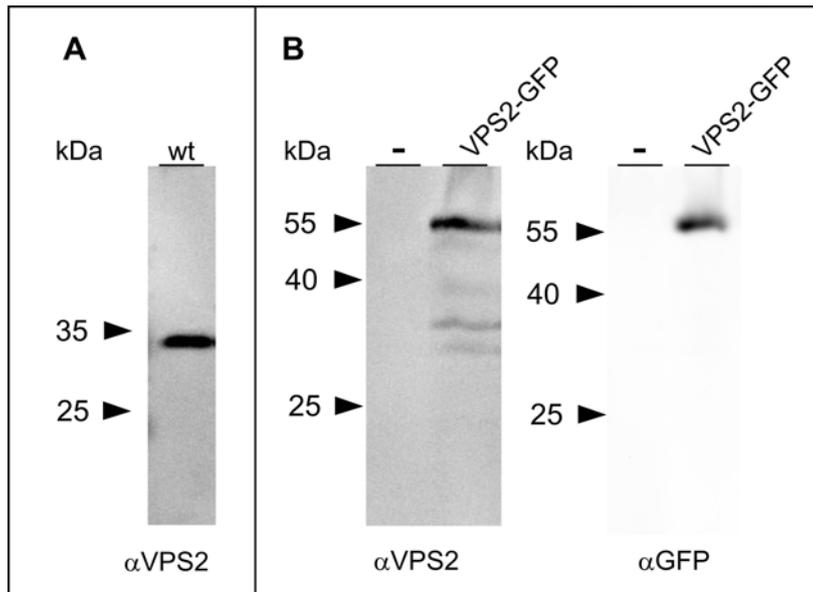


**Abb. 2.7: Einfluss der VPS22 Substitutionsmutante (VPS22-DN) auf den Transport der Reporter *amy* und *amy-spo*.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Als Kontrolle wurden 5  $\mu$ g der für *amy* kodierenden Plasmid-DNA, für *amy-spo* 15  $\mu$ g eingesetzt. Bei konstanter Menge der Reporter wurden 1  $\mu$ g, 3  $\mu$ g und 10  $\mu$ g VPS22-DN koexprimiert. Medium und Zellen wurden nach 18-24 h Inkubation getrennt, enzymatisch analysiert und der Sekretionsindex (SI) berechnet. VPS22-DN zeigt keinen Einfluss auf die Sekretion von *amy* (A). Der Sekretionsindex des vakuolären Reporters *amy-spo* bleibt ebenfalls unverändert (B). Die Aktivität (Summe der Aktivität im Medium und in den Zellen) von *amy-spo* hingegen nimmt um etwa 50 % zu (C). Als Fehler ist die Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

Da amy größtenteils in das Kulturmedium sekretiert wird, ergeben sich für den SI Werte, die sich üblicherweise zwischen 5 und 15 bewegen. Der Reporter amy-spo wird effizient zur Vakuole transportiert und zeigt deshalb eine kaum detektierbare enzymatische Aktivität im Kulturmedium und somit ist auch der SI sehr niedrig ( $SI_{amy-spo} < 0,1$ ). Änderungen des SI von amy deuten auf eine Beeinträchtigung der Sekretion hin, Änderungen des SI von amy-spo auf eine Fehlsortierung innerhalb des vakuolären Transportwegs. Eine aufsteigende Konzentration, der für VPS22-DN kodierenden Plasmid-DNA, wurde sowohl mit amy als auch mit amy-spo koexprimiert. Beide Experimente zeigten keine Veränderung des SI und damit keine offensichtliche Änderung der Sekretion und des vakuolären Transportes (Abb. 2.7, A und B). Bei genauer Analyse konnte jedoch eine Änderung der Gesamtaktivität von amy-spo (Summe aus Aktivität im Medium und in den Zellen) bei Koexpression mit VPS22-DN detektiert werden (Abb. 2.7, C). Nur ein Anstieg intrazellulärer und extrazellulärer Aktivität gleichermaßen kann diese erhöhte Gesamtaktivität bei konstantem SI erklären. Eine Nettozunahme der Aktivität kann als Hinweis für eine, von VPS22-DN verursachte, reduzierte vakuoläre Degradation interpretiert werden.

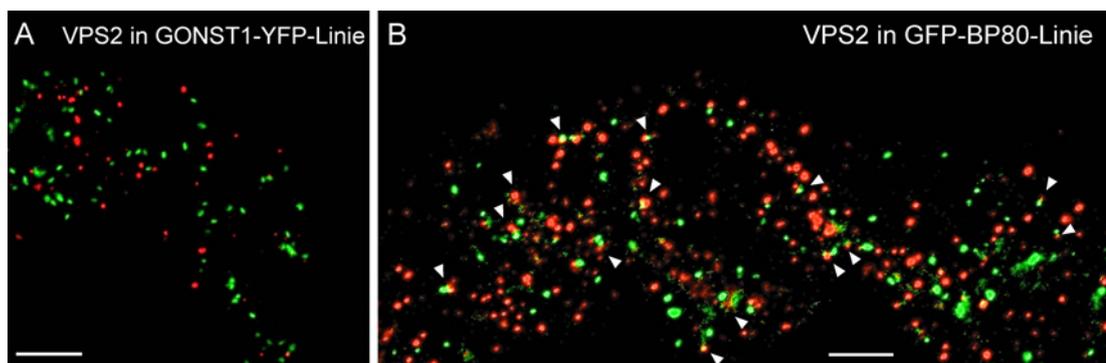
### **2.3 Charakterisierung der ESCRT-III Komponente VPS2**

An erster Stelle stand auch hier die Analyse der Spezifität des VPS2-Antikörpers. Wie für VPS28 (siehe 2.1) und VPS22 (siehe 2.2) beschrieben, wurde VPS2 sowohl endogen mit dem Antikörper gegen VPS2 als auch als GFP-Fusion (VPS2-GFP) mit einem GFP-Antikörper nach transienter Expression untersucht. In BY2-Zellen konnte mit dem VPS2-Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa detektiert werden (Abb. 2.8, A), das in etwa dem erwarteten Molekulargewicht entspricht (siehe Tabelle 2.1). In VPS2-GFP überexprimierenden Tabakprotoplasten konnte sowohl mit dem GFP-Antikörper als auch mit dem VPS2-Antikörper ein Protein von etwa 55 kDa detektiert werden, welches dem VPS2-GFP-Fusionsprotein zugeordnet werden kann und in der Negativkontrolle fehlt (Abb. 2.8, B).



**Abb. 2.8: Spezifität des VPS2-Antikörpers in Proteinextrakten von *N. tabacum*.** In BY2-Zellen wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa detektiert (A), das dem endogenen VPS2 zugeordnet werden kann. In transformierten Tabakprotoplasten wird sowohl mit dem VPS2-Antikörper ( $\alpha$ VPS2) als auch mit einem GFP-Antikörper ( $\alpha$ GFP) ein Protein detektiert, das nach seinem Molekulargewicht (ca. 55 kDa) dem exprimierten VPS2-GFP zugeordnet werden kann (B).

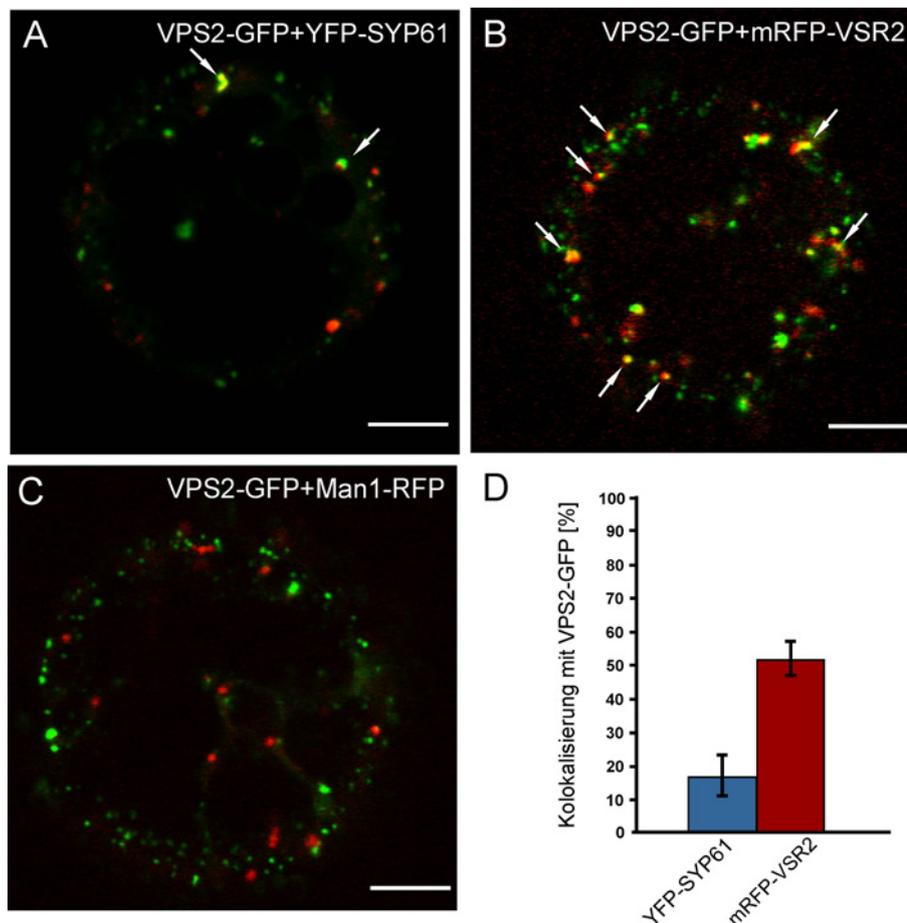
Mit dem VPS2-Antikörper wurden in stabil transformierten und fixierten (siehe 4.10.1 und 4.10.2) BY2-Zelllinien Immunfluoreszenz-Aufnahmen angefertigt. Während VPS2 mit dem Golgi-Marker GONST1-YFP keine Kolo-kalisierung zeigte (Abb. 2.9, A), kolo-kalisiert die Signale des MVB-Markers GFP-BP80 und der ESCRT-Komponente teilweise (Abb. 2.9, B, weiße Pfeilspitzen).



**Abb. 2.9: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von VPS2 in stabil transformierten BY2-Zelllinien.** BY2-Zellen, die den Golgi-Marker GONST1-YFP (A) oder den MVB-Marker GFP-BP80 (B) exprimieren, wurden mit dem VPS2-Antikörper analysiert (rote Signale). Während sich keine Kolo-kalisierung von VPS2 mit dem Golgi-Marker zeigte (A), wurden mit dem MVB-Marker zum Teil überlappende Signale gefunden (B, gelbe Signale). Weiße Pfeilköpfe zeigen Kolo-kalisierung an. Die Größe der Maßstab-balken entspricht 5  $\mu$ m.

Da für Koexpressionsstudien mit einem TGN-Marker keine stabil transformierte BY2-Zelllinie vorhanden war, wurde VPS2 als GFP-Fusion zusätzlich mittels transientscher Expression in Tabakprotoplasten analysiert. Es wurden jeweils 2-10  $\mu$ g Plasmid-DNA der Markerproteine für die Transfektion eingesetzt und die Proben

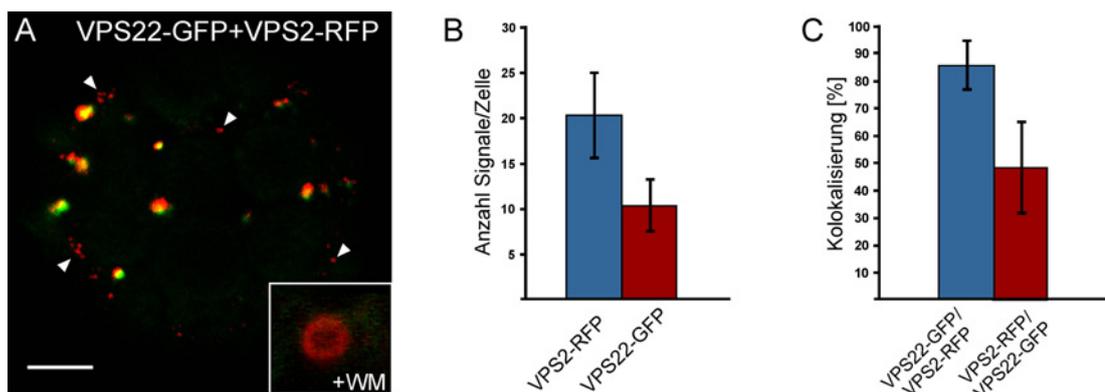
nach 18-24 h Inkubation am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Koexpression mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 führte zu einer sehr geringen Kolokalisierungsrate (Abb. 2.10, A). Die Transfektion mit dem MVB-Marker mRFP-VSR2 zeigte einen deutlich höheren Grad an Kolokalisierung (Abb. 2.10, B) und Transfektion mit dem Golgi-Marker Man1-RFP überhaupt keine Kolokalisierung (Abb. 2.10, C).



**Abb. 2.10: Lokalisierung von VPS2-GFP in transienter Expression in Tabakprotoplasten.** Für jedes Konstrukt wurden 2-10 μg Plasmid-DNA elektroporiert. Alle Proben wurden nach 18-24 h Inkubation am konfokalen Lasermikroskop analysiert. VPS2-GFP wurde mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 (A), dem MVB-Marker mRFP-VSR2 (B) und dem Golgi-Marker Man1-RFP (C) koexprimiert. Die VPS2-GFP-Lokalisierung an Endosomen wurde zudem quantitativ untersucht (D). VPS2-GFP kolokalisiert nicht mit dem Golgi-Marker und zeigt mit dem TGN-Marker nur eine Kolokalisierung von ca. 15 % (D). Eine Kolokalisierungsrate von etwa 50 % wird mit dem MVB-Marker erreicht (D). Weiße Pfeile zeigen Kolokalisierung an. Die Größe der Maßstabbalken entspricht 5 μm.

Quantitative Untersuchungen zur Kolokalisierung der endosomalen Markerproteine zeigten, dass VPS2-GFP-Signale zu etwa 15 % mit dem TGN-Marker und zu mehr als 50 % mit dem MVB-Marker kolokalisierten (Abb. 2.10, D). Für die Quantifizierung wurde der Quotient aus der Anzahl der überlappenden Signale und der Gesamtzahl der Markersignale gebildet. Im Gegensatz zu VPS2-GFP wurde die ESCRT-II Komponente VPS22-GFP überwiegend am TGN/EE und kaum am MVB/LE

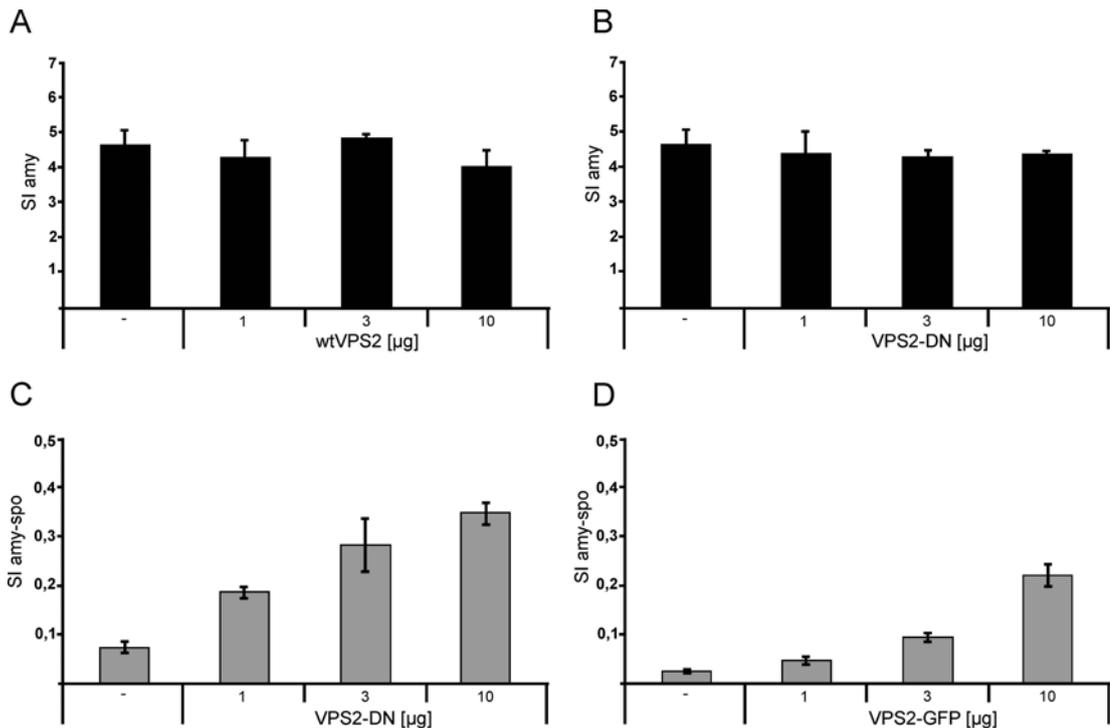
detektiert. Um auszuschließen, dass es sich bei der differentiellen Lokalisierung von VPS22-GFP und VPS2-RFP um Artefakte der Überexpression handelt, wurden VPS22-GFP und ein RFP-Fusionsprotein von VPS2 (VPS2-RFP; siehe Kapitel 4.5) koexprimiert. Obwohl sich eine relativ hohe Koloalierungsrate der beiden ESCRT-Proteine zeigte, koloalisierten speziell VPS2-RFP-Signale oft nicht mit VPS22-GFP (Abb. 2.11, A). Eine einstündige Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  Wortmannin (WM) zeigte, dass nur VPS2-RFP-Signale sensitiv für die Droge waren und typische ringförmige Strukturen (Lam et al., 2007) ausbildeten (Abb. 2.11, A, Einsatz), was als Indiz für eine Lokalisierung am MVB/LE zu werten ist. Eine quantitative Auswertung der Signanzahl pro Zelle ergab, dass etwa doppelt so viele VPS2-RFP-Signale wie VPS22-GFP-Signale auftraten (Abb. 2.10, B). Für eine Quantifizierung der Koloalierung wurden die koloalisierten (gelben) Signale einmal mit der Gesamtzahl der VPS22-GFP-Signale (ca. 10, Abb. 2.11, B) und einmal mit der Gesamtzahl der VPS2-RFP-Signale (ca. 20, Abb. 2.11, B) ins Verhältnis gesetzt. Daraus resultierte eine mehr als 80 prozentige Koloalierung von VPS22-GFP mit VPS2-RFP, gleichwohl umgekehrt weniger als 50 % der zahlreicheren VPS2-RFP-Signale mit VPS22-GFP koloalisierten (Abb. 2.10, C). VPS22-GFP koloalisierte also mit einer Subpopulation von VPS2-RFP am TGN/EE, während eine weitere Subpopulation von VPS2-RFP (die etwa 50 % des Gesamtsignals ausmacht) auch andere Kompartimente markiert. Hierdurch wurde bestätigt, dass die Ergebnisse der vorherigen Lokalisierungsstudien nicht artifiziell waren und beide ESCRT-Komponenten tatsächlich differentiell an Endosomen verteilt sind.



**Abb. 2.11: Transiente Genexpression von VPS22-GFP und VPS2-RFP in Tabakprotoplasten.** Nach 18-24 h Inkubation wurden die Proben am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Um die differentielle Lokalisierung aus Abb. 2.6 und Abb. 2.10 zu prüfen, wurden beide ESCRT-Komponenten koexprimiert (A). Bei Wortmannin-Behandlung (WM) zeigte sich nur VPS2-RFP sensitiv, angezeigt durch ringförmige Strukturen (A, weiß gefasster Einsatz). Die Anzahl an VPS2-RFP-Signalen war etwa doppelt so hoch wie die von VPS22-GFP (B). Daraus resultierte eine hohe Koloalierungsrate von VPS22-GFP mit VPS2-RFP die umgekehrt bedeutend geringer war (C). Weiße Pfeilspitzen zeigen unabhängige VPS2-RFP-Signale an. Für die Quantifizierung wurden  $n=20$  Tabakprotoplasten analysiert. Die Größe der Maßstabballen entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

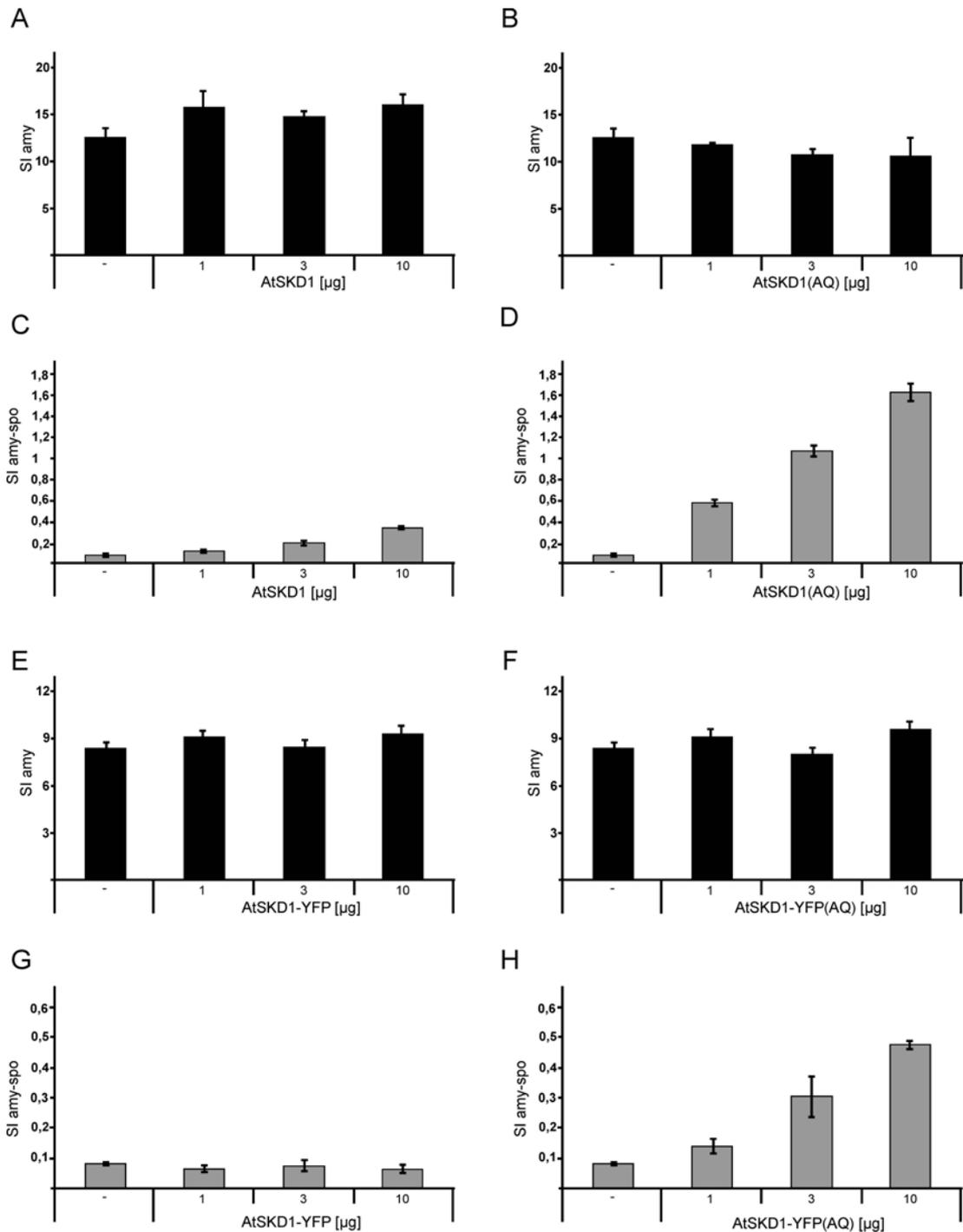
## 2.4 Funktionelle Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie

Für eine funktionelle Analyse der ESCRT-III Komponente VPS2, wurde dessen C-terminales *MIT-interacting motif* (MIM) deletiert. In Hefe ist der C-Terminus von Vps2 für die Interaktion mit der AAA-ATPase Vps4 (SKD1 in Pflanzen) verantwortlich (Obita et al., 2007; Hurley und Yang, 2008). Eine Deletion könnte auch in Pflanzen die Rekrutierung von SKD1 an ESCRT-III und damit die Dissoziation von ESCRT-Komponenten, verhindern. Eine fehlende Dissoziation von ESCRT-Komponenten führt wahrscheinlich zum Abbruch der Bildung ILV des MVBs/LEs und damit zu einem Transportstopp des vakuolären Transportes. Zunächst sollte untersucht werden, ob die generierte VPS2-Mutante (VPS2-DN) einen Einfluss auf die Sekretion bzw. den vakuolären Transport hat. Dafür wurden quantitative Proteintransportstudien, mit dem sekretorischen Reporter amy und dem Reporter für die Vakuole, amy-spo, durchgeführt. Sowohl wildtypisches VPS2 (wtVPS2) als auch VPS2-DN wurden mit amy koexprimiert. Für Untersuchungen des vakuolären Transportes wurden VPS2-DN und VPS2-GFP mit dem Reporter amy-spo koexprimiert. Nach 18-24 h Inkubation wurden die Medien und die Zellen getrennt, enzymatisch analysiert und der Sekretionsindex (SI) berechnet. In Koexpressionsstudien mit dem sekretierten Reporter amy, zeigten weder wtVPS2 noch VPS2-DN einen Effekt auf die Sekretion (Abb. 2.12, A und B). Koexpression von VPS2-DN mit amy-spo führte hingegen zu einer Fehlsortierung: Der SI von amy-spo stieg dosisabhängig auf das fünffache des Kontrollwerts an (Abb. 2.12, C). Anstatt in die Vakuole transportiert zu werden, ist amy-spo nun im Kulturmedium detektierbar und verhält sich wie der sekretierte Reporter amy. Dieser Effekt ist in der Literatur als induzierte Sekretion löslicher vakuolärer Proteine beschrieben (daSilva et al., 2005). Wird die GFP-Fusion von VPS2 (VPS2-GFP) mit amy-spo koexprimiert, zeigt sich der gleiche Effekt wie für VPS2-DN, wenngleich schwächer ausgeprägt (Abb. 2.12, D). Dies deutet darauf hin, dass die Fusion eines Fluorophors am C-Terminus von VPS2 die Interaktion mit SKD1 beeinträchtigt.



**Abb. 2.12: Quantitative Proteintransportstudien mit wtVPS2, VPS2-DN und VPS2-GFP.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Als Kontrolle wurden 5 µg der für amy kodierenden Plasmid-DNA, für amy-spo 15 µg eingesetzt. Bei gleichbleibender Menge der Reporter wurden 1 µg, 3 µg und 10 µg der zu untersuchenden VPS2-Proteine koexprimiert. Medium und Zellen wurden nach 18-24 h Inkubation getrennt, enzymatisch analysiert und der Sekretionsindex (SI) berechnet. Weder wtVPS2 noch VPS2-DN beeinflussten die Sekretion des Reporters amy (A und B). Vakuolärer Transport hingegen ist durch Expression von VPS2-DN (C) und VPS2-GFP gestört und amy-spo wird in das Kulturmedium sekretiert (induzierte Sekretion). Als Fehler ist die Standardabweichung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

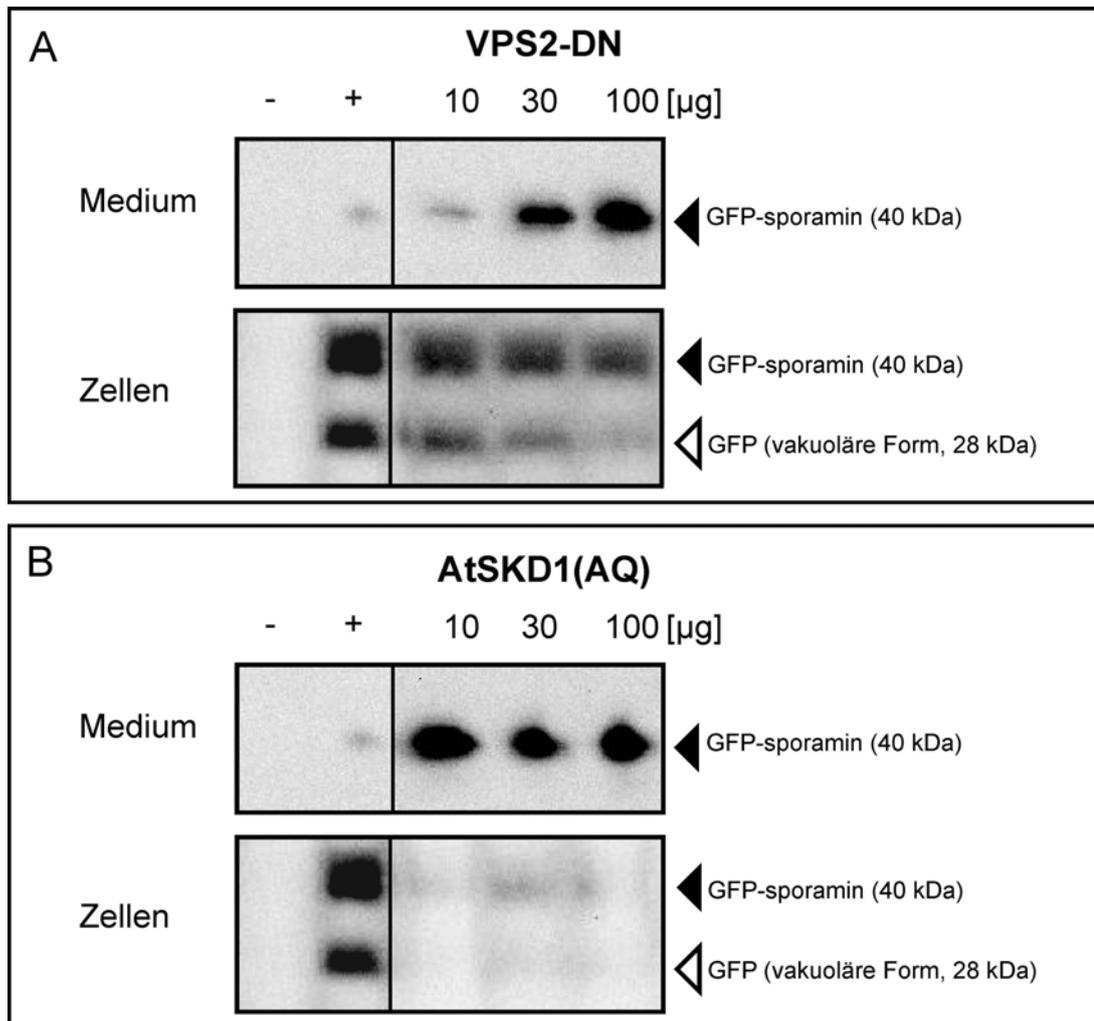
Eine Mutagenisierung von SKD1 sollte demnach zu einem ähnlichen Phänotyp, wie für VPS2-DN beobachtet, führen. Deshalb wurde das wildtypische SKD1 (AtSKD1), eine dominant-negative SKD1-Mutante (Shahriari et al., 2010, AtSKD1(AQ)) und die entsprechenden YFP-Fusionen bezüglich ihres Effektes auf die Sekretion und auf den Transport zur Vakuole untersucht. Wie schon bei der Expression von wtVPS2 und VPS2-DN, zeigte sich sowohl bei Expression von AtSKD1 als auch bei Expression von AtSKD1(AQ) kein Einfluss auf die Sekretion des Reporters amy (Abb. 2.13, A und B). Auch die C-terminalen YFP-Fusionen beider Proteine beeinflussten die Sekretion nicht (Abb. 2.13, E und F). Wurde stattdessen der Transport von amy-spo untersucht, zeigte sich eine dosisabhängige induzierte Sekretion vakuolärer Fracht, wie auch zuvor bei der Expression von VPS2-DN zu beobachten war (vergleiche Abb. 2.13, C und D mit Abb. 2.12, C). Besonders die Mutante AtSKD1(AQ) zeigte eine starke Fehlsortierung; der SI verzweifachte sich im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2.13, D). Alle C-terminalen YFP-Fusionen zeigten eine Reduzierung dieses Effektes.



**Abb. 2.13: Quantitative Proteintransportstudien mit AtSKD1, einer SKD1-Mutante (AtSKD1(AQ)) und ihren C-terminalen YFP-Fusionen.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Als Kontrolle wurden 5 µg der für amy kodierenden Plasmid-DNA, für amy-spo 15 µg eingesetzt. Bei gleichbleibender Menge der Reporter wurden 1 µg, 3 µg und 10 µg der für SKD1-Proteine kodierenden Plasmid-DNA eingesetzt. Medium und Zellen wurden nach 18-24 h Inkubation getrennt, enzymatisch analysiert und der Sekretionsindex (SI) berechnet. Keines der untersuchten Proteine beeinflusst die Sekretion (A, B und E, F). Koexpression von AtSKD1 oder AtSKD1(AQ) mit amy-spo führt zur induzierten Sekretion des vakuolären Reporters (C und D), wobei der Effekt der Mutante wesentlich stärker ausgeprägt ist. Die YFP-Fusionen schwächen die beobachteten Effekte auf amy-spo ab; keine induzierte Sekretion ist mit AtSKD1 zu beobachten (G) und der Einfluss der Mutante ist reduziert (H). Als Fehler ist die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten angegeben.

Wurde AtSKD1-YFP exprimiert, war keine induzierte Sekretion mehr zu beobachten (Abb. 2.13, G) und auch die von AtSKD1-YFP(AQ) verursachten Effekte gingen, im Vergleich zur Mutante ohne YFP-Fusion, stark zurück (Abb. 2.13, H).

Zur komplementären Analyse der in Transportstudien gezeigten Effekte, wurden VPS2-DN und AtSKD1(AQ) anhand von Western-Blot Analysen untersucht. Hierzu wurde GFP-sporamin als Reporter für den vakuolären Transport eingesetzt.

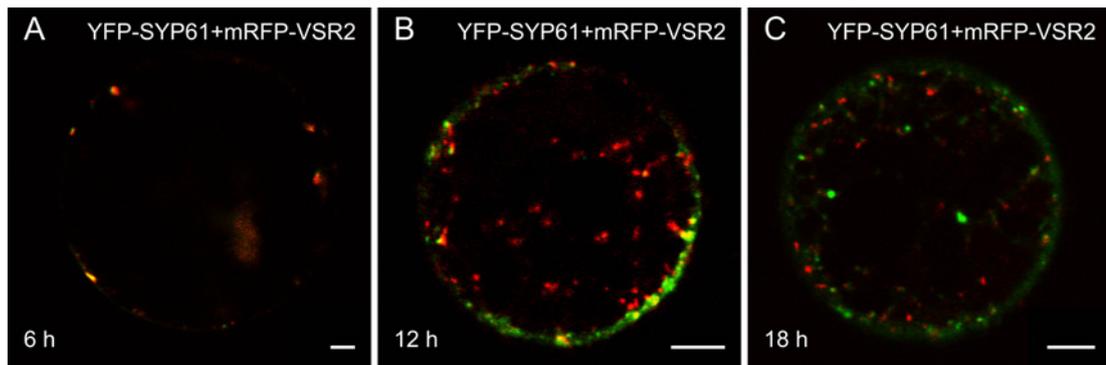


**Abb. 2.14: Western-Blot Analyse der Effekte von VPS2-DN und AtSKD1(AQ) auf den vakuolären Transport.** GFP-sporamin und je eine der ESCRT-Mutanten wurden in Tabakprotoplasten transient koexprimiert. Nach 24 h Inkubation wurden Medium und Zellen getrennt, analysiert und die Signale mittels eines GFP-Antikörpers detektiert. Wird GFP-sporamin als Kontrolle exprimiert (+), ist nur ein sehr schwaches Signal im Medium zu detektieren. Die Negativkontrolle (-) zeigt weder in der Mediumprobe noch in der Zellprobe Signale. Quantitativ lässt sich der Reporter in seiner transitorischen Form (40 kDa) und seiner prozessierten, vakuolären Form (28 kDa) etwa gleich stark in den Zellen detektieren. Mit steigender eingesetzter VPS2-DN Konzentration nimmt die vakuoläre Form von GFP-sporamin ab und der Reporter wird stattdessen vermehrt im Medium detektiert (A). Expression von AtSKD1(AQ) zeigt den gleichen Effekt und führt schon bei 10 µg eingesetzter Plasmid-DNA zum Totalverlust des vakuolären und auch des transitorischen GFP-Signals. Nur im Medium kann noch GFP detektiert werden (B).

Werden Zellen, die einen GFP-fusionierten Reporter für die Vakuole exprimieren, bei Dunkelheit inkubiert, so wird das GFP nicht vollständig degradiert und bleibt fluoreszent (daSilva et al., 2005). Diese charakteristische Bildung einer vakuolären GFP-Form, mit einem spezifischen Molekulargewicht von ca. 28 kDa, wurde genutzt, um die Effekte der Expression von VPS2-DN und AtSKD1(AQ) zu untersuchen. In der Positivkontrolle (Abb. 2.14, (+), Medium) ist eine sehr schwache 40 kDa Bande im Medium zu erkennen, in der Zellfraktion dagegen werden zwei starke Banden detektiert, die ihrer Größe nach GFP-sporamin und der prozessierten, vakuolären Form entsprechen (Abb. 2.14, (+), Zellen). Koexpression des Reporters und VPS2-DN führte zu einer dosisabhängigen Verstärkung des GFP-sporamin Signals im Medium und einer deutlichen Reduktion der vakuolären Form von GFP in den Zellen (Abb. 2.14, A). Exprimiert man AtSKD1(AQ), so verschwindet sowohl die prozessierte als auch die transitorische Form von GFP in der Zellfraktion schon bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration an Plasmid-DNA (10 µg) und ein sehr starkes GFP-sporamin Signal kann im Medium detektiert werden (Abb. 2.14, B). Auch bei höher eingesetzten Plasmid-Konzentrationen wird das Signal im Medium nicht stärker; ein Hinweis darauf, dass die Inhibierung des vakuolären Transportes schon maximal ausgebildet ist. Der in den quantitativen Transportstudien gezeigte Effekt der induzierten Sekretion vakuolärer Fracht (siehe Abb. 2.12 und Abb. 2.13), konnte somit auch anhand von Western-Blot Analysen bestätigt werden.

## **2.5 An welchem Kompartiment erfolgt eine Fehlsortierung?**

Für eine detailliertere Untersuchung des durch die Expression der ESCRT-Mutanten gestörten vakuolären Transportes, sollte ermittelt werden, an welchem Kompartiment die Fehlsortierung erfolgt. Deshalb wurde der Einfluss von VPS2-DN auf die Verteilung endosomaler Marker untersucht. Eine Änderung der Verteilung von TGN- und MVB-Markern sollte mit einer Änderung der Koloalierungsrate einhergehen. Da bekannt ist, dass Markerproteine erst nach einiger Zeit ihre Normalverteilung einnehmen (Niemes et al., 2010a; Robinson et al., 2011), sollte die minimale Inkubationszeit für das Erreichen der typischen Verteilung der endosomalen Reporter bestimmt werden. Als Voraussetzung für die Analyse von VPS2-DN wurde deshalb in Zeitreihen-Untersuchungen die Koloalierung von TGN- und MVB-Marker analysiert.

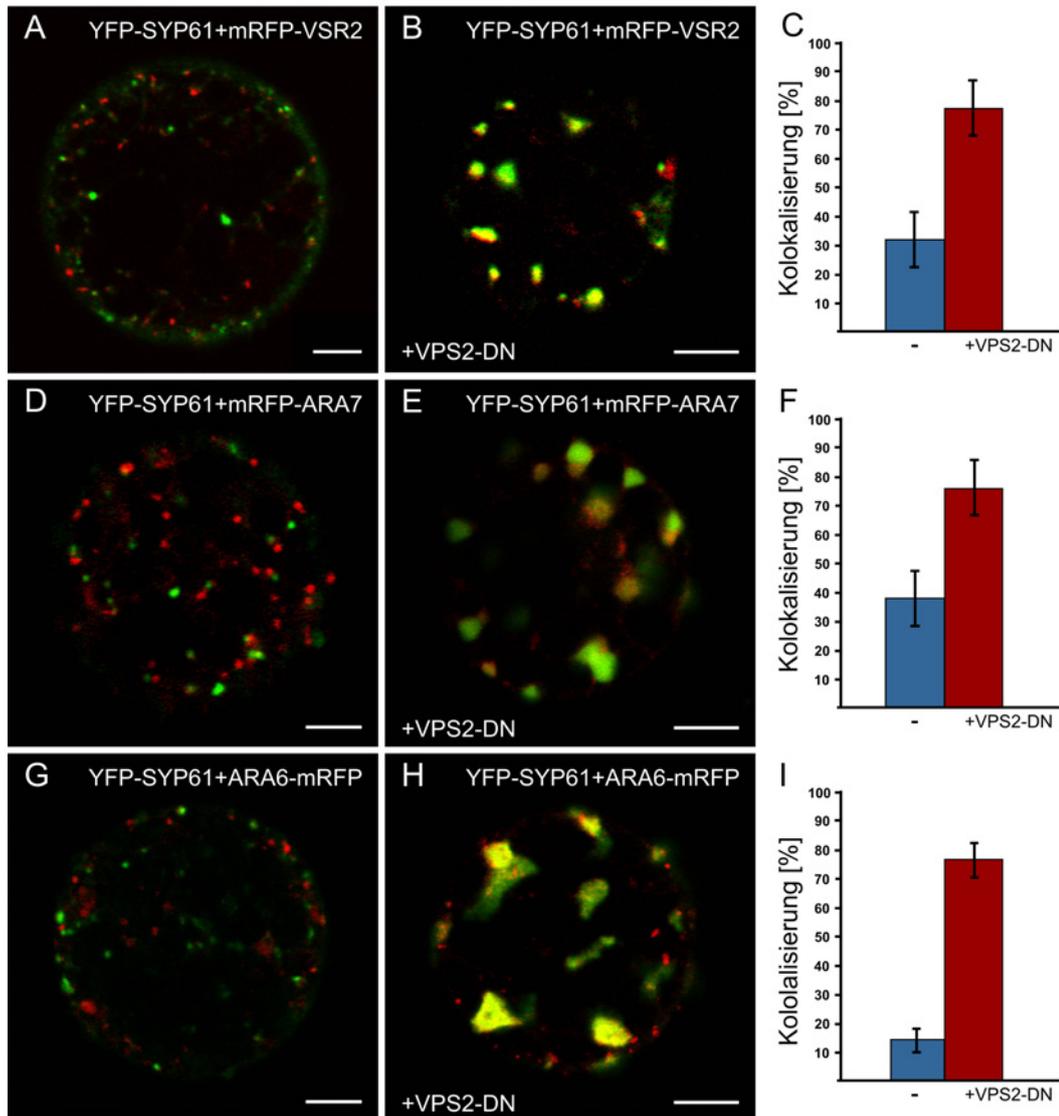


**Abb. 2.15: Zeitreihe der Verteilung des TGN-Markers YFP-SYP61 und des MVB-Markers mRFP-VSR2 in transienter Expression.** Für YFP-SYP61 wurde 1 µg der kodierenden Plasmid-DNA, für mRFP-VSR2 5 µg der kodierenden Plasmid-DNA elektroporiert. Nach 6 h (A), 12 h (B) und 18 h (C) Inkubation wurde die Verteilung der Marker untersucht. Je länger inkubiert wurde, desto mehr nahm die Kolokalisierungsrate ab. Erst nach 18 h erreichten die Markerproteine ihre Normalverteilung. Die Größe der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

Dafür wurden YFP-SYP61 als TGN-Marker und mRFP-VSR2 als MVB-Marker koexprimiert und CLSM-Aufnahmen 6 h, 12 h und 18 h nach Transfektion angefertigt. Die Signalstärke nach 6 h war schwach und die vorhandenen Signale kolokalisierten größtenteils (Abb. 2.15, A). Nach 12 h war das Expressionsniveau wesentlich höher und die Kolokalisierungsrate gesunken (Abb. 2.15, B). Nach 18 h schließlich, kolokalisierten TGN-Marker und MVB-Marker kaum und die Signalstärke blieb konstant (Abb. 2.15, C). Die Kolokalisierung beider Markerproteine in transienter Expression bei kurzer Inkubationszeit (6 h und 12 h) lässt sich durch den graduellen Transport durch die Kompartimente des Endomembransystems, bis zum Erreichen des Zielkompartiments, erklären (Niemes et al., 2010a; Robinson et al., 2011). Der Einfluss von VPS2-DN auf die Verteilung von TGN- und MVB-Markern wurde deshalb erst nach mindestens 18 h Inkubationszeit analysiert. Für VPS2-DN wurden 30 µg Plasmid-DNA eingesetzt, was in Western-Blot Analysen zu einer deutlichen Fehlsortierung vakuolärer Fracht geführt hatte (siehe Kapitel 2.4). Für eine Redundanz der Ergebnisse, wurden verschiedenen Markerproteine für das MVB (mRFP-VSR2, mRFP-ARA7 und ARA6-mRFP) mit YFP-SYP61 koexprimiert und die Änderung der Signalverteilung in Abhängigkeit von VPS2-DN analysiert. Als Referenz und Kontrolle wurde YFP-SYP61 jeweils mit einem Marker für das MVB/LE koexprimiert und die Kolokalisierungsrate ohne VPS2-DN bestimmt (Abb. 2.16, A, D, G). Hierzu wurden die Signale von n=20 Tabakprotoplasten ausgezählt und die durch Überlappung grüner und roter Signale resultierenden gelben Signale als Kolokalisierung gewertet.

Die Koexpression von YFP-SYP61 und mRFP-VSR2 führte zum Auftreten zweier unabhängiger, punktförmiger Signalpopulationen (Abb. 2.16, A). Wurden die beiden Markerproteine nun mit VPS2-DN koexprimiert, zeigte sich eine wesentlich größere Überlappung (Abb. 2.16, B), sodass die Kolokalisierungsrate auf fast 80 % anstieg (Abb. 2.16, C). Die Kolokalisierungsrate des TGN-Markers YFP-SYP61 mit dem MVB-Marker mRFP-ARA7 stieg durch Expression von VPS2-DN ebenfalls deutlich, auf etwa 75 % an (Abb. 2.16, F). Hierbei zeigten sich zudem vergrößerte, für beide Markerproteine untypische Signale (Abb. 2.16, E). Der gleiche Effekt konnte beobachtet werden, wenn ARA6-mRFP als MVB-Marker exprimiert wurde (vergleiche Abb. 2.16 G und H). Hier stieg die Kolokalisierungsrate von ca. 15 % auf über 70 % an (Abb. 2.16, I). Die durch die Expression von VPS2-DN gesteigerte Kolokalisierungsrate endosomaler Markerproteine ist voraussichtlich durch einen inhibitorischen Effekt auf den Transport vom TGN/EE zum MVB/LE zu erklären.

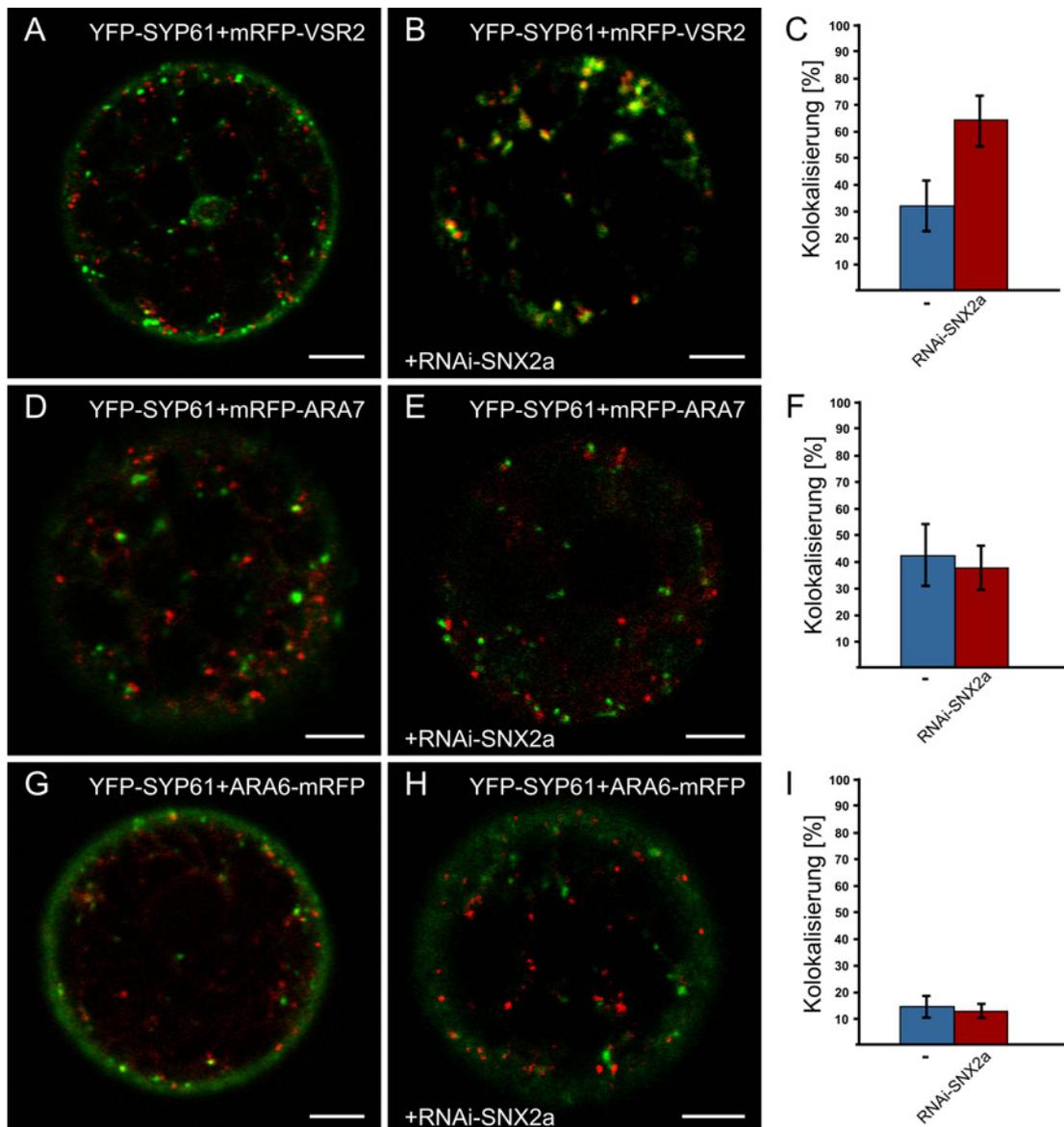
Eine Inhibierung des Transportes von VSR-basierten Markerproteinen (mRFP-VSR2, GFP-BP80) für das MVB/LE und deren damit einhergehende erhöhte Kolokalisierung am TGN/EE, war schon bei Niemes et al. mit einem RNAi-Konstrukt gegen eine Untereinheit des Retromer, *sorting nexin 2a* (RNAi-SNX2a), beobachtet worden. Allerdings war hier der Transport löslicher vakuolärer Fracht unbeeinflusst geblieben (Niemes et al, 2010b). Alle charakterisierten ESCRT-Mutanten hingegen zeigten, sowohl in Proteintransportstudien als auch in Western-Blot Analysen, eine deutliche Inhibierung vakuolären Transportes (siehe Kapitel 2.4). Es deutete sich also an, dass die durch die ESCRT-Mutanten verursachten Effekte allgemeinerer Natur sind und den Transport vom TGN/EE zum MVB/LE generell inhibieren.



**Abb. 2.16: Einfluss von VPS2-DN auf die Verteilung endosomaler Marker.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Es wurde 1-7  $\mu$ g der für die Markerproteine kodierenden Plasmid-DNA eingesetzt. Alle Proben wurden 18-24 h inkubiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Expression von VPS2-DN führt zur Überlagerung von üblicherweise separaten Signalen des TGN-Markers YFP-SYP61 und den MVB-Markern mRFP-VSR2, mRFP-ARA7 und ARA6-mRFP (Vergleiche A, D, G mit B, E, H). Die Veränderung der Kokolalisierungsrate der Markerproteine wurde quantitativ untersucht (C, F und I). Dafür wurden die Signale von n=20 Tabakprotoplasten ausgewertet. Für alle MVB-Marker zeigt sich eine höhere Kokolalisierung mit dem TGN-Marker bei VPS2-DN-Koexpression. Die Größe des Maßstabsbalkens beträgt 5  $\mu$ m. Als Fehler ist die Standardabweichung angegeben.

Um zu bestätigen, dass die Expression von RNAi-SNX2a spezifisch nur den Transport des MVB-Markers mRFP-VSR2 inhibiert (Niemes et al., 2010a), wurde RNAi-SNX2a mit den gleichen Markerkombinationen, wie für VPS2-DN in Abb. 2.16 gezeigt, untersucht. Bei Expression von RNAi-SNX2a mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 und der MVB-Marker mRFP-VSR2 änderte sich die Verteilung der Markerproteine und die Kokolalisierungsrate stieg von etwa 30 % auf über 60 % an (Abb. 2.17, A-C).

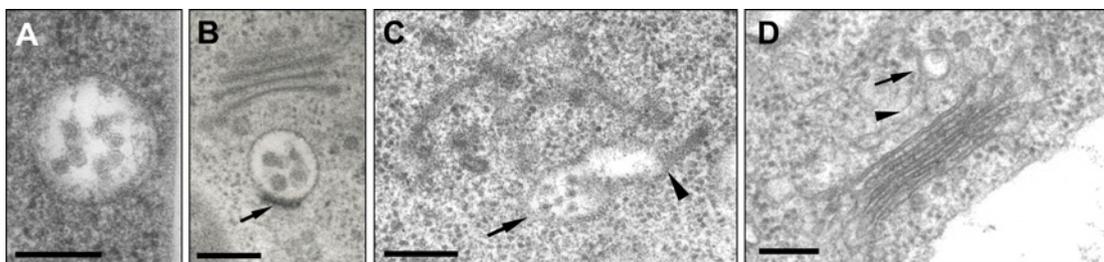
Für diese Markerkombination war der von RNAi-SNX2a verursachte Effekt also vergleichbar mit dem durch Expression von VPS2-DN verursachten Effekt (vergleiche Abb. 2.17, A-C mit Abb. 2.16, A-C).



**Abb. 2.17: Einfluss von RNAi-SNX2a auf die Verteilung endosomaler Marker.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Es wurde 1-7 µg der für die Marker-Proteine kodierenden Plasmid-DNA eingesetzt. Für RNAi-SNX2a wurden 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Alle Proben wurden 18-24 h inkubiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Die Expression von RNAi-SNX2a führte zur Kolokalisierung der üblicherweise separaten Signale von YFP-SYP61 und mRFP-VSR2 (Vergleiche A und B) und die Kolokalisierungsrate verdoppelt sich (C). Die Kolokalisierungsrate von YFP-SYP61 mit den MVB-Markern mRFP-ARA7 und ARA6-mRFP blieben bei Expression des RNAi-Konstruktes unverändert (Vergleiche D, E und G, H). Eine statistische Analyse zeigte keine signifikante Änderung der Kolokalisierung (F und I). Die Größe der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. Es wurden für jedes Experiment n=20 Tabakprotoplasten ausgewertet und als Fehler die Standardabweichung angegeben.

Wurden als MVB-Marker hingegen die cytosolischen Reporter mRFP-ARA7 und ARA6-mRFP exprimiert, führte die Koexpression mit RNAi-SNX2a zu keiner Änderung der Marker-Verteilung und die Kolokalisierungsrate mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 blieb konstant (Abb. 2.17, D-I). Somit bestätigte die Expression von RNAi-SNX2a den spezifischen Effekt auf den Transport des vakuolären Sortierungsrezeptors (VSR) und diente gleichzeitig als Kontrolle für den allgemeineren Effekt von VPS2-DN. Die von der ESCRT-Mutante ausgelöste Inhibierung des Transportes vom TGN/EE zum MVB/LE, zeigte sich nicht alleine durch eine steigende Kolokalisierungsrate, sondern die Signale veränderten sich auch morphologisch. Generell waren die entstehenden Signalstrukturen aus Markerproteinen für das TGN/EE und MVB/LE größer und konnten nicht alleine dem TGN/EE oder dem MVB/LE zugeordnet werden.

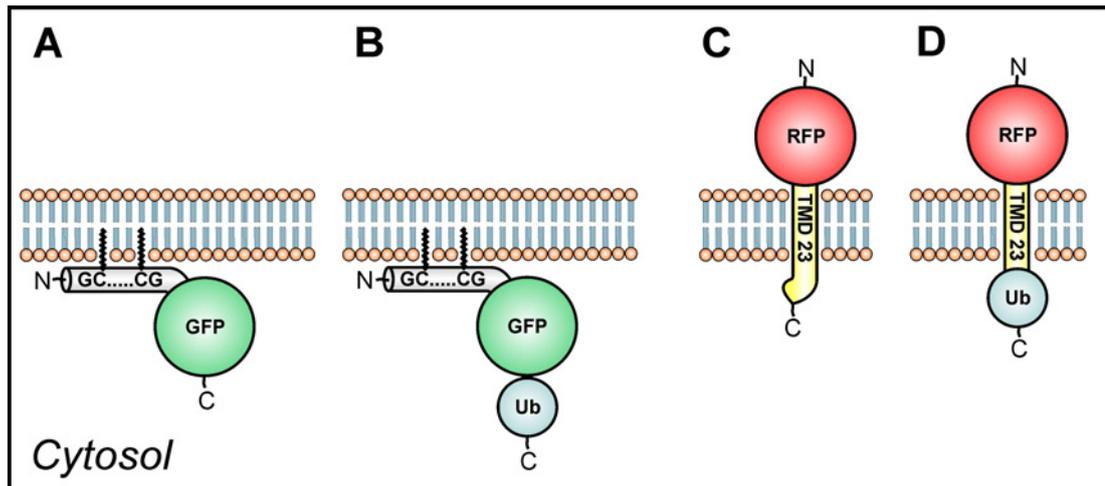
In ultrastrukturellen Analysen von *Arabidopsis*-Wurzelspitzen konnte, neben der Existenz typischer MVBs/LEs (Abb. 2.18, A und B), auch das Vorkommen von TGN-MVB Hybrid-Strukturen beobachtet werden (Abb. 2.18, C und D). Diese endogenen Hybrid-Strukturen stellen wahrscheinlich die Momentaufnahme eines Reifungsprozesses von TGN/EE zum MVB/LE dar. Die höhere Kolokalisierungsrate der morphologisch veränderten Signale von TGN- und MVB-Markern bei Koexpression von VPS2-DN, könnte also durch die Inhibierung dieses Reifungsprozesses erklärt werden. Zusammen mit der differentiellen Lokalisierung von ESCRT-Komponenten (Abb. 2.2, Abb. 2.6 und Abb. 2.10) und der Inhibierung des Transportes zur Vakuole durch die ESCRT-Mutanten (Abb. 2.12, Abb. 2.13 und Abb. 2.14) lässt sich schließen, dass fehlende ESCRT-Funktionalität bereits auf Ebene des TGN/EE zu einer Fehlsortierung und somit einer gestörten MVB-Entwicklung führt.



**Abb. 2.18: MVBs entstehen aus tubulo-vesikulären Strukturen.** Querschnitt eines typischen MVB/LE aus einer Hochdruck-gefrorenen Wurzelspitze (A). Oft sind elektronendichte Beschichtungen (*clathrin-plaque*) an der äußeren Membran zu erkennen (schwarzer Pfeil, B). In chemisch fixierten Zellen sind MVBs/LEs (schwarze Pfeile) zu finden die keine typisch runde Form haben und mit flaschenhalsähnlichen tubulären Strukturen verbunden sind (schwarze Pfeilspitzen, C und D). Größe der Maßstabsbalken = 2  $\mu\text{m}$ . (Aufnahmen bereitgestellt von Dr. Corrado Viotti).

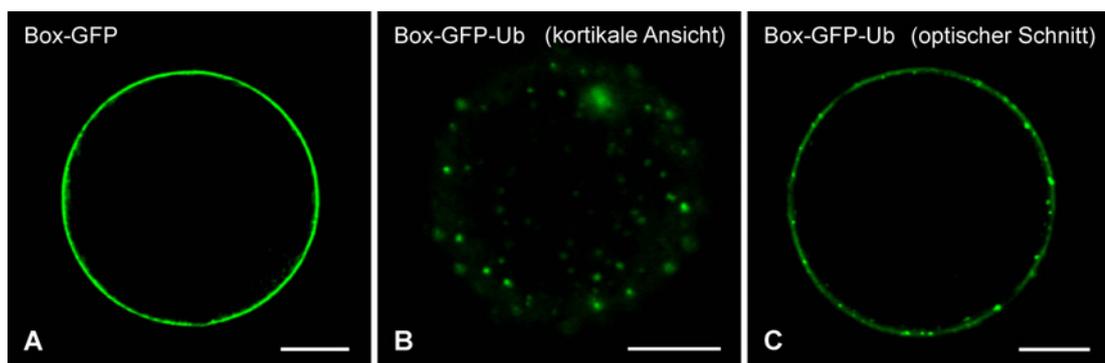
## 2.6 Ein Reportersystem zur ESCRT-Charakterisierung

Durch die funktionelle Charakterisierung der ESCRT-Komponenten und die resultierenden differentiellen Effekte der Mutanten, stehen molekulare Werkzeuge zur Aufklärung der ESCRT-vermittelten Proteinsortierung zur Verfügung. Die Analyse dieser Sortierungsprozesse erfordert jedoch einen Reporter, der als Fracht von der ESCRT-Maschinerie erkannt und sortiert wird. Die Komplexität des TGN/EE als Schnittstelle zwischen Sekretion, Endocytose und vakuolärem Transport erschwert funktionelle Untersuchungen insofern, als dass selbst *in vivo* Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop keine Transportrichtungen auflösen können. Proteine, wie zum Beispiel der Rezeptor BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive 1*), können das multifunktionelle TGN/EE entweder auf dem sekretorischen Weg zur PM durchlaufen, oder bereits wieder endocytotiert worden sein (Viotti et al., 2010). Um zwischen sekretorischem und endocytischen Transport unterscheiden zu können, sollte ein ESCRT-abhängiges, nicht-sekretorisches Reportersystem etabliert werden. Daher sollte ein GFP-basiertes Reportermolekül entwickelt werden, welches, wie ein zu degradierendes Membranprotein, den endocytischen Weg von der PM über die intraluminalen Vesikel (ILV) des MVB/LE zur lytischen Vakuole nimmt. Die Identifizierung eines Signals für die selektive posttranslationale PM-Insertion war hierbei entscheidend. Die Fusion der 26 C-terminalen Aminosäuren der *Arabidopsis* Typ-II ROP-GTPase AtROP10 ist ausreichend für die Rekrutierung von cytosolischem GFP an die Plasmamembran (Lavy und Yalovsky, 2006). Die Aminosäuresequenz der GTPase enthält ein hochkonserviertes Motiv, welches aus zwei Glycin/Cystein-Paaren besteht. Diese so genannte [GC-CG]-Box (kurz Box) wird über eine S-Acylierung der beiden Cysteine posttranslational an die Plasmamembran rekrutiert und kann dann der Identifizierung putativer Internalisierungssignale dienen. So können beispielsweise fluoreszierende Moleküle via Box-Sequenz an die PM rekrutiert und beliebige Signalsequenzen auf ihre Internalisierungskompetenz untersucht werden. Für das Reportersystem wurde deshalb die Box-Sequenz an den N-Terminus von cytosolischem GFP fusioniert (Box-GFP, Abb. 2.19, A; siehe 4.5) und zur Überprüfung der PM-Rekrutierung transient in Tabakprotoplasten exprimiert. Das Reporterkonstrukt wurde effizient an die PM rekrutiert und kaum cytosolischer Hintergrund war zu detektieren (Abb. 2.20, A). Um Ubiquitin (Ub) als Endocytose- und ESCRT-Signal zu untersuchen, wurde Ub an den C-Terminus von Box-GFP fusioniert (Abb. 2.19, B; siehe 4.5). Im Gegensatz zu Säugern und Hefe ist Ubiquitin in Pflanzen bislang nicht als Signal für den Eintritt in den MVB-Sortierungsweg beschrieben worden.



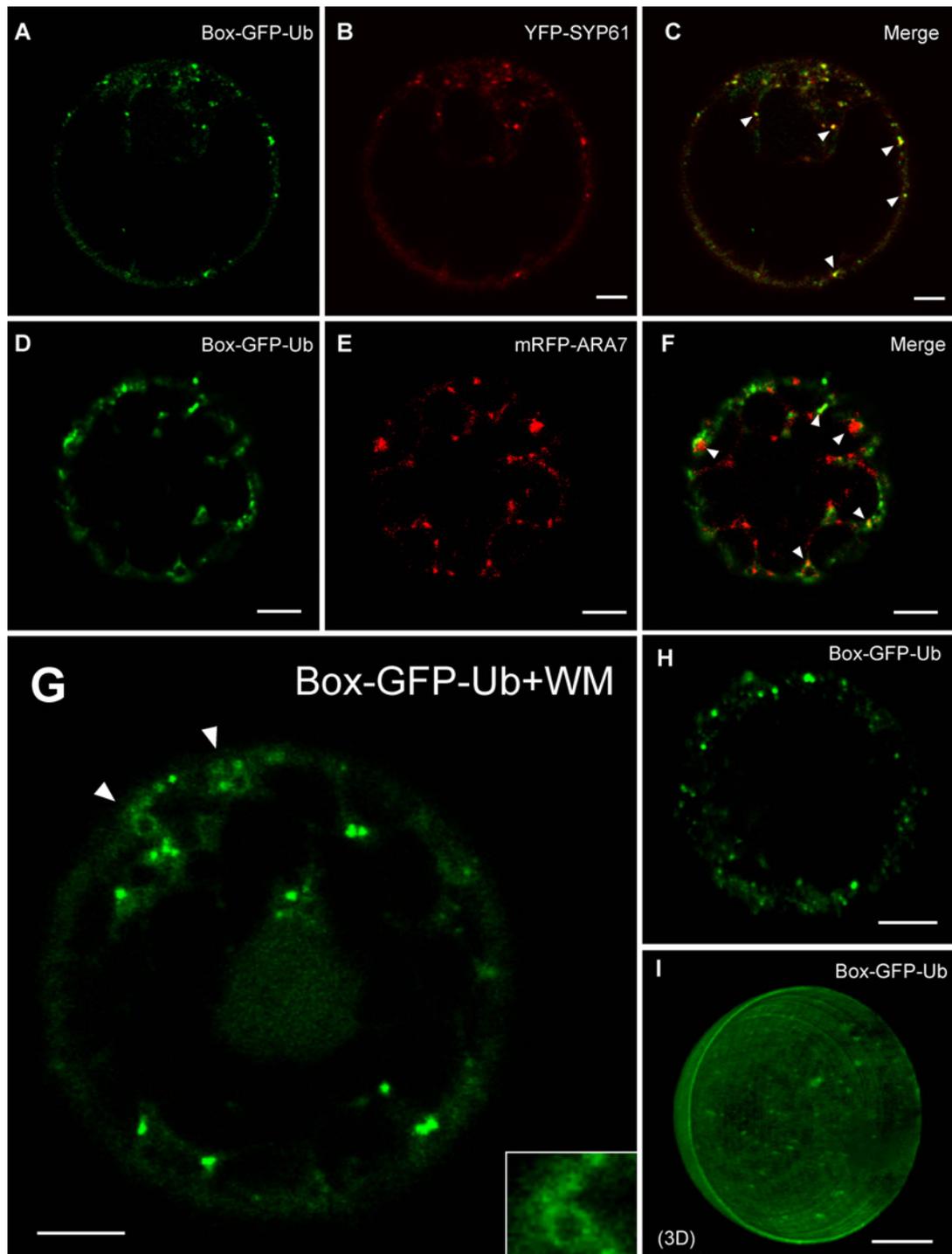
**Abb. 2.19: Schematische Übersicht der Reporterstrukturen.** Das Konstrukt Box-GFP (A) basiert auf cytosolischem GFP, welches N-Terminus an die minimale Sequenz (Box) für eine posttranslationale Rekrutierung an die PM fusioniert wurde. Membranbindung erfolgt hierbei über eine S-Acylierung der zwei konservierten Cystein-Seitenketten der Box. Der Reporter Box-GFP-Ub (B) basiert auf der Fusion von Ubiquitin (Ub) an den C-Terminus des beschriebenen Konstrukts (A). Der PM-Marker RFP-TMD23 (C) setzt sich aus einem Signalpeptid für den Eintritt in das Endomembransystem (nicht gezeigt), monomerem RFP und einer Transmembrandomäne aus 23 Aminosäuren (TMD23) zusammen, welche die Lokalisierung des Konstrukts an der PM vermittelt. Der Reporter RFP-TMD23-Ub (D) basiert auf dem beschriebenen PM-Marker und ist C-Terminus mit Ub fusioniert

Die transiente Expression, des mit Ubiquitin fusionierten Reporters (Box-GFP-Ub), zeigte eine Signalverteilung in klar abgegrenzten, punktförmigen Signalen (Abb. 2.20, B). Obwohl im optischen Schnitt weiterhin schwach die PM markiert war, sind auch hier klar abgegrenzte, punktförmige Signale zu detektieren (Abb. 2.20, C). Zusammen kann dies als erstes Indiz für eine erfolgreiche Endocytose des Reporters gewertet werden.



**Abb. 2.20: Signalverteilung des Reporters Box-GFP-Ub.** Für die transiente Expression in Tabakprotoplasten wurden je 1 µg der für Box-GFP und Box-GFP-Ub kodierenden Plasmid-DNA eingesetzt und die Proben nach 18-48 h am CLSM analysiert. Während Box-GFP an der PM lokalisiert ist (A), tritt Box-GFP-Ub in punktförmigen Signalen auf (B und C). Kortikale Aufnahme (B) und optischer Querschnitt von Box-GFP-Ub (C). Maßstabsbalken = 5 µm.

Koexpression von Box-GFP-Ub mit den endosomalen Markern YFP-SYP61 als TGN-Marker und mRFP-ARA7 als MVB-Marker zeigten, dass der Reporter sowohl am TGN/EE (Abb. 2.21, A-C) als auch am MVB/LE lokalisiert ist (Abb. 2.21, D-F).

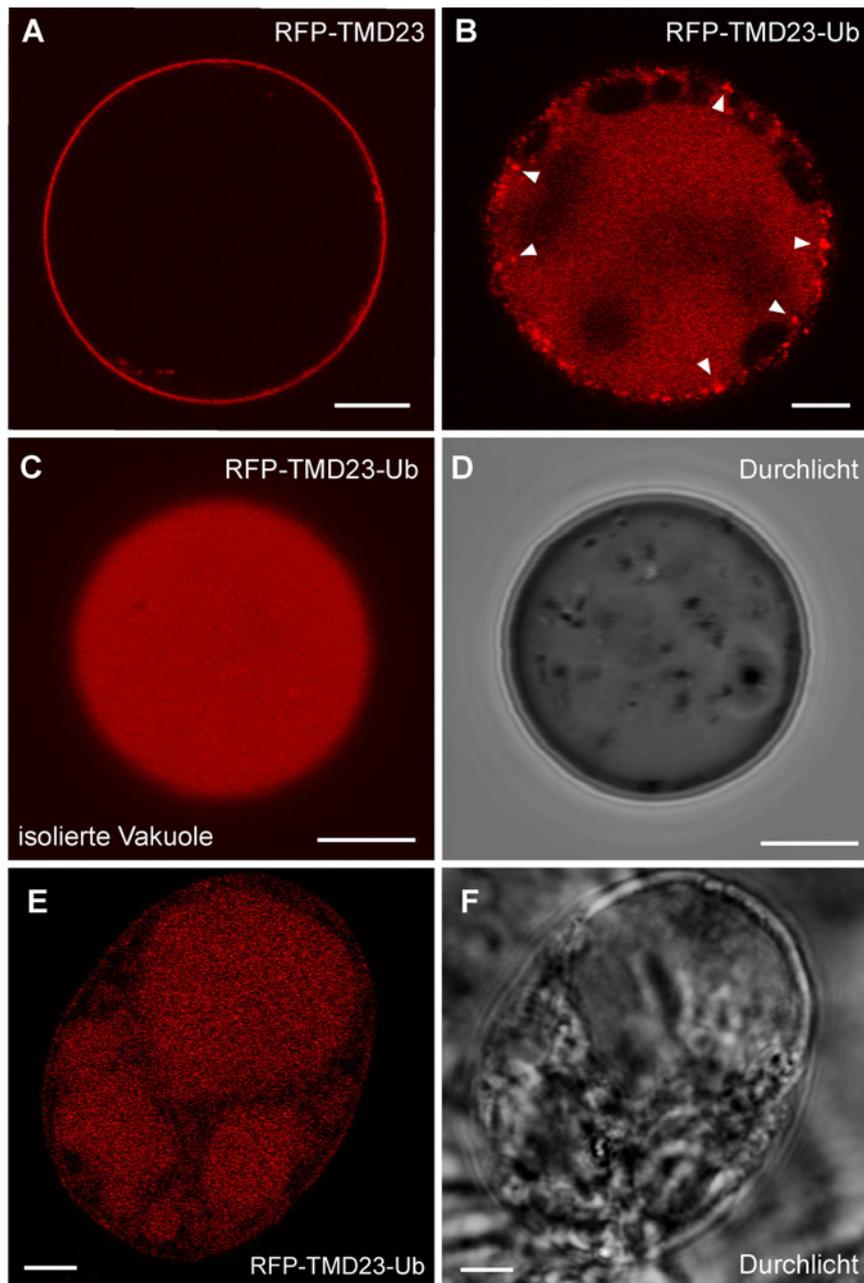


**Abb. 2.21: Charakterisierung von Box-GFP-Ub.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Alle Proben wurden 18-48 h inkubiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Koexpression von Box-GFP-Ub mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 zeigt eine deutliche Kolokalisierung in punktförmigen Signalen (A-C). Auch bei Koexpression mit mRFP-ARA7 als MVB-Marker zeigten sich überlappende Signale (D-F). Behandlung mit 30  $\mu$ M Wortmannin führte zur, für MVBs/LEs typischen, Bildung ringförmiger Strukturen (G), die ohne WM nicht detektierbar sind (H). Eine 3D-Projektion von Serienaufnahmen eines Protoplasten von der PM bis zum Mittelpunkt zeigte punktförmige Signale an der PM und im Cytosol (I). Kolokalisierung und WM-induzierte Ringe sind durch weiße Pfeilköpfe gekennzeichnet. Maßstabsbalken = 5  $\mu$ m.

Um die Lokalisierung am MVB/LE zu bestätigen, wurde Box-GFP-Ub mit 30  $\mu\text{M}$  der Droge Wortmannin (WM) für eine Stunde inkubiert (Abb. 2.21, I). Diese WM-Behandlung führte zu einer, nur für MVBs/LEs typischen Bildung ringförmiger Strukturen, die eine Lokalisierung von Box-GFP-Ub an diesem Kompartiment bestätigten. Diese Lokalisierung, die WM-Sensitivität der Signale sowie die Kolo-kalisierung mit endosomalen Markern belegten endgültig, dass die Reporter-moleküle endocytisiert und bis zum MVB/LE transportiert werden. Der letzte Transportschritt für die Degradierung von Membranproteinen vom MVB/LE zur lytischen Vakuole konnte allerdings nicht beobachtet werden. Der Reporter Box-GFP-Ub erreichte das vakuoläre Lumen auch nach 48 h Expressionszeit nicht und erwies sich somit als ungeeignet, diesen letzten Transportschritt auf ESCRT-Abhängigkeit zu untersuchen. Einer der Gründe für den ausbleibenden Transport zur Vakuole könnte die mangelnde Stabilität der S-Acylierung sein. Eine putativ reversible Membranbindung könnte dazu führen, dass die Sortierung in die ILV des MVB/LE ausbleibt, der Reporter zurück in das Cytosol entlassen wird und dadurch der Transport abbricht. Eine weitere Ursache könnte die kovalente Ubiquitin-Bindung des Reporters darstellen. In Hefe wurde gezeigt, dass die Deubiquitinierung von Frachtmolekülen essentiell für den vakuolären Transport ist (Amerik et al., 2000).

## 2.7 Ein Reportersystems für den Transport zur Vakuole

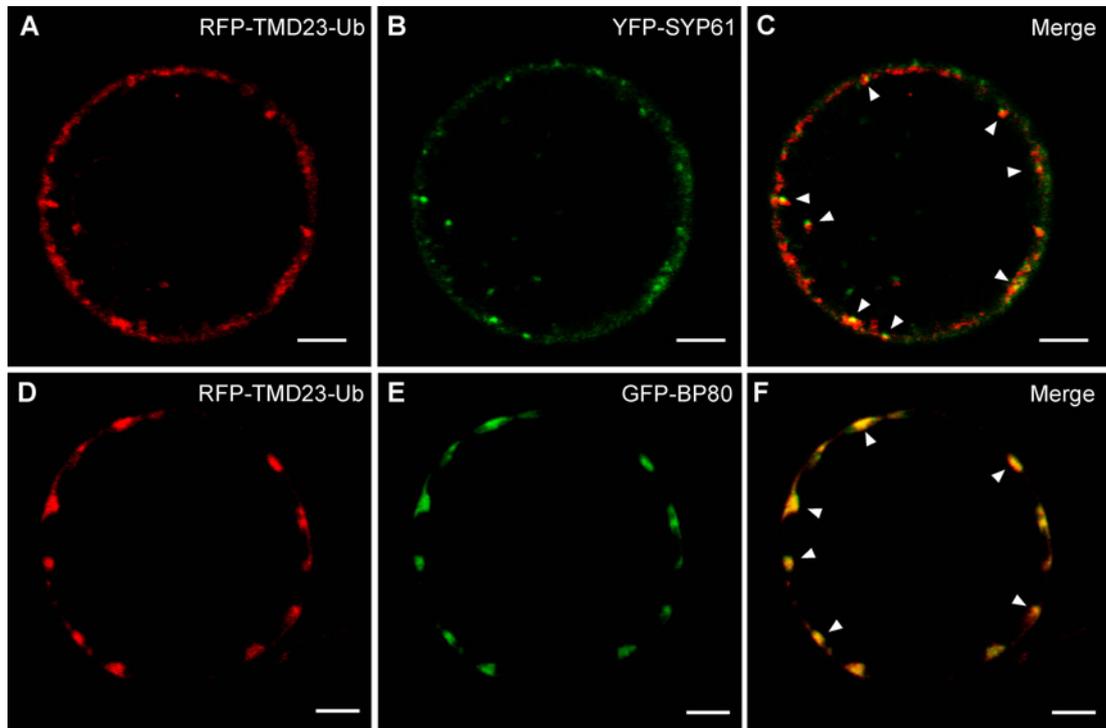
Um die Rolle der ESCRT-Maschinerie im letzten Schritt des MVB-Sortierungswegs untersuchen zu können, wurde die Etablierung eines Reportersystems angestrebt, welches final das Lumen der Vakuole erreicht. Damit die Reversibilität der Membranbindung als Ursache für einen Transportstopp ausgeschlossen werden konnte, sollte als Grundlage des modifizierten Reportersystems ein stabil in der Membran inseriertes Protein dienen. Dies sollte zudem eine Differenzierung zwischen den oben genannten Möglichkeiten des Transportstopps von Box-GFP-Ub möglich machen. Ausbleibender Transport in das vakuoläre Lumen wäre bei stabiler Insertion in die Membran, nur durch fehlende Deubiquitinierung zu erklären. Als Ausgangsmolekül für das zweite Reportersystem, wurde deshalb der fluoreszente Plasmamembran-Marker RFP-TMD23 (Brandizzi et al., 2002b) für eine Fusion mit Ubiquitin genutzt. Dieses Typ-I Membranprotein ist stabil in die Membran inseriert und fast ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 2.22, A). Der Grund hierfür ist die Länge der hydrophoben Transmembrandomäne (TMD) von genau 23 Aminosäuren (Brandizzi et al., 2002b).



**Abb. 2.22: Der Reporter RFP-TMD23-Ub.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Alle Proben wurden 18-48 h inkubiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop analysiert. RFP-TMD23, als Kontrolle, wurde an der PM lokalisiert (A). Fusion mit Ubiquitin führte zum Transport des Reporters in die Vakuole (B). Isolierte Vakuolen zeigten starke Fluoreszenz (C und D). BY2-Zellen zeigten mehrere markierte Vakuolen unterschiedlicher Größe (E und F). Maßstabsbalken = 5  $\mu\text{m}$ .

Tatsächlich zeigte die Fusion von Ubiquitin an den C-Terminus von RFP-TMD23 (RFP-TMD23-Ub, siehe 4.5) nach anschließender transientser Expression in Tabakprotoplasten fluoreszente Signale, die der Vakuole zugeordnet werden können (Abb. 2.22, B-D). Expression in Protoplasten von BY2-Zellen zeigten RFP-TMD23-Ub-Signale in mehreren, deutlich getrennten Vakuolen (Abb. 2.22, E und F). Diese Beobachtungen suggerieren, dass als Voraussetzung für den Transport zur Vakuole die Art der Membranbindung entscheidend ist. Die fehlende

Deubiquitinierung des Reporters Box-GFP-Ub spielt demnach nur eine untergeordnete Rolle für das Erreichen der Vakuole.

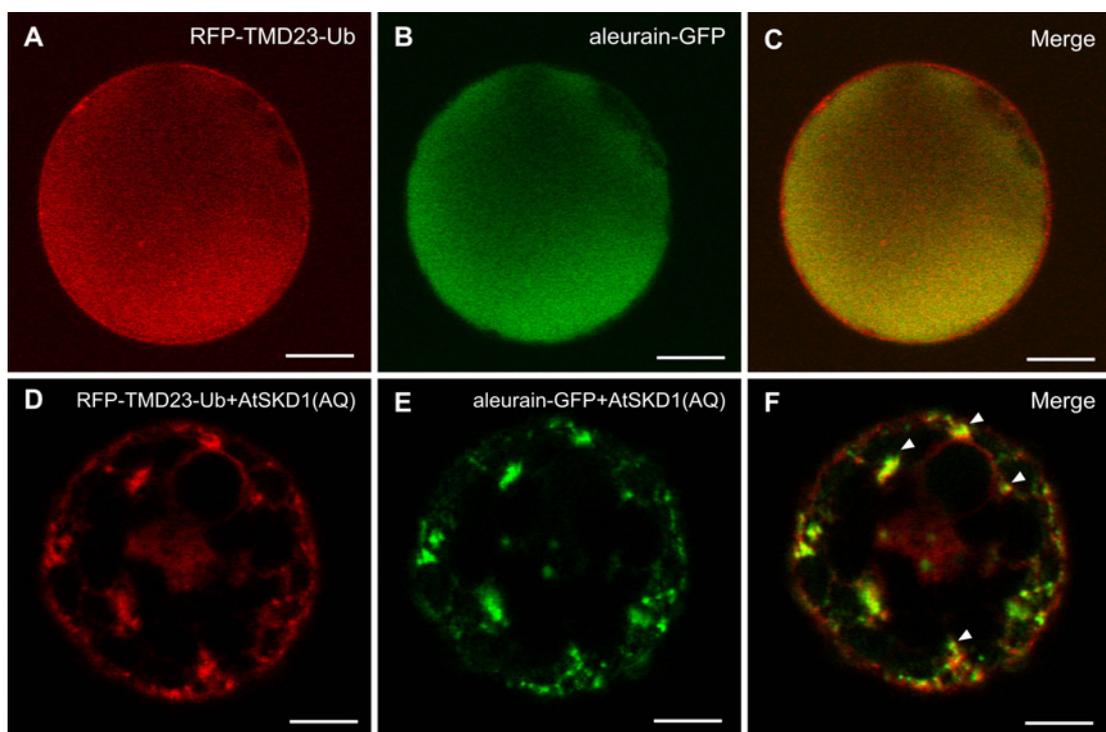


**Abb. 2.23: Charakterisierung des Reporters RFP-TMD23-Ub.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Damit die punktförmigen Signale des Reporters RFP-TMD23-Ub trotz der starken Hintergrund-Fluoreszenz der markierten Vakuolen untersucht werden konnten, wurden die Proben relativ kurz (16-20 h) inkubiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Koexpression von RFP-TMD23-Ub mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 zeigt eine deutliche Kolokalisierung in punktförmigen Signalen (A-C). Koexpression von RFP-TMD23-Ub mit GFP-BP80 als MVB-Marker zeigt ebenfalls eine hohe Kolokalisierungsrate (D-F). Damit wurde gezeigt, dass die Reporter-moleküle über endosomale Kompartimente transportiert werden, bevor sie die Vakuole erreichen. Maßstabsbalken = 5  $\mu$ m. Kolokalisierung ist durch weiße Pfeilköpfe angezeigt.

Da die RFP-TMD23-Ub-Signale nicht auf das Lumen der Vakuole beschränkt waren, sondern auch als punktförmige Signale auftraten (Abb. 2.22, B, weiße Pfeilköpfe), wurden Koexpressionsstudien mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 und dem MVB-Marker GFP-BP80 durchgeführt. Eine relativ kurze Expressionszeit wurde gewählt (ca. 16-20 h), damit der Transport zur Vakuole noch nicht gesättigt und die Hintergrundsignale niedrig waren. Eine hohe Zahl von Signalen für das TGN/EE (Abb. 2.23, A-C, weiße Pfeilköpfe) und für das MVB/LE (Abb. 2.23, D-F, weiße Pfeilköpfe), beides Transit-Kompartimente auf dem Weg zur Vakuole, kolokalisierten mit RFP-TMD23-Ub und bestätigten, dass der Reporter den endocytischen Weg durchläuft. Koexpression mit einem löslichen Frachtmolekül für die Vakuole, aleurain-GFP, zeigte einen hohen Grad an Kolokalisierung (Abb. 2.24, A bis C) und suggerierte, dass der membrangebundene Reporter RFP-TMD23 und das lösliche Protein über den gleichen Transportweg zur Vakuole gelangen könnten.

## 2.8 ESCRT-Abhängigkeit des Reportersystems

Um zu untersuchen, ob der durch Ubiquitin initiierte Transport des Reporters RFP-TMD23-Ub zur Vakuole ESCRT-abhängig ist, wurde die in Kapitel 2.4 charakterisierte SKD1-Mutante (AtSKD1(AQ)) mit RFP-TMD23-Ub und aleurain-GFP koexprimiert. Beide Markerproteine erreichten das Lumen der Vakuole nicht, sondern zeigten tubuläre und punktförmige Signale, wobei letztere kolokalisiert waren (siehe Abb. 2.24, D bis E; weiße Pfeilköpfe). Der Transportweg zur Vakuole ist demnach sowohl für lösliche Proteine als auch für membrangebundene Proteine ESCRT-abhängig.

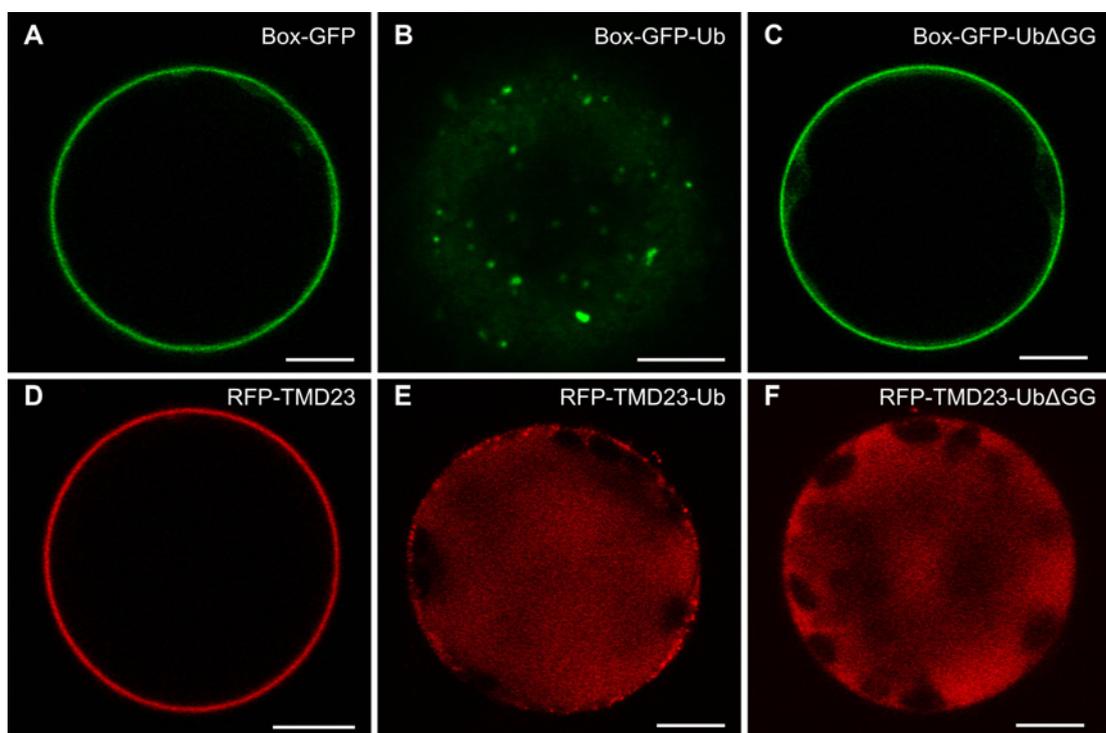


**Abb. 2.24: ESCRT-Abhängigkeit des vakuolären Transportes.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Um ein starkes vakuoläres Signal detektieren zu können, wurden die Proben 24-48 h vor der CLSM-Analyse inkubiert. Sowohl der Reporter RFP-TMD23-Ub als auch das lösliche vakuoläre Frachtmolekül aleurain-GFP erreichten das Lumen der Vakuole und kolokalisierten (A-C). Koexpression mit AtSKD1(AQ) führte zu einer Inhibierung des vakuolären Transportes (D-F). Trotzdem kolokalisierten beide Proteine weiterhin teilweise; dies deutet auf einen identischen Transportweg hin. Maßstabsbalken = 5  $\mu$ m. Weiße Pfeilköpfe zeigen Kolokalisierung an.

## 2.9 Der Ubiquitinierungs-Status bei Protein-Internalisierung

Als eine wichtige Voraussetzung für die Internalisierung von Membranproteinen wird in Hefe und Säugern der Status der Ubiquitinierung diskutiert. Es wurde gezeigt, dass eine Monoubiquitinierung als Internalisierungssignal fungiert, während eine Polyubiquitinierung zur Erkennung und anschließenden Degradierung löslicher

Proteine durch das Proteasom dient (Pickart und Cohen 2004; Dupre et al., 2004). In Hefe und Säugern zeigte eine Polyubiquitinierung mit kurzen Ubiquitin-Ketten (verknüpft über das Lysin an Position 63) eine besonders effiziente Internalisierung von Proteinen der Plasmamembran (Madshus, 2006, Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997; Geetha et al., 2005). Durch Deletion der zwei C-terminal endständigen Glycine des Ubiquitins konnte bewiesen werden, dass neben Polyubiquitinierung an den Lysinen an Position 48 und 63 auch am C-Terminus eine Ubiquitinierung stattfinden kann (Chen und De Camilli, 2005). Da hierzu in Pflanzen keine Daten vorliegen, wurde die Bedeutung des Ubiquitinierungs-Status mit Hilfe der beiden etablierten Reportersysteme analysiert.



**Abb. 2.25: Die Bedeutung der C-terminal endständigen Glycine von Ubiquitin für den Transport.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Alle Proben wurden 18-48 h inkubiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop analysiert. Box-GFP ist an der PM lokalisiert (A); Fusion mit Ubiquitin führt zur Internalisierung (B). Deletion der beiden C-terminalen Glycine von Ubiquitin verhindert die Internalisierung (C). Im Falle des TMD-Reporters (RFP-TMD23) führt eine Ubiquitin-Fusion zur Relokalisierung von der PM (D) in die Vakuole (E). Die Deletion der endständigen Glycine des Ubiquitins hat keinen Effekt auf den vakuolären Transport (F). Maßstabsbalken = 5  $\mu$ m.

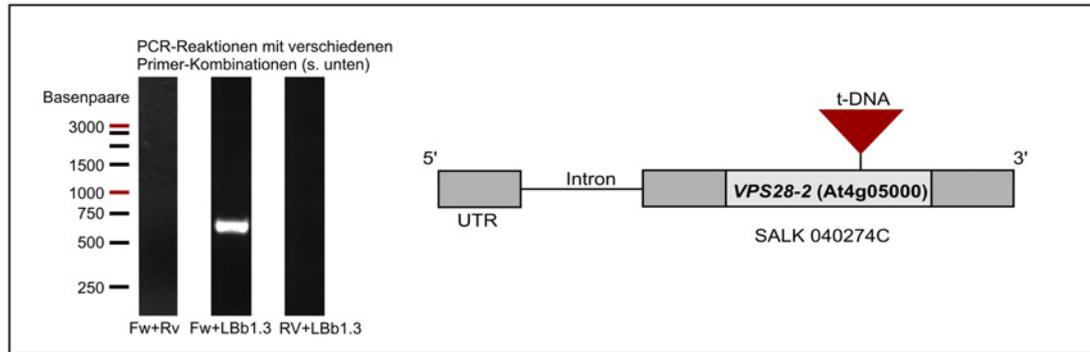
Dazu wurden die endständigen Glycine des Box-GFP-Ub Konstruktes und des RFP-TMD23-Ub-Konstruktes deletiert (Box-GFP-Ub $\Delta$ GG und RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG, siehe 4.5). Transiente Expression von Box-GFP-Ub $\Delta$ GG in Tabakprotoplasten führte zu einem klaren Signal an der Plasmamembran (Abb. 2.25, C). Keine punktförmigen Signale waren sichtbar und das modifizierte Reporterkonstrukt verhielt sich wie das Kontrollkonstrukt ohne Signal (Box-GFP, vergleiche Abb. 2.25, C mit A und B). Interessanterweise zeigte die Expression von RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG

keinen anderen Phänotyp als das zuvor analysierte RFP-TMD23-Ub (vergleiche Abb. 2.25, E und F). Beide Proteine wurden in das Lumen der Vakuole transportiert und zeigten kaum Signale an der Plasmamembran (Abb. 2.25, D-F). Da für die Internalisierung von Box-GFP-Ub die C-terminalen Glycine essentiell sind, stellt sich die Frage, ob die beiden TMD-Reporter (RFP-TMD23-Ub und RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG) vor Ankunft in der Vakuole tatsächlich noch zur Plasmamembran transportiert werden, oder schon vorher eine Sortierung in Richtung der Vakuole erfahren. Der Befund, dass eine Mutation des Ubiquitins von RFP-TMD23-Ub keinen Transportstopp bewirkt, spricht für einen vorherigen Abzweig im Endomembransystem. Ein weiteres Indiz für dieses Szenario, ist die Lokalisierung der ESCRT-I Komponente VPS28 am Golgi und am TGN/EE (siehe Abb. 2.2 und Abb. 2.3). Die Initiierung der ESCRT-vermittelten Degradierung von Membranproteinen schon auf Ebene des Golgi-Apparates bzw. des TGN/EE ist somit vorstellbar.

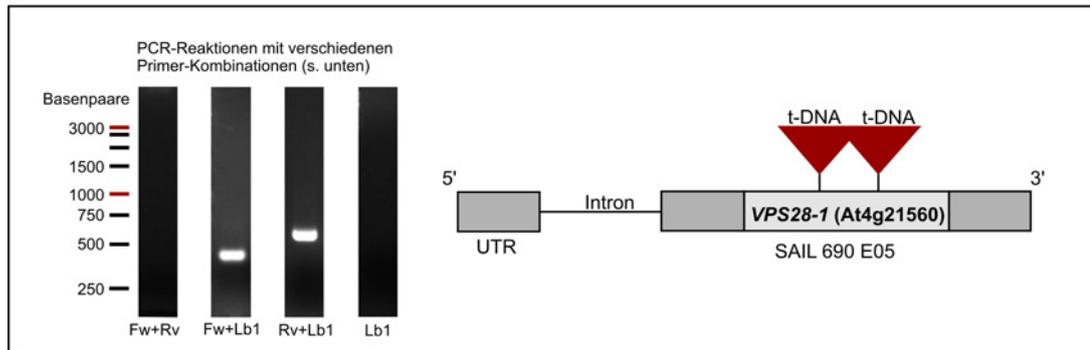
## 2.10 Untersuchungen von VPS28 in *Arabidopsis* Pflanzen

Um zu untersuchen, inwiefern die Funktionalität der ESCRT-Maschinerie an Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt ist, wurden *Arabidopsis* t-DNA-Insertionsmutanten von VPS28 charakterisiert und durch Kreuzung verschiedener Linien ein Ausschalten (*knock-out*) beider VPS28-Isoformen angestrebt. Für die Isoform *VPS28-2* (at4g05000) wurde die homozygote t-DNA-Insertionslinie SALK 040274C, für *VPS28-1* (At4g21560) die SAIL-Linie 690 E05 (*Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, USA*) verwendet. Nach erfolgter Anzucht (siehe 4.3.2), wurden zuerst die Positionen und die Anzahl der t-DNA-Insertionen analysiert. Nach Extraktion genomischer DNA aus Blattmaterial (siehe 4.6.1), konnten die t-DNA-Insertionslinien genotypisiert werden. Mit genspezifischen Oligonukleotidprimern (siehe 4.4.2) wurde dazu mittels PCR-Reaktionen (siehe 4.6.1) ausgeschlossen, dass es sich um wildtypische Pflanzen handelt (Abb. 2.26, A und B, Fw + Rv). Durch PCR-Reaktionen, mit den für die t-DNA-Insertion spezifischen Oligonukleotidprimern (LBb1.3 für die SALK-Linie und Lb1 für die SAIL-Linie) und den genspezifischen *Forward*-Oligonukleotidprimern, konnte eine t-DNA-Insertion nachgewiesen werden (Abb. 2.26, A – Fw + LBb1.3 und B – Fw + Lb1).

A

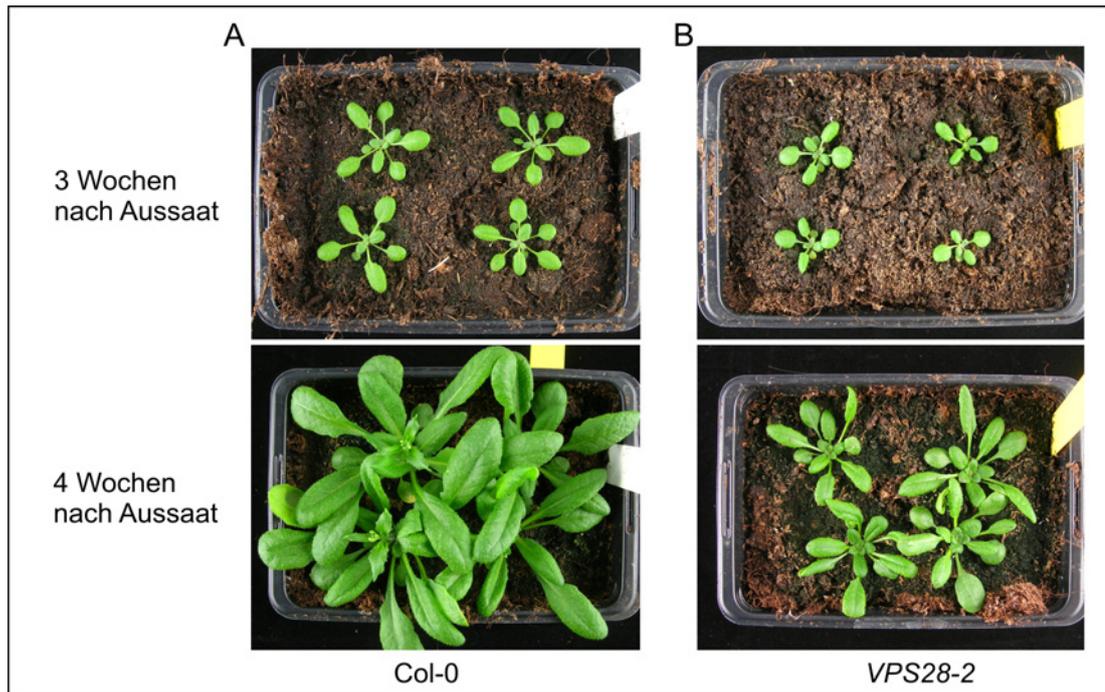


B



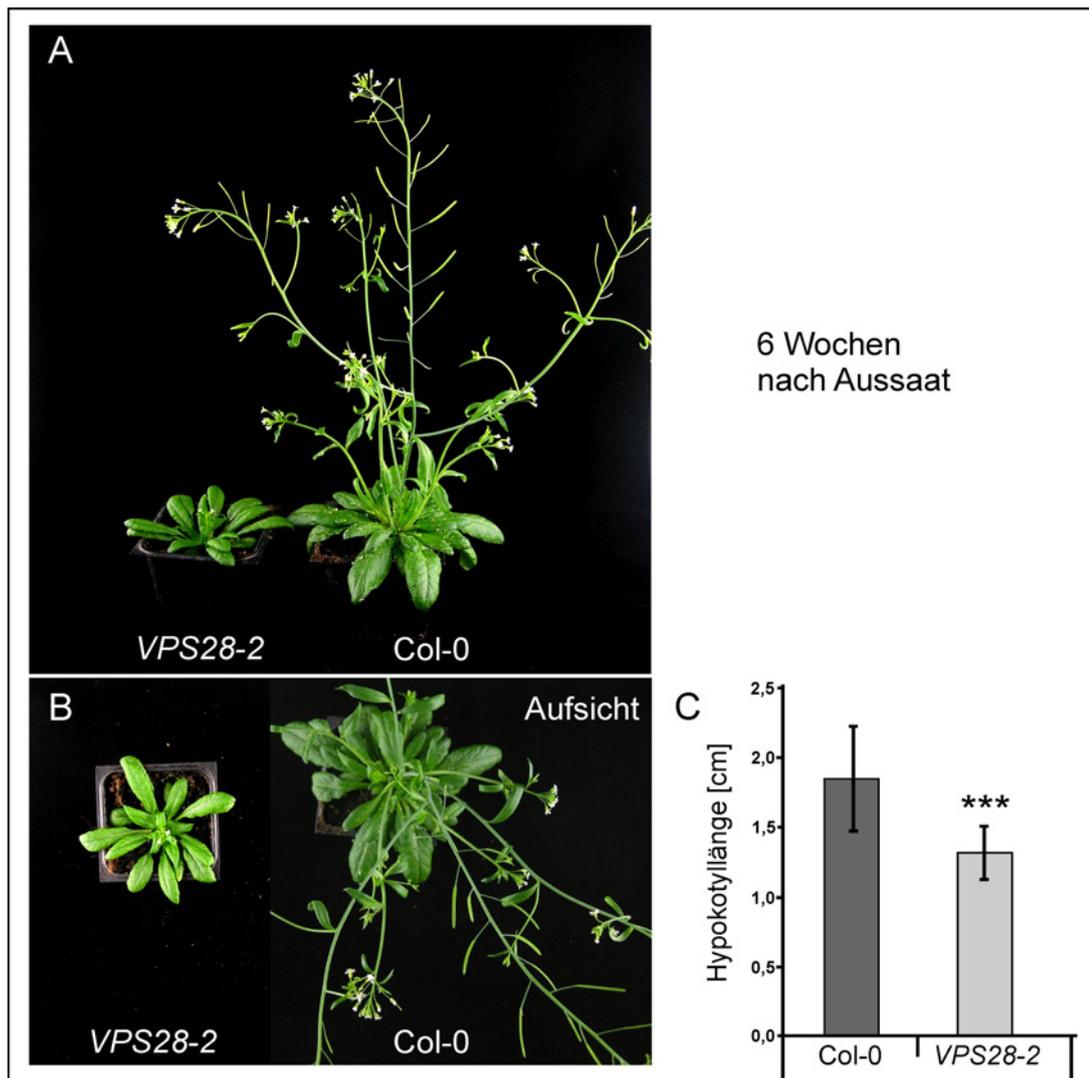
**Abb. 2.26: Genotypisierung von t-DNA-Insertionsmutanten.** Die Analyse zeigt, dass die t-DNA einmal in der SALK-Linie (A) und zweimal hintereinander in der SAIL-Linie inseriert ist (B). Alle PCR-Reaktionen wurden mit DNA aus Blattmaterial der *Arabidopsis* t-DNA Insertionslinien als *Template* durchgeführt. Fw = genspezifischer *Forward*-Oligonukleotidprimer, Rv = genspezifischer *Revers*-Oligonukleotidprimer, LBb1.3 = t-DNA spezifischer Oligonucleotidprimer für SALK-Linien, Lb1 = t-DNA spezifischer Oligonucleotidprimer für SAIL-Linien.

Durch PCR-Reaktionen mit den *Revers*-Oligonukleotidprimern und den t-DNA spezifischen Oligonukleotidprimern (siehe 4.4.2) konnte gezeigt werden, dass die SALK-Linie 040274C eine und die SAIL-Linie 690 E05 mindestens zwei t-DNA-Insertionen besitzt (Abb. 2.26, A – Rv + LBb1.3 und B – Rv + Lb1). Eine abschließende PCR-Reaktion für die SAIL-Linie mit dem Lb1-Oligonukleotidprimer zeigte eine zweifache, gespiegelte Insertion der t-DNA (Abb. 2.26, B, Lb1).



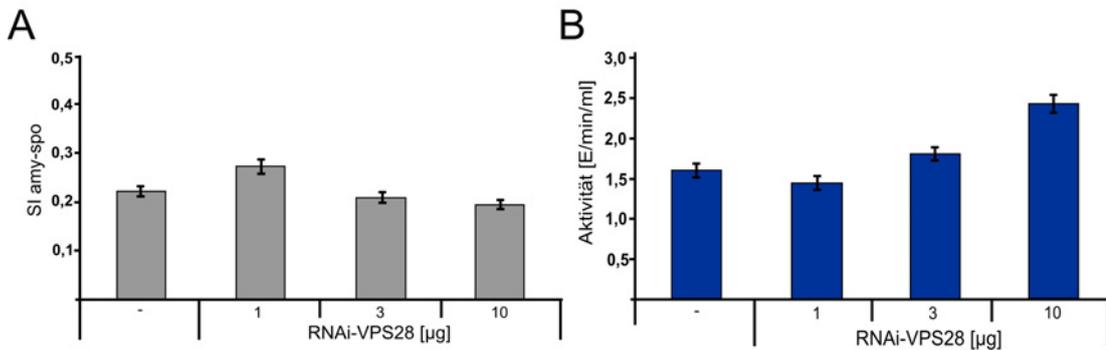
**Abb. 2.27: Phänotypischer Vergleich von wt *Arabidopsis* Pflanzen und der SALK-Linie *VPS28-2*.** 3-4 Wochen nach der Aussaat ist ein verzögertes Wachstum der *VPS28-2* Linie im Vergleich zu *Arabidopsis* Col-0 zu erkennen (vergleiche A und B).

Schon bei der Anzucht (siehe 4.3.2) der *VPS28-2* SALK-Linie zeigte sich ein verzögertes Wachstum im Vergleich mit wildtypischen *Arabidopsis* Pflanzen (Ökotyp Col-0). Drei Wochen nach der Aussaat war ein erster phänotypischer Unterschied zu erkennen, der sich innerhalb einer Woche deutlich verstärkte (Abb. 2.27, A und B). Nach sechs Wochen hatten wildtypische Pflanzen Blüten und Schoten ausgebildet, während die *VPS28-2* Pflanzen eine deutlich geringere Wuchshöhe, erst wenige Blüten und keine Schoten erkennen ließen (Abb. 2.28, A und B). Auch bei der Hypokotyl-Entwicklung zeigten sich Unterschiede: Sechs Tage nach Aussaat war die Hypokotyllänge (siehe 4.4.1) der Kontrollpflanzen mit etwa 1,8 cm signifikant größer als die nur etwa 1,3 cm langen Hypokotyle der *VPS28-2* Pflanzen (Abb. 2.28, C). Ein zweiseitiger T-Test vom Typ2 (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>) mit jeweils n=50 Werten zeigte einen P-Wert < 0,0001 und bewies, dass die Differenz der Werte als extrem signifikant anzusehen ist ( $p < 0,001 = ***$ ). Diese deutliche Wachstumsverzögerung in den frühen Entwicklungsstadien der Pflanzen war jedoch temporär begrenzt. Bis zur Samenreife nivellierte sich der Unterschied beinahe vollständig.



**Abb. 2.28: Phänotypischer Vergleich von wt *Arabidopsis* Pflanzen und *VPS28-2*.** Nach 6 Wochen konnte eine deutliche Wachstumsverzögerung zwischen der t-DNA-Insertionslinie *VPS28-2* und dem Wildtyp (Col-0) festgestellt werden (A und B). Auch das Hypokotyllängenwachstum nach 6 Tagen unterschied sich deutlich: Col-0 Pflanzen zeigten eine Hypokotyllänge von gut 18 mm, die t-DNA-Insertionslinie von etwa 13 mm (C). Ein zweiseitiger T-Test (Typ2) verdeutlichte die Signifikanz der Differenz ( $p < 0,001 = ***$ ).

Parallel zu der zeitintensiven Analyse der t-DNA-Insertionslinien, wurde die Arbeit mit einem RNA-Interferenz (RNAi)-Konstrukt gegen beide VPS28-Isoformen begonnen. Nach erfolgter Klonierung (RNAi-VPS28, siehe 4.5) wurden Transportanalysen mit dem Reportermolekül für den vakuolären Transport, amy-spo, durchgeführt.



**Abb. 2.29: Quantitative Proteintransportstudie mit RNAi-Interferenz von VPS28.** Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten. Als Kontrolle wurden 15 µg der für amy-spo kodierenden Plasmid-DNA eingesetzt. Bei gleichbleibender Menge des Reporters wurden 1 µg, 3 µg und 10 µg der für RNAi-VPS28 kodierenden Plasmid-DNA eingesetzt. Medium und Zellen wurden nach 18-24 h Inkubation getrennt, enzymatisch analysiert und der Sekretionsindex (SI) berechnet. Während der SI für den vakuolären Reporter amy-spo unverändert blieb (A), konnte eine Steigerung der Aktivität (Summe der Aktivität im Medium und in den Zellen) und damit eine Akkumulierung des Reporters in den Zellen beobachtet werden (B). Als Fehler ist die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

Während sich der Sekretionsindex bei steigender eingesetzter Plasmid-Konzentration von RNAi-VPS28 kaum veränderte (Abb. 2.29, A), erhöhte sich die Gesamtaktivität (Summe aus Aktivität im Medium und Aktivität in den Zellen) um über fünfzig Prozent (Abb. 2.29, B) im Vergleich zur Kontrolle. Diese Erhöhung kann nur dann erklärt werden, wenn die Aktivität zu gleichen Teilen im Medium und den Zellen ansteigt. Eine reduzierte Degradierung des vakuolären Reporters könnte diesen Befund erklären und würde auf eine Störung des Transportweges zur Vakuole schon auf der Ebene des TGN/EE oder sogar des Golgi-Apparates hinweisen.

## 3 Diskussion

### 3.1 Lokalisierung von ESCRT-Komponenten

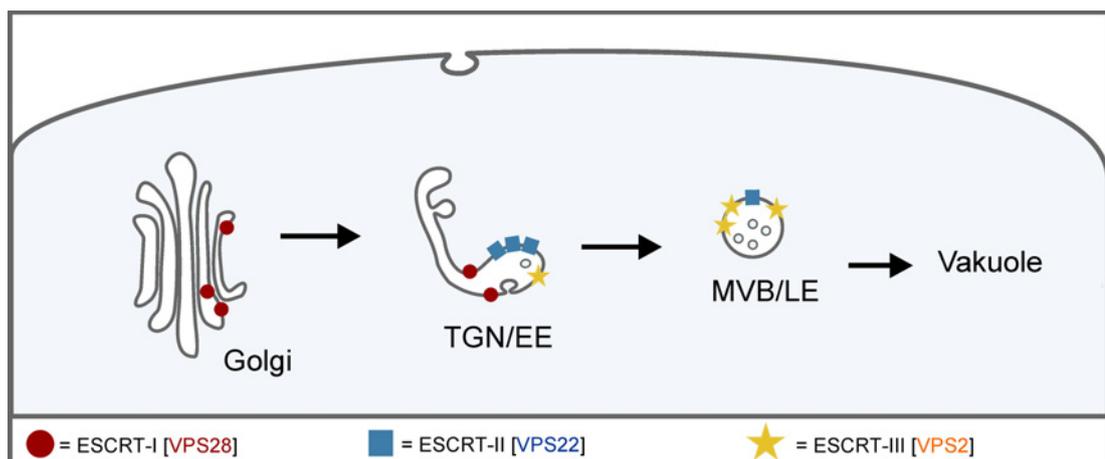
Alle Proteine stehen in einem dynamischen Gleichgewicht von Abbau und Synthese. Während die Degradierung löslicher Proteine durch das Proteasom erfolgt (Pickart und Cohen, 2004), sind die molekularen Mechanismen die zum (selektiven) Abbau von Membranproteinen führen noch weitgehend unverstanden. In Hefe und Säugern wurde gezeigt, dass Membranproteine über Endosomen zu Vakuolen/Lysosomen transportiert und dort degradiert werden. Damit eine Degradierung im Lumen der Vakuole bzw. der Lysosomen möglich ist, werden Membranproteine in die intraluminalen Vesikel (ILV) der multivesikulären späten Endosomen (MVBs/LEs) sortiert. Die Sortierung in die ILV, sowie deren Abschnürung in das Lumen der MVBs/LEs, erfolgt durch die ESCRT-Maschinerie (Raiborg und Stenmark, 2009; Wollert und Hurley, 2010). Nach dem Förderband-Model bindet ESCRT-0 an Frachtmoleküle und konzentriert diese an endosomale Membranen. ESCRT-I und -II sortieren Fracht in Bereiche der Membran, die später eingestülpt werden und ESCRT-III schnürt diese Einstülpungen in das Lumen der MVBs/LEs als ILV ab (Wollert und Hurley, 2010, Hurley und Hanson, 2010).

Die endosomalen Kompartimente von Pflanzenzellen sind bislang noch unzureichend charakterisiert. Aus diesem Grund wurde die Beteiligung der ESCRT-Maschinerie an Bildung und Erhalt dieser Kompartimente untersucht. Als Voraussetzung für funktionelle Charakterisierungen, wurden Lokalisierungsstudien der drei pflanzlichen ESCRT-Teilkomplexe durchgeführt. Die Tatsache, dass ESCRT-0 nicht und ESCRT-I nur teilweise in Pflanzen konserviert ist, führte zu der Vermutung, dass die Initiierung der ESCRT-vermittelten Proteinsortierung anders erfolgen könnte als in Hefe und Säugern. Überraschenderweise wurde die ESCRT-I Komponente VPS28 endogen sowohl in *Arabidopsis*-Wurzelspitzen durch Immunogold-EM als auch durch Immunfluoreszenz-Aufnahmen in BY2-Zellen am Golgi und am TGN/EE, jedoch nicht am MVB/LE detektiert. Basierend auf der Morphologie des MVB/LE war die Lokalisierung der ESCRT-Maschinerie an diesem Kompartiment erwartet worden. Alle bisherigen Lokalisierungsstudien der ESCRT-Maschinerie hatten dies bestätigt und zeigten ESCRT-Komponenten und assoziierte Proteine überwiegend am MVB/LE (Haas et al., 2007; Spitzer et al., 2009; Shahriari et al., 2010). Zur Bestätigung der VPS28-Lokalisierung wurden daher *Arabidopsis*-Wurzelspitzen vor der Fixierung 1 h mit Brefeldin A (BFA) behandelt. Nach

ultrastruktureller Analyse konnte VPS28 in so genannten BFA-Kompartimenten detektiert werden (siehe Abb. 2.2). BFA führt zu einer Vesikulierung des TGN/EE, welches dann von Golgi-Stapeln umgeben ist (Für eine Übersicht sei auf Robinson et al., 2008b verwiesen). VPS28-Signale sind sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie der BFA-Kompartimente zu detektieren und bestätigen die Lokalisierung von VPS28 am TGN/EE und am Golgi. Für *in vivo* Lokalisierungsstudien von VPS28 wurden fluoreszierende Fusionsproteine zur transiente Genexpression hergestellt. Da Interaktionen beider VPS28-Termini mit anderen ESCRT-Untereinheiten möglich schienen, wurden Fluorophore N- und C-Terminal fusioniert (YFP-VPS28 und VPS28-GFP). Die Expression in Tabakprotoplasten zeigte jedoch eine rein cytosolische Verteilung der ESCRT-Komponente, unabhängig von der Position des Fluorophors. Die ausbleibende Rekrutierung an ein Zielkompartiment wurde als Indiz gewertet, dass sowohl N- als auch C-terminale Fusion eines Fluorophors an VPS28 die Interaktion mit anderen ESCRT-Komponenten verhindert oder zumindest stark beeinträchtigt. Die Blockierung von Interaktionen mit anderen Proteinen durch Fusion eines Fluorophors ist hinlänglich bekannt. So wurde beispielsweise bei der Expression von SNARE-Proteinen beobachtet, dass sich fluoreszierende Fusionsproteine sowohl im Lokalisierungsverhalten als auch in ihrer Funktionalität stark von den korrespondierenden wildtypischen Proteinen unterscheiden (Bubeck et al., 2008). Im Fall der ESCRT-I Komponente VPS28 scheinen beide Termini für Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des MVB-Sortierungswegs und für eine Rekrutierung an die entsprechenden Zielmembranen essentiell zu sein. In Hefe wurde gezeigt, dass der C-Terminus von Vps28 mit der ESCRT-II Untereinheit Vps36 interagiert (Kostelansky et al., 2006; Teo et al., 2006) und in Säugern konnte eine Interaktion des N-Terminus von VPS28 mit Vps23 (Tsg101) gezeigt werden (Bishop und Woodman, 2001). Im Gegensatz dazu, wurden die C-terminalen GFP-Fusionen der ESCRT-II Komponente VPS22 und der ESCRT-III Komponente VPS2 (VPS22-GFP und VPS2-GFP) in transientser Genexpression an Membranen rekrutiert. Um die punktförmigen Signale der ESCRT-Untereinheiten den Kompartimenten des Endomembransystems zuordnen zu können, wurden Kolokalisierungsstudien mit bekannten Markerproteinen durchgeführt. VPS22-GFP und VPS2-GFP wurden jeweils mit fluoreszierenden Markerproteinen für den Golgi, das TGN/EE und das MVB/LE koexprimiert. Koexpression mit dem Golgi-Marker Man1-RFP zeigte sowohl für VPS22-GFP als auch für VPS2-GFP keine überlappenden Signale. VPS22-GFP wurde mehrheitlich mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 und teilweise mit dem MVB-Marker mRFP-VSR2 kolokalisiert. Im Gegensatz dazu kolokalisierte VPS2-GFP teilweise mit YFP-SYP61, zeigte aber die größte

Überlappung mit Signalen des MVB-Markers mRFP-VSR2. Immunogold-EM und Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit VPS22-Antikörpern führten zu keiner spezifischen Lokalisierung des Antigens. Eine Erklärung hierfür könnte eine mangelnde Zugänglichkeit der Epitope im nativen Proteinkomplex darstellen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass der Antikörper gegen denaturierte VPS22-Proteine hergestellt wurde (siehe 4.9.1) und somit eventuell native VPS22-Proteine, in ultrastruktureller Analyse und Immunfluoreszenz-Studien, nicht erkennt. Untersuchungen des endogenen VPS2 mit Antikörpern indes, konnten in stabil transformierten BY2-Zellen durchgeführt werden. BY2-Zellen die den MVB-Marker GFP-BP80 exprimierten, kolokalisierten teilweise mit VPS22, während BY2-Zellen die GONST1-YFP als Golgi-Marker exprimierten, keine Kolokalisierung zeigten. Die Immunfluoreszenz-Studien bestätigten somit die gefundenen Ergebnisse aus Lokalisierungsstudien in transienter Expression von Tabakprotoplasten.

Wurden beide ESCRT-Komponenten (VPS22-GFP und VPS2-RFP) koexprimiert, so zeigte sich, dass nahezu alle VPS22-Signale mit VPS2-RFP kolokalisierten, während sich die Hälfte der zahlreicheren VPS2-Signale als unabhängig und zudem als WM-sensitiv erwies. Dies bestätigte erneut, dass VPS2-RFP, nicht aber VPS22-GFP am MVB/LE lokalisiert ist. Die drei analysierten ESCRT-Untereinheiten zeigten also eine differentielle, aber zum Teil überlappende Lokalisierung an endosomalen Kompartimenten entlang des vakuolären Transportwegs (siehe Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Graduelle Verteilung der ESCRT-Untereinheiten.** Die ESCRT-I Komponente VPS28 ist am Golgi und am TGN/EE, die ESCRT-II Komponente VPS22 hauptsächlich am TGN/EE und die ESCRT-III Komponente VPS2 teilweise am TGN/EE, aber mehrheitlich am MVB/LE lokalisiert. Daher ergeben sich Überlappungen der Signalpopulationen hauptsächlich am TGN/EE.

Der Grund für die graduelle Verteilung der ESCRT-Untereinheiten ist unklar. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass bereits während der Anreicherung von Frachtmolekülen durch ESCRT-I und -II an Membranen des TGN/EE, ESCRT-III für

die Abschnürung der ILV rekrutiert werden könnte. Das Fehlen von ESCRT-I und ESCRT-II an Membranen des MVB/LE könnte dann bedeuten, dass die Anreicherung und Sortierung von Frachtmolekülen abgeschlossen ist, aber ESCRT-III noch nicht vollständig dissoziieren konnte. In diesem Szenario würden MVBs/LEs gereifte Kompartimente nach abgeschlossener Proteinsortierung darstellen, die dann mit der Vakuole fusionieren. Eine weitere Erklärung für die graduelle Lokalisierung der ESCRT-Teilkomplexe könnte in der unterschiedlichen Natur ihrer Dissoziation von Membranen liegen. So wurde in Hefe gezeigt, dass die ESCRT-III Dissoziation von der AAA-ATPase Vps4 (SKD1 in Pflanzen) abhängig ist, während die Dissoziation früherer ESCRT-Teilkomplexe als unabhängig von Vps4 angesehen wird (Nickerson et al., 2010). In Pflanzen ist SKD1 im Cytosol und am MVB/LE lokalisiert (Haas et al., 2007) und interagiert mit ESCRT-III und ESCRT-assoziierten Proteinen, aber nicht mit Untereinheiten von ESCRT-I oder ESCRT-II (Spitzer et al., 2009; Shahriari et al., 2010). Die Lokalisierung der ESCRT-III Komponente VPS2, als Interaktionspartner von Vps4 am MVB/LE, wäre in diesem zweiten Szenario deshalb folgerichtig. Die graduelle Verteilung der ESCRT-Maschinerie über verschiedene, räumlich getrennte Kompartimente deutet jedoch auch auf eine eng verknüpfte funktionelle Beziehung dieser Kompartimente hin. Hierbei stellt sich die Frage, wie die durch ESCRT-I/II konzentrierten Frachtmoleküle ohne die beteiligten ESCRT-Teilkomplexe vom TGN/EE zum MVB/LE gelangen können. Würde dieser Transportschritt über CCVs erfolgen, müsste die gesamte ESCRT-Maschinerie an MVBs/LEs lokalisiert sein, da nur die Gesamtheit aller Komponenten die ILV-Bildung an endosomalen Membranen vollziehen kann (Wollert und Hurley, 2010). Da weder ESCRT-I noch ESCRT-II mehrheitlich am MVB/LE lokalisiert sind, erscheint der Transport von zu degradierenden Membranproteinen vom TGN/EE zum MVB/LE über CCVs als unwahrscheinlich.

### **3.2 ESCRT und der Transport zur Vakuole**

Um den vakuolären Transport von löslichen Proteinen und Membranproteinen getrennt zu analysieren, sollte die ESCRT-Maschinerie durch verschiedene Mutanten differentiell inhibiert werden. Für eine Inhibierung von ESCRT-II wurde VPS22, nach dem Vorbild einer dominant-negativen Substitutionsmutante in Hefe (Hierro et al., 2004), mutagenisiert (VPS22-DN; siehe Kapitel 2.2). Hierdurch wurde die Inhibierung der zuerst assemblierenden ESCRT-Teilkomplexe am TGN/EE angestrebt. Alle folgenden ESCRT-Mutanten zielen auf die Inhibierung späterer Schritte der Assemblierung. Auf diese Weise sollten differentielle Effekte, bei der Inhibierung früher und später ESCRT-Schritte, untersucht werden. Für eine

funktionelle Charakterisierung von VPS22-DN, wurde der Transport bekannter Reporter in transienter Genexpression untersucht. Diese quantifizierbaren Proteintransportstudien wurden mit einem Reporter für die Sekretion (*amy*) und dessen Derivat mit dem sequenzspezifischen vakuolären Sortierungssignal (*ssVSS*) NP1RL zur Untersuchung des vakuolären Transportes (*amy-spo*) durchgeführt. Hierbei zeigte VPS22-DN keinen Einfluss auf den Transport von *amy*. Auch bei Koexpression mit *amy-spo*, zeigte sich keine Änderung des Sekretionsindex (SI); dem Quotient aus der gemessenen Aktivität im Kulturmedium und den Zellproben. Die enzymatische Analyse zeigte jedoch eine Steigerung der gesamten Aktivität von *amy-spo* um ca. 50 % (siehe Abb. 2.7). Der konstante SI resultierte aus einer Anreicherung von *amy-spo* sowohl in den Zellproben als auch in den Mediumproben. Die Anreicherung des Reporters im Endomembransystem ist somit auf seine Fehlsortierung und die damit ausbleibende vakuoläre Degradierung zurückzuführen (Pimpl et al., 2003). Würde *amy-spo* das Lumen der Vakuole erreichen, so bliebe die Aktivität in Zellen und Medium unverändert zur Kontrolle, da hier die Degradierung des Reporters erfolgt. Der Ort der Anreicherung des Reporters innerhalb der Zelle hingegen bleibt ungewiss.

Die Herstellung einer weiteren ESCRT-Mutante zielte auf eine Inhibierung von ESCRT-III und damit auf den letzten Schritt der ESCRT-Assemblierung. Hierfür wurde VPS2 durch eine Deletion seines C-Terminus modifiziert (VPS2-DN). Dieser Teil der VPS2-Sequenz enthält ein Motiv, welches höchstwahrscheinlich für die Interaktion mit SKD1 (*Vps4* in Hefe) verantwortlich ist (siehe 1.4.4). In Hefe wurde gezeigt, dass *Vps2* und *Vps4* interagieren und dass eine Mutation des C-Terminus von VPS2 zu Defekten der Proteinsortierung führt (Hurley, 2008; Obita et al., 2007). VPS2-DN zeigte in quantitativen Proteintransportstudien differentielle Effekte auf den sekretierten Reporter *amy* und den vakuolären Reporter *amy-spo*. Die Koexpression von VPS2-DN mit *amy* zeigte keinen Effekt, aber der Transport von *amy-spo* war stark beeinträchtigt. Die Expression von VPS2-DN führte zu einer dosisabhängigen Inhibierung des vakuolären Transportes. Die gemessene Aktivität von *amy-spo* in den Zellproben blieb konstant, während die Aktivität in den Medienproben stark anstieg. Daraus resultierte der, im Vergleich zur Kontrolle, fünffach erhöhte SI (Abb. 2.12). Der lösliche vakuoläre Reporter wird, aufgrund der Inhibierung des vakuolären Transportes, nun wie der sekretorische Reporter *amy* in das Kulturmedium sekretiert – ein als induzierte Sekretion beschriebener Effekt (daSilva et al., 2005). Diese induzierte Sekretion ist auf eine Inhibierung des Recyclings vom MVB/LE zum TGN/EE zurückzuführen. So können Rezeptoren der VSR-Familie und andere Proteine nicht rezykliert werden und an ihre Liganden

binden. Somit verbleiben löslichen Proteine mit sequenzspezifischen vakuolären Sortierungssignalen (ssVSS) im *default pathway* und werden wie Proteine ohne Sortierungssignal in den Extrazellularraum sekretiert (daSilva et al., 2005).

Zur Inhibierung des finalen Schritts der ESCRT-Maschinerie, der Disassemblierung, wurde eine Mutante der ESCRT-assoziierten AAA-ATPase SKD1 exprimiert, da diese ausschließlich am MVB/LE und im Cytosol lokalisiert ist (Haas et al., 2007). Proteintransportanalysen mit der SKD1-Mutante (AtSKD1(AQ); Shahriari et al., 2010) zeigten, wie bei der Expression von VPS2-DN, eine Fehlsortierung vakuolärer Fracht. Während der Sekretionsindex von amy unverändert blieb, stieg der SI von amy-spo auf das Zwanzigfache des Kontrollwertes an (siehe Abb. 2.13) und der vakuoläre Reporter wurde vollständig in das Kulturmedium sekretiert (Shahriari et al., 2010). Diese induzierte Sekretion war auch bei der Expression des wildtypischen SKD1 (AtSKD1) zu beobachten, allerdings wesentlich schwächer ausgeprägt. Diese Fehlsortierung könnte durch eine, von SKD1 vermittelte, verfrühte Dissoziation von ESCRT-Untereinheiten vom Ort der Sortierung ausgelöst werden. So könnte ein Abbruch von Sortierungsmechanismen an endosomalen Membranen erfolgen und lösliche Proteine in anderen Subdomänen des TGN/EE akkumulieren. Wenn das TGN/EE, an der Sekretion von löslichen Proteinen ohne Sortierungssignal (*default pathway*) beteiligt ist (Viotti et al., 2010), könnte eine Fehlsortierung in diesen Transportweg das Auftreten von amy-spo im Kulturmedium erklären. Angenommen die Subdomäne, in der amy-spo akkumuliert, würde die Funktion eines Recycling-Endosoms wahrnehmen, so könnten vakuoläre Frachtmoleküle an dieser Stelle in die Vesikel mit der zu rezyklierenden Fracht und somit in das Kulturmedium fehlsortiert werden. Interessanterweise hebt die Fusion eines Fluorophors an den C-Terminus von AtSKD1 den verursachten Effekt der induzierten Sekretion vollständig auf. Auch die topologisch gleiche Fusion eines Fluorophors mit der SKD1-Mutante reduzierte den Effekt stark (für einen Überblick siehe Abb. 2.13) und lässt eine fehlende Funktionalität der (X)FP-Fusionen vermuten, wie es auch für VPS28 gezeigt wurde (siehe 2.1).

Zur komplementären Analyse des inhibierten vakuolären Transportes löslicher Proteine, wurden Western-Blot Analysen mit einem weiteren löslichen vakuolären Reporter, GFP-sporamin, durchgeführt. Die Expression der ESCRT-Mutanten AtSKD1(AQ) und VPS2-DN führte zum Verschwinden sowohl des transitorischen GFP-sporamin als auch der typischen vakuolären Form des GFP (daSilva et al., 2005) in den Zellextrakten. Gleichzeitig wurde GFP-sporamin, dosisabhängig, vermehrt im Kulturmedium detektiert. Somit zeigte sich auch in Western-Blot

Analysen, dass der Transport löslicher vakuolärer Proteine durch die Expression von ESCRT-Mutanten inhibiert ist. Wie in Proteintransportstudien erwies sich der Effekt von AtSKD1(AQ) als stärker wie der von VPS2-DN verursachte; vakuolärer Transport fand schon bei 10 µg eingesetzter, für AtSKD1(AQ) kodierender, Plasmid-DNA nicht mehr statt (siehe Abb. 2.14). Da der Transport des sekretorischen Reporters amy durch keine der ESCRT-Mutanten beeinflusst wurde, liegt eine Inhibierung des vakuolären Transportes im späten sekretorischen Transportweg, zwischen TGN/EE und MVB/LE, nahe. Die analysierten Mutanten zeigten, korrespondierend zu ihren unterschiedlichen Lokalisierungen, differentielle Effekte auf den Transport löslicher vakuolärer Proteine. Hier stellt sich die Frage, an welchem Kompartiment die durch ESCRT-I/II am TGN/EE konzentrierten Membranproteine in die ILV des MVB/LE sortiert werden.

### **3.3 ESCRT-abhängiger Transport vom TGN/EE zum MVB/LE**

Zur Identifizierung des Ortes der vakuolären Fehlsortierung wurde der Transport verschiedener endosomaler Membranproteine untersucht. Das SNARE-Protein YFP-SYP61 wurde als Markerprotein für das TGN/EE, ein modifizierter vakuolärer Sortierungsrezeptor (VSR; mRFP-VSR2) als Markerprotein für das MVB/LE ausgewählt. Während der TGN-Marker vom ER über den Golgi zum TGN/EE transportiert wird, geht der MVB-Marker einen Transportschritt weiter, bevor er sein Zielkompartiment erreicht. Durch Expression der ESCRT-Mutante VPS2-DN wurden differentielle Effekte auf den Transport beider endosomaler Markerproteine erwartet. Um zu gewährleisten, dass die Markerproteine ihr Zielkompartiment erreichen und dann in voneinander unabhängigen Signalpopulationen auftreten, wurden Zeitreihen-Experimente durchgeführt. Die ersten Signale beider Marker waren schon 6 h nach der Transfektion detektierbar. Anfangs waren jedoch TGN- und MVB-Marker größtenteils kolokalisiert; die vollständige Trennung der Signalpopulationen konnte erst 18 h nach der Transfektion beobachtet werden (siehe Abb. 2.15). Aus diesem Grund wurde die Koexpression von YFP-SYP61 und mRFP-VSR2 mit VPS2-DN frühestens nach 18 h Inkubationszeit analysiert. Hierbei sollte die Kolokalisierungsrate von TGN- und MVB-Marker Anhaltspunkte für einen Effekt von VPS2-DN liefern. Die Expression von VPS2-DN zeigte eine erhöhte Kolokalisierung von YFP-SYP61 und mRFP-VSR2 und zudem eine Veränderung der beobachteten Signale. Die, in Kontrollexperimenten, gleichmäßigen punktförmigen Signale beider Markerproteine änderten sich zu größeren, strukturell variablen Signalen, die kolokalisierten. Da die Sekretion und damit der Transport zum Golgi unbeeinflusst ist (siehe 2.4), muss die Expression von VPS2-DN

Transportschritte nach dem Golgi bzw. TGN/EE und vor der Fusion des MVB/LE mit der Vakuole verhindern. Die Kolokalisierung beider membrangebundenen Marker lässt sich nur mit einem Transportstopp zwischen TGN/EE und MVB/LE erklären. Die vergrößerten, strukturell andersartigen Signale müssen demnach aus Membranen des TGN/EE und des MVB/LE bestehen oder ein stark vergrößertes TGN/EE, in dem Markerproteine für das MVB/LE akkumulieren, darstellen. In Hefe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei Mutationen von ESCRT-Untereinheiten vergrößerte, strukturell untypische Signale an endosomalen Membranen zu finden sind (Raymond et al., 1992).

Eine Inhibierung des Transportes zum MVB/LE und die darauf folgende Lokalisierung von VSR-basierten Markerproteinen am TGN/EE, war bereits bei Expression eines RNAi-Konstruktes gegen *sorting nexin* SNX2a zu beobachten gewesen (Niemes et al., 2010b). In diesem Fall war jedoch der Transport löslicher vakuolärer Proteine unbeeinflusst. Es stellte sich also die Frage, ob es sich bei dem von VPS2-DN verursachten Transportstopp am TGN/EE um einen spezifischen Effekt für Rezeptoren der VSR-Familie handelte. Um dies auszuschließen, wurde die Kolokalisierungsrate von YFP-SYP61 mit weiteren MVB-Markern (ARA6-mRFP oder mRFP-ARA7) nach Expression von VPS2-DN analysiert. Beide MVB-Marker sind keine Membranproteine, sondern werden aus dem Cytosol an ihre Zielmembranen rekrutiert. Dadurch werden vorhandene MVBs/LEs, unabhängig von einem wie auch immer gearteten Transport zwischen TGN/EE und MVB/LE, identifiziert. Die Expression von VPS2-DN führte zu einer erhöhten Kolokalisierungsrate beider MVB-Marker mit dem TGN-Marker YFP-SYP61. Erneut wurden vergrößerte, strukturell veränderte Signale, wie zuvor beschrieben, beobachtet (siehe Abb. 2.16). Die Kolokalisierung aller MVB-Marker mit dem TGN-Marker YFP-SYP61 lässt darauf schließen, dass VPS2-DN den Transport vom TGN/EE zum MVB/LE generell inhibiert. Unklar bleibt jedoch, warum die Rab-GTPasen ARA6 und ARA7 an Membranen rekrutiert werden, die positiv für den TGN-Marker YFP-SYP61 sind. Eine Erklärung könnte sein, dass sich die Zusammensetzung endosomaler Membranen durch die Expression der ESCRT-Mutante ändert und so Rab-GTPasen fehlerhaft rekrutiert werden. Alternativ könnten die GTPasen in einem frühen Schritt der MVB-Entwicklung, kurz vor der Abschnürung vom TGN/EE, rekrutiert werden und nur dort detektierbar werden, da die MVB-Entwicklung gestoppt ist. Dies wird durch Befunde in Hefe gestützt. In so genannten *class E compartments* akkumulieren sowohl Markerproteine für den Golgi und die Vakuole als auch lösliche vakuoläre Frachtmoleküle (Raymond et al., 1992). In Säugern führen die Mutation von SKD1 wie auch Interferenz mit der

ESCRT-I Komponente TSG101 zur Bildung von *class E compartments*. Diese Kompartimente bestehen aus den Membranen früher Endosomen und akkumulieren EE-Marker, endocytisierte Rezeptoren und lysosomale Proteine und werden deshalb auch als multivesikuläre, frühe Endosomen bezeichnet (Yoshimori et al., 2000; Doyotte et al., 2005).

### 3.4 ESCRT-Lokalisierung und Biogenese des MVBs/LEs

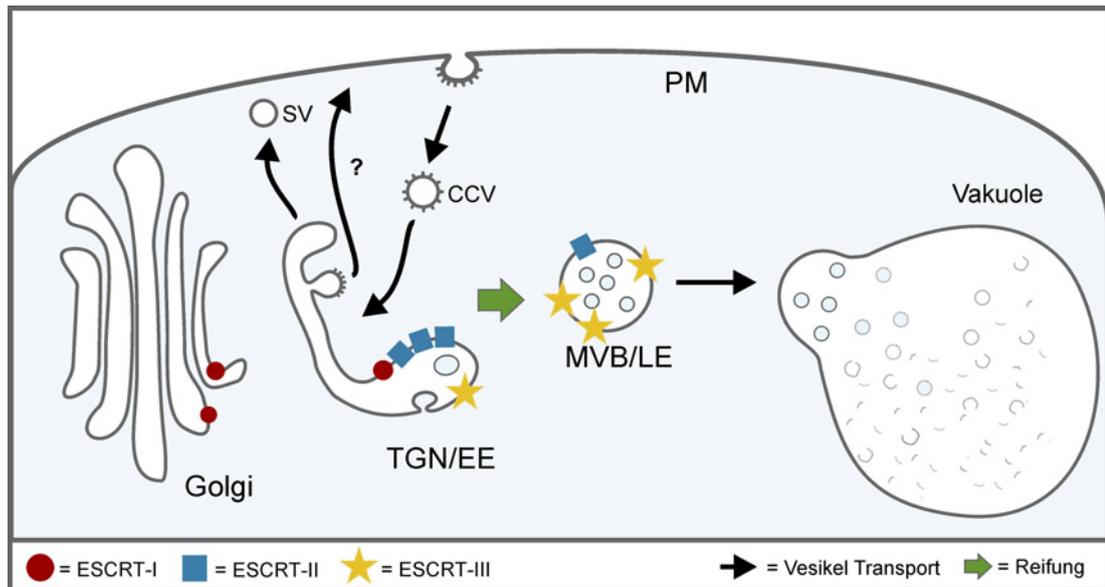
Die Expression von ESCRT-Mutanten zusammen mit Markerproteinen für das TGN/EE und das MVB/LE führte zu einer erhöhten Kollokalisierungsrate der endosomalen Markerproteine und zu vergrößerten, strukturell veränderten Signalen (siehe Abb. 2.16). Diese vergrößerten Signale aus Markerproteinen für das TGN/EE und das MVB/LE legen Vergleiche mit den in Hefe und Säugern auftretenden *class E compartments* (Raymond et al., 1992) nahe. Auch in Pflanzen führen Mutationen von ESCRT-assoziierten Proteinen zur Bildung großer MVB-ähnlicher Strukturen mit wenig ILV. In Doppelmutanten der ESCRT-assoziierten Proteine CHMP1A und 1B (*charged multivesicular body protein*) wurde außerdem nachgewiesen, dass die Bildung dieser Strukturen mit einer Fehlsortierung ESCRT-abhängiger Frachtmoleküle wie PIN1 (*pinformed1*) und AUX1 (*auxin-resistant1*) einhergeht (Spitzer et al., 2009).

Erstaunlicherweise waren bei Inhibierung der ESCRT-Maschinerie durch VPS2-DN (siehe Abb. 2.16) selbst die cytosolischen Markerproteine für das MVB/LE (ARA6-mRFP und mRFP-ARA7) fehlsortiert worden und kollokalisieren mit dem TGN-Marker YFP-SYP61. Beide cytosolischen MVB-Marker gehören zu der Familie der Rab-GTPasen (Haas et al., 2007) und vermitteln die Spezifität von Vesikelfusionen. In Säugern vermitteln Rab-GTPasen die Reifung des LE aus dem EE durch einen so genannten Rab-Konversions-Mechanismus (Rink et al., 2005; Poteryaev et al., 2010). Hierbei wird Rab5 am EE durch SAND-1/Mon1 ersetzt, welches wiederum Rab7 rekrutiert. Dieses kann exklusiv dem LE in Säugern zugeordnet werden. In Pflanzen wurden ARA6 und ARA7 als Rab5-Typ GTPasen klassifiziert (Haas et al., 2007) und auch SAND1-1/Mon1-Homologe sind im *Arabidopsis*-Genom kodiert. Zusammen genommen deuten diese Befunde darauf hin, dass auch in Pflanzen das MVB/LE durch eine Reifung aus Strukturen des TGN/EE entsteht (siehe Abb. 3.2). Diese Reifung wird auch durch die Lokalisierungsstudien der ESCRT-Teilkomplexe gestützt. Die analysierten ESCRT-Untereinheiten zeigten eine graduelle Verteilung an den Kompartimenten entlang des vakuolären Transportwegs. Besonders die Lokalisierung der ESCRT-I Komponente VPS28 am Golgi und am TGN/EE (siehe

Abb. 2.2) suggeriert eine ESCRT-Funktion bereits auf dieser Ebene. Ultrastrukturelle Analysen der Peripherie zwischen TGN/EE und MVB/LE in *Arabidopsis*-Wurzelspitzen, zeigten entstehende MVBs/LEs, die mit dem TGN/EE in Verbindung stehen (Abb. 2.18). Die Existenz von ILV in Strukturen des TGN/EE, damals als *partially coated reticulum* (PCR) beschrieben, wurde schon vor Jahren in Pflanzen gezeigt (Pesacreta und Lucas, 1984; Hillmer et al., 1988). Neueste elektronenmikroskopische Analysen des TGN/EE führten zwar zu der Schlussfolgerung, dass die tubulären Bereiche dieses Kompartiments TGN/EE eventuell Vorläufer des MVB/LE seien, konnten jedoch keine Erklärung für dessen Bildung MVB/LE liefern (*cisternal fragmentation model*; Kang et al., 2011).

In Säugern geht der Transport von Molekülen zu den Lysosomen mit der Reifung endosomaler Kompartimente einher. Basierend auf Sortierungsprozessen entwickelt sich das EE zu einem LE und dient letztlich als temporär limitierte Transporteinheit für die Degradierung in der Vakuole. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Transport saurer Hydrolasen, Rezeptor-unabhängig vom EE zu den Lysosomen erfolgt und mit einer Reifung des EE zum LE einhergeht (Piper und Katzmann, 2007; van Weering et al., 2010) Während das multivesikuläre späte Endosom (MVB/LE) in Pflanzen dem späten Endosom der Säuger morphologisch sehr ähnlich ist (Tse et al., 2004; Viotti et al., 2010), gibt es funktionell und morphologisch große Unterschiede der frühen Endosomen.

Im Gegensatz zu den funktionell und strukturell separaten Kompartimenten des TGN und des EE in Säugern, stellen das TGN und das EE in Pflanzen Subdomänen des gleichen Kompartiments dar (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007; Reichardt et al., 2007). Der postulierte Transport zwischen TGN/EE und MVB/LE mit Hilfe von CCVs (Kirsch et al., 1994) konnte jedoch bislang experimentell nicht bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Transport löslicher Proteine zur Vakuole ohne Beteiligung von Rezeptoren der VSR-Familie erfolgt (Niemes et al., 2010b). Ein Szenario mit statischen endosomalen Kompartimenten kann diese Befunde nicht erklären. Zusammenfassend stellen die gezeigten Ergebnisse den postulierten Vesikeltransport zwischen TGN/EE und MVB/LE in Frage und stellen diesem Vesikeltransport einen Reifungsprozess gegenüber (siehe Abb. 3.2). Die Reifung des MVB/LE aus dem TGN/EE deutet auf einen kontinuierlichen Membranfluss zwischen endosomalen Kompartimenten in Pflanzen hin. Demzufolge führen Defekte in der Integrität und Struktur des TGN/EE zu Störungen der MVB-Biogenese.



**Abb. 3.2: Vereinfachtes Modell des späten sekretorischen Transportwegs.** Die ESCRT-Teilkomplexe sind an den Kompartimenten entlang des vakuolären Transportwegs verteilt. Die Inhibierung des Transportes vom TGN/EE durch Mutation von ESCRT-Komponenten sowie die in ultrastruktureller Analyse gezeigten endogenen TGN-MVB-Hybride lassen vermuten, dass es sich bei dem Transport vom TGN/EE zum MVB/LE um eine Reifung (grüner Pfeil) und nicht um einen Vesikel-vermittelten Transport (schwarze Pfeile) handelt. Dieses eröffnet jedoch die Frage nach der Funktion der am TGN/EE gefundenen CCVs (*clathrin-coated vesicles*) – eventuell sind sie am Recycling zur Plasmamembran (PM) beteiligt (durch ? gekennzeichnet). Sekretorische Vesikel (SV) sind für den Transport in den Apoplasten zuständig.

### 3.5 Ubiquitin als Sortierungssignal in Pflanzen

Durch die graduelle Lokalisierung von Komponenten der ESCRT-Teilkomplexe entlang des Golgis und der endosomalen Kompartimente wurde gezeigt, dass die ESCRT-Maschinerie ihre Funktion wahrscheinlich bereits auf dieser Ebene wahrnimmt. Zu degradierende Membranproteine werden üblicherweise durch eine Ubiquitinierung für den Abbau markiert. Hier stellt sich die Frage, ob Ubiquitin auch in Pflanzen als Sortierungssignal dienen kann und eine Erkennung durch die ESCRT-Maschinerie möglich ist. Zur Untersuchung von Ubiquitin als Sortierungssignal für die Endocytose und den degradativen Transport zu Vakuole, wurde ein Reportersystem etabliert. Reportermoleküle dieses Systems sollten idealer Weise nur den endocytischen Weg durchlaufen und die Einzelschritte des Transportes sollten dann durch die etablierten ESCRT-Mutanten inhibierbar sein. So sollte zuerst bestimmt werden, ob Ubiquitin als Internalisierungs- und Endocytosesignal ausreichend ist und dann die Frage nach der ESCRT-Abhängigkeit beantwortet werden. Für *in vivo* Untersuchungen wurden zwei fluoreszierende Proteine, ein posttranslational in die PM inseriertes Protein sowie ein Transmembranprotein, als Basis genutzt. Die Fusion von Ubiquitin an den C-

Terminus beider Proteine (Box-GFP-Ub und RFP-TMD23-Ub) bewirkte eine Internalisierung der Reportermoleküle. Die Kolokalisierung mit endosomalen Markern für das TGN/EE (YFP-SYP61) und das MVB/LE (mRFP-ARA7 oder GFP-BP80) zeigte, dass tatsächlich eine Sortierung in den endocytischen Weg erfolgte. Beide Kompartimente stellen endosomale Transit-Kompartimente auf der Route zur Vakuole dar (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007; Robinson et al., 2008a).

Obwohl der Reporter Box-GFP-Ub endocytiert wurde, erreichte er selbst 48 h nach der Transfektion nicht das Lumen der Vakuole, sondern wurde nur bis zum MVB/LE transportiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die stabile Ubiquitin-Fusion des Reporters nicht durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) gespalten werden kann. In Hefe und Säugern konnte die Notwendigkeit der Ubiquitin-Abspaltung für den Transport zur Vakuole bzw. den lytischen Kompartimenten gezeigt werden (Dupre et al., 2004; Komada, 2008). Eine Inhibierung der DUBs führte zur Fehlsortierung endosomaler Proteine und zu einer Anreicherung ubiquitinerter Proteine an endosomalen Membranen (Richter et al., 2007; Row et al., 2006; Hasdemir et al., 2009).

Im Gegensatz zu Box-GFP-Ub erreichte das Transmembranprotein RFP-TMD23-Ub die Vakuole. Koexpression mit dem löslichen vakuolären Reporter aleurain-GFP führte zu einer Kolokalisierung im Lumen der Vakuole. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die in Hefe und Säugern gezeigte notwendige Deubiquitinierung in Pflanzen keine zwingende Voraussetzung für vakuoläre Degradierung darstellt. Eine andere naheliegende Erklärung liegt in der Art der Membranbindung von Box-GFP-Ub begründet. Da die S-Acylierung als Membrananker reversibel ist (Linder und Deschenes, 2007), könnte die Bildung ILV der MVBs/LEs zur Dissoziation von Box-GFP-Ub führen. Weiterhin könnte die polybasische Region innerhalb der Box-Sequenz, welche die Membranspezifität vermittelt, durch eine graduelle Veränderung der Lipide endosomaler Kompartimente, zur Dissoziation von der Membran führen (Lavy und Yalovsky, 2006; Sorek et al., 2009). Für beide Reportersysteme gilt, dass die Fusion von monomerem Ubiquitin als Internalisierungs- und Endocytosesignal dienen kann. Erste Hinweise, dass Ubiquitin als Internalisierungssignal für Proteine der PM dienen kann, lieferten Studien aus Hefe und Säugern (Rotin et al., 2000; Hicke, 2001; Hicke und Dunn, 2003).

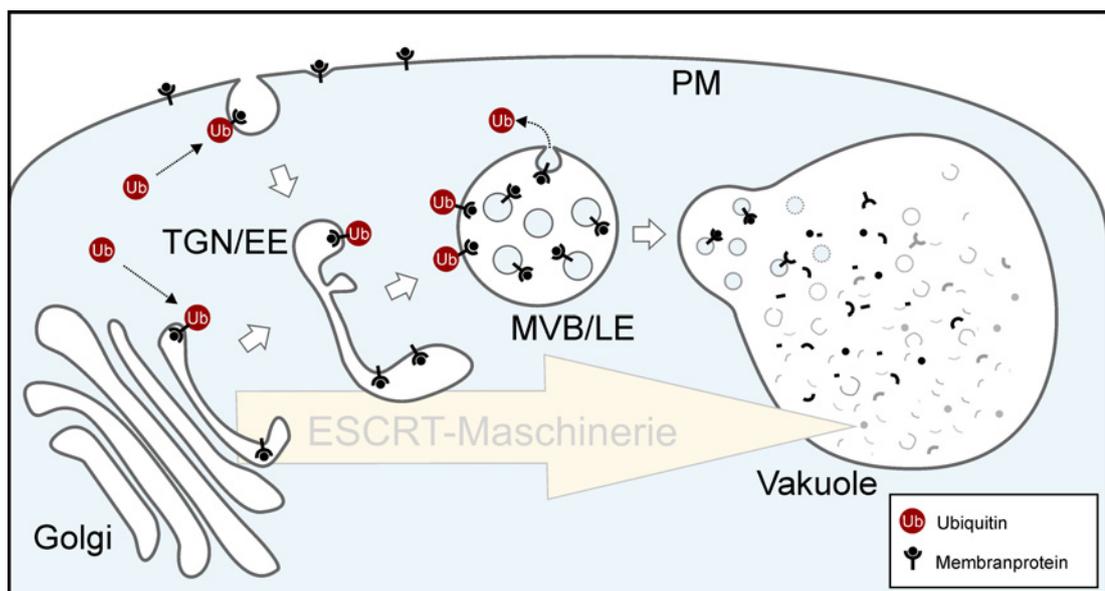
### 3.6 Ubiquitin-vermittelte Sortierung und ESCRT

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Reportsystem gleicht einem in Säugern genutzten GFP-basierten Reportersystem (Chen und De Camilli, 2005). Als Grundlage für dieses System diente ein PM-lokalisiertes GFP, welches mit Ubiquitin fusioniert wurde (PM-GFP-Ub). Mit Hilfe von endosomalen Markerproteinen wurden Kolokalisierungsstudien durchgeführt um die erwartete Endocytose nachzuweisen. Die Reporter-moleküle dieses Systems wurden tatsächlich effizient internalisiert und kolokalisierten mit Markerproteinen für Endosomen und endocytischen Vakuolen. Durch Immunpräzipitation des Reporters konnte mit Hilfe eines Ubiquitin-Antikörpers festgestellt werden, dass dieser polyubiquitiniert vorliegt. Um diese Polyubiquitinierung zu verhindern, wurden die endständigen Glycine des Ubiquitin deletiert (PM-GFP-Ub $\Delta$ GG). Dadurch wird in Säugern eine Interaktion von Ub $\Delta$ GG mit den Lysin-Seitenketten ubiquitiniertes Substrate verhindert (Haglund et al., 2003). Für PM-GFP-Ub $\Delta$ GG wurde gezeigt, dass keine Polyubiquitinierung vorliegt und dass die Internalisierung dieses Konstruktes sogar effizienter erfolgt wie für PM-GFP-Ub (Chen und De Camilli, 2005).

Durch diese Arbeit inspiriert, wurden die endständigen Glycine der internalisierten Reporter Box-GFP-Ub und RFP-TMD23-Ub deletiert (Box-GFP-Ub $\Delta$ GG und RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG). Im Gegensatz zu den experimentellen Befunden von Chen und De Camilli, zeigte die Expression von Box-GFP-Ub $\Delta$ GG ausschließlich Signale an der PM – eine Internalisierung blieb jedoch aus (siehe Abb. 2.25). Die Fusion von monomerem Ubiquitin an Membranproteine scheint somit in Pflanzen für eine Internalisierung von der PM nicht ausreichend zu sein. Die Resultate sprechen sogar dafür, dass eine Polyubiquitinierung in Pflanzen für die Internalisierung von der PM wahrscheinlicher ist. Überraschenderweise zeigte die Deletion der C-terminalen Glycine des Reporters RFP-TMD23-Ub keinen Einfluss auf den Transport zur Vakuole. Diese Befunde erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich, da beide Reporter mit Ubiquitin als Internalisierungssignal fusioniert sind. Während aber Box-GFP-Ub $\Delta$ GG direkt in die PM inseriert wird und Ub $\Delta$ GG nur an diesem Ort zugänglich ist, muss RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG durch das Endomembransystem transportiert werden bevor es sein Zielkompartiment, die PM, erreicht. Auf diesem Weg zur PM könnte RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG eine Sortierung erfahren und in Richtung der Vakuole abzweigen. Wenn ESCRT-Teilkomplexe am Golgi und am TGN/EE lokalisiert sind um ubiquitinierte Proteine der Degradierung zuzuführen, dann besteht auch die Möglichkeit, dass ein ubiquitiniertes *Transit-Protein* durch die ESCRT-Maschinerie sortiert wird, bevor es sein Zielkompartiment

erreicht. Dies erscheint als wahrscheinlich, da auch das ursprünglich an der PM lokalisierte RFP-TMD23 durch eine Ubiquitin-Fusion, ESCRT-abhängig in das Lumen der Vakuole transportiert wurde (siehe Kapitel 2.8). Somit könnte Ubiquitin, gegenüber der Sortierung durch die Länge der Transmembrandomäne (TMD, Brandizzi et al., 2002b) als Sortierungssignal bevorzugt werden und der Transportmodulation dienen.

Die überraschende Lokalisierung der ESCRT-I Untereinheit VPS28 am Golgi und am TGN/EE (siehe Abb. 2.2) spricht in diesem Szenario für eine frühere Sortierung von RFP-TMD23-Ub und RFP-TMD23-Ub $\Delta$ GG. Hierbei würde Ubiquitin, vor der Ankunft der Reporter an der PM, als generelles Signal für Membranproteine funktionieren und damit die auf RFP-TMD23 basierten Konstrukte in Richtung Vakuole umleiten (siehe Abb. 3.3). Statt über den *default pathway* (Chrispeels, 1991; Denecke et al., et al., 1992) die PM zu erreichen, könnte Ubiquitin so bereits am Golgi bzw. TGN/EE als Signal von der dort lokalisierte ESCRT-Maschinerie (siehe Abb. 2.2 und Abb. 2.3) erkannt und sortiert werden (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 3.3: Ubiquitin als Sortierungssignal für Membranproteine.** Durch Ubiquitinierung werden Membranproteine für die Degradierung in der Vakuole markiert. Über eine ESCRT-abhängige Sortierung in die ILV des MVBs/LEs erreichen die markierten Proteine das Lumen der Vakuole, wo sie für Hydrolysen und Peptidasen zugänglich sind und abgebaut werden. Die Lokalisierung von ESCRTI und ESCRTII an Golgi und TGN/EE spricht für eine Erkennung und Interaktion ubiquitinierten Membranproteine schon auf dieser Ebene. Markierte PM-Proteine können endocytiert und nach Erreichen des TGN/EE ebenfalls ESCRT-abhängig in die ILV des MVB/LE sortiert werden.

In Säugern wurde gezeigt, dass am Golgi lokalisierte ubiquitinierte Membranproteine zu Endosomen transportiert und dort von der ESCRT-Maschinerie erkannt und sortiert werden. Hier findet die Degradierung markierter

Membranproteine des Golgi-Apparates, ohne einen Transport über die PM statt (Überblick in Nickerson et al., 2007).

Da sowohl das Membranprotein RFP-TMD23-Ub als auch der lösliche vakuoläre Reporter aleurain-GFP im Lumen der Vakuole kolokalisieren, erscheint ein identischer Weg durch das Endomembransystem als sehr wahrscheinlich. Die Tatsache, dass der Transport beider Proteine ESCRT-abhängig inhibiert wird (siehe Abb. 2.24), bestätigte dies und kann als Indiz für ESCRT-Interaktion mit ubiquitinierten Membranproteinen gewertet werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin in Pflanzen nicht einzig als Internalisierungssignal von Membranproteinen dient, sondern eventuell ein allgemeingültiges Sortierungssignal für den Transport von Membranproteinen zur Vakuole darstellt (siehe Abb. 3.3). Die durch das Reportersystem erhaltenen Daten deuten zudem darauf hin, dass, anders als in Säugern, monomeres Ubiquitin nicht als Internalisierungssignal ausreichend ist. In Säugern und Hefe markiert eine Polyubiquitinierung cytosolische Proteine für die Degradierung durch das Proteasom, während Monoubiquitinierung als Internalisierungssignal an der PM beschrieben wurde (Roth und David, 2000; Shih et al., 2000; Dupre et al., 2004; Stringer und Piper, 2011). Eine effiziente Internalisierung von ubiquitinierten Proteinen der PM kann darüber hinaus über kurze Polyubiquitin-Ketten erfolgen (Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997; Springael et al., 1999; Geetha et al., 2005; Madshus, 2006).

### 3.7 Untersuchungen an *Arabidopsis* Pflanzen

Um die Rolle der ESCRT-Funktionalität für Entwicklungsprozesse und die Homöostase der gesamten Pflanze zu untersuchen, wurden zwei *Arabidopsis* t-DNA-Insertionslinien für die Isoformen der ESCRT-I Untereinheit VPS28 analysiert. Nach Genotypisierung wurden beide Linien mit wildtypischen *Arabidopsis* Pflanzen verglichen und auf Unterschiede in ihrer Physiologie und Entwicklung untersucht. Nur die t-DNA-Insertionslinie SALK 040274C (*VPS28-2*) zeigte Abweichungen in der Entwicklung. Der Vergleich der Hypokotyllänge zeigte ein verzögertes Wachstum von *VPS28-2*. Dieses war besonders deutlich nach sechs Wochen erkennbar – während die wt *Arabidopsis* Pflanzen schon ihre volle Wuchshöhe erreicht, sowie Blüten und Schoten entwickelt hatten, wiesen die *VPS28-2*-Pflanzen eine geringere Wuchshöhe, erst wenige Blüten und folglich noch keine Schoten auf (siehe Abb. 2.28). Diese Unterschiede nivellierten sich während der fortlaufenden Entwicklung bis zur Seneszenz vollständig. Einen Grund hierfür könnte die Existenz von zwei,

eventuell funktionell äquivalenten, Isoformen von VPS28 darstellen. Unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten durch den *knock-out* einer Isoform könnten durch eine Regulierung (*upregulation*) der Expression der zweiten Isoform im weiteren Entwicklungsverlauf nivelliert werden. Um beide VPS28-Isoformen auszuschalten, wurden die t-DNA-Insertionslinien *VPS28-2* und *VPS28-1* gekreuzt. Eine Analyse der Doppelmutante konnte jedoch auf Grund des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit bis jetzt nicht abgeschlossen werden. Für schnelles und effizientes Ausschalten beider Vps28-Isoformen wurde, zeitgleich mit der Analyse der t-DNA-Insertionslinien, ein RNAi-Konstrukt gegen Vps28 kloniert (RNAi-VPS28). Mittels Proteintransportstudien sollte der Effekt der RNA-Interferenz untersucht werden. Die Transiente Expression von RNAi-VPS28 zeigte keinen Effekt auf den Transport des sekretorischen Reporters amy, aber die Aktivität des Reporters für die Vakuole, amy-spo, stieg bei unverändertem Sekretionsindex um 50 % an. Dieser Effekt ist mit dem von VPS22-DN verursachten vergleichbar (siehe Abb. 2.7 und Abb. 2.29). Auch hier kann die gesteigerte Aktivität nur durch eine Fehlsortierung vakuolärer Fracht und dadurch mangelnder Degradierung in der Vakuole erklärt werden (daSilva et al., 2005). Die Mutation von Untereinheiten aller ESCRT-Teilkomplexe führte also zu einer Störung des vakuolären Transportes. Demzufolge ist die Funktionalität der gesamten ESCRT-Maschinerie eng an den Transport zur Vakuole geknüpft.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten also, neben der Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie, Einblicke in die Biogenese von Endosomen sowie deren Einfluss auf zelluläre Transportvorgänge gewonnen werden. Erste Untersuchungen an *Arabidopsis* Pflanzen zeigten, dass die molekulare Funktion der ESCRT-Maschinerie nicht nur Auswirkungen auf zelluläre Mechanismen, sondern auch auf die Entwicklung und Homöostase der gesamten Pflanze hat. So wurde das Verständnis des Endomembransystems erweitert und der Grundstein für weitere Erkenntnisse der komplexen Organisation von Molekülen zum Organismus gelegt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Benchmark Microplate Reader	Bio Rad, München
Digitalkamera, Coolpix	Nikon, Japan
Digitalkamera für TEM, FastScan F214	TVIPS, Gauting
Eismaschine, ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen
Elektroelutionssystem, Biotrap	Werkstatt der Uni. Heidelberg
Elektronenmikroskop, CM10	Philips, Niederlande
Elektronenmikroskop, JEM1400	JEOL, Japan
Elektrophorese Kammer	Serva, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgerät, Blue Power 500	Serva, Heidelberg
Elektroporator, Gene Pulser II	Bio Rad, München
Kühlschränke 4 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Feinwaage BP 121S	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationssystem, BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Gefrierschränke -20 °C und -80 °C	Heraeus, Hanau
Gefriersubstitutionseinheit, AFS	Leica, Bensheim
Gelkammer für Agarosegel Elektrophorese	Serva, Heidelberg
Gelkammer für SDS-PAGE	Werkstatt der Uni. Heidelberg
Hochdruckgefrieranlage, HPM010	BalTec, Liechtenstein
Impfbank, HERAGuard HPH12	Heraeus, Hanau
Konfokalmikroskop, LSM 510	Zeiss, Jena
Laborwippe	Elmi, Lettland
Megafuge 1.0R	Kendro laboratory, Osterode
Mikrowelle, MS-1987U	LG Electronics, Südkorea
Peltier Thermocycler für PCR	MJ Research, USA
pH-Meter	Sartorius, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Heizblock Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Peristaltische Pumpe, 313U	Watson Marlow, USA
Semidry Blotting System	Bio-Rad, München
Photometer, Biophotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Tischmischer, Vortexgenie 2	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Gerät, Sonoplus	Bandelin, Berlin

UV-Transilluminator	Benda, Wiesloch
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wärmeschränke 28 °C und 37 °C	Heraeus Instruments, Hanau
Western-Blot Dokumentationssystem	Intas, Göttingen
Zellkulturschüttler Innova 4230	New Brunswick Scientific, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont, Bad Homburg

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier	Whatman, USA
Dialysemembran, Typ 20	Biomol, Hamburg
Glaswaren	Schott, Mainz
Mikrotiterplatten	Bio-Rad, München
Nitrocellulosemembran	Pall Corporation, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Österreich
Petrischalen klein	Sterilin, U.K
Pipettenspitzen, steril, 10 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
Sterile Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Reaktionsgefäße, 10 ml,	Sterilin, U.K
Sterilfilter, 0,22 µm	Roth, Karlsruhe
Weck Gläser	Weck, Wehr

#### 4.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, entsprechen alle Chemikalien dem Reinheitsgrad pro analysi (p.a.) und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem	Heidelberg, Deutschland
Fermentas Life Sciences	St.Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

#### 4.1.4 Enzyme und Kits

AceGlow Chemiluminescence substrate	Intas, Göttingen
Alkalische Phosphatase (Fast-AP)	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
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Niederlande
Phusion high fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Finnland
Plasmid-Kit NucleoBond PC100	Macherey-Nagel, Düren
Taq DNA Polymerase	Fermentas, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Heidelberg
RNeasy-Kit für RNA-Extraktion	Qiagen, Niederlande
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reverse Transkriptase, Revert Aid M-MuLV	Fermentas, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Heidelberg
Macerozym R10	Yakult, Japan
Zellulase R10	Yakult, Japan

## 4.2 Bakterienmaterial

### 4.2.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm MC 1061 genutzt (Casabdan und Cohen, 1990).

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *Escherichia coli* Stamm BL 21(DE3) (Amersham Bioscience, Freiburg) eingesetzt.

### 4.2.2 Anzucht von *E.coli*-Kulturen

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium entweder für Flüssigkulturen oder auf LB-Agarplatten zur Vereinzelung von Bakterienklonen. Sollten transformierte Bakterien angezogen werden, wurden Ampicillin (150 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zur Selektion eingesetzt.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C und 250 rpm im Zellkulturschüttler. Die OD wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt.

Zur Herstellung von Sicherungskulturen wurden 500 µl einer 3 ml ü.N.-Kultur mit 500 µl einer 30 % Glycerin-Lösung versetzt und bei -80 °C eingefroren.

## LB-Medium

5 g Hefeextrakt  
10 g Trypton  
10 g NaCl

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l eingestellt, anschließend autoklaviert.

## LB-Agar

15 g Agar pro Liter LB-Medium

Die Zugabe des Agars erfolgt vor dem autoklavieren. Nach Abkühlen auf 55 °C konnten Selektionsmarker hinzugefügt werden.

**4.2.3 Herstellung kompetenter Bakterienstämme**

Um zur DNA-Aufnahme befähigte Bakterienstämme herzustellen wurde mit einer 3 ml Vorkultur (OD<sub>600</sub> etwa 0,3) 200 ml einer 2x YT Lösung inokuliert und diese bei 37 °C und 250 rpm im Zellkulturschüttler inkubiert, bis eine OD von 0,48-0,5 erreicht worden war. Danach wurde die Kultur in vier 50 ml Reaktionsgefäße überführt und das Bakterienwachstum auf Eis gestoppt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, mit vorgekühlten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien bei 4 °C im Kühlraum des Laboratoriums.

Nach 20 min Zentrifugation im ausschwingenden Rotor bei 5.000 g<sub>max</sub> und 4 °C wurde das Sediment in 80 ml TFBI resuspendiert und nachdem der Zentrifugationsschritt wiederholt worden war, das Sediment in 8 ml TFBI resuspendiert. Nach 15 min Inkubation wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße 100 µl der Lösung aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Aufbewahrung bei -80 °C gelagert.

## 2x YT-Medium

5 g NaCl  
10 g Hefeextrakt  
16 g Trypton

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l eingestellt, pH 7,0 mit NaOH eingestellt und anschließend autoklaviert.

## TFBI

10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
30 mM KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O  
100 mM RbCl  
15 % Glycerin (v/v)

Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O und einstellen des pH-Wertes mit 0,2 M CH<sub>3</sub>COOH auf 5,8. Danach wurde die Lösung steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

## TFBII

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
15 % Glycerin (v/v)

Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O und Einstellen des pH- Wertes mit 5 M KOH auf 6,6. Danach wurde die Lösung steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### 4.2.4 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Kompetente *E.coli* Bakterien des Stammes MC1061 wurden 15 min auf Eis aufgetaut; die zu transformierende DNA hinzugegeben und eine Viertelstunde inkubiert. Durch die nun folgende dreiminütige Hitzeschockbehandlung bei 37 °C nahmen die Bakterien die DNA auf. Nun konnten die Bakterien auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen werden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht im Wärmeschrank.

### 4.3 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die transiente Genexpression wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Ökotyp SR1) unter sterilen Bedingungen mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bei 25 °C kultiviert.

#### 4.3.1 Kultivierung von Tabakpflanzen

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden auf MS-Nährmedium unter sterilen Bedingungen in Gläsern der Firma Weck aufgezogen.

Tabaksamen wurden vor der Aussaat mit Chlorbleichlauge oberflächensterilisiert und dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen bevor etwa 20 Samen zur Keimung auf MS-Medium pipettiert wurden. Nach zwei Wochen Wachstum und der damit einhergehenden Wurzelbildung wurden die Keimlinge vereinzelt.

#### MS-Nährmedium

0,5 g MES, pH auf 5,7 mit KOH eingestellt  
0,8 g Agar  
4,3 g MS Medium, (Murashige, 1962)  
20 g Saccharose  
Mit ddH<sub>2</sub>O auf 800 ml auffüllen.

In Schottflaschen autoklavieren und bei etwa 55 °C in sterile Weck Gläser füllen.

Chlorbleichlauge

12 % Natriumhypochloritlösung in ddH<sub>2</sub>O

### 4.3.2 Kultivierung von *Arabidopsis* auf Erde

Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen für die Pflanzenanzucht erfolgte durch 15 - 30 min Inkubation in 70 % EtOH + 0,05 % Triton X-100. Nun folgten maximal 5 min in 99 % EtOH und Aufnahme in 0,05 % Agarlösung.

Zur Beschleunigung der Keimung wurden sterilisierte Samen zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert.

Für die Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* auf Erde wurden sterilisierte Samen nach Stratifikation auf autoklavierter Einheitserde Typ T der Firma Patzer (Sinnatal – Jossa) ausgesät und unter Langtagbedingungen angezogen. Nach etwa zwei Wochen wurden die Pflanzen in Einzeltöpfe pikiert und bis zur Abreifung gehalten.

### 4.3.3 Anzucht und Kultivierung von Tabak-Suspensionskulturen

Die Anzucht und Kultivierung von *Bright Yellow 2* (BY2)-Suspensionskulturen erfolgte in MS-Nährmedium bei 25 °C und 100 rpm im Zellkulturschüttler unter Ausschluss von Licht. Subkultivierung fand wöchentlich statt, wobei das Innokulum etwa 1/50 der herzustellenden Neukultur entsprach. Alle experimentellen Arbeiten fanden am dritten Tag nach der Subkultivierung statt.

MS-Nährmedium

0,2 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure  
0,1 g Myoinositol  
0,1 g Thiamin  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
4,3 g MS-Medium  
30 g Saccharose

Mittels KOH auf pH 5,7 eingestellt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt.

## 4.4 Methoden der Entwicklungsbiologie

### 4.4.1 Messung des Hypokotylwachstums

Nach Sterilisierung und Stratifizierung erfolgte die Aussaat von *Arabidopsis*-Samen auf MS-Agarplatten. Einem 4 h Lichtpuls ( $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) folgten die Maskierung der Platen durch zwei Schichten Aluminiumfolie und anschließende Inkubation für 4 Tage bei 22 °C. Für die Messung der Länge von Hypokotylen wurden Keimlinge

zwischen zwei Klarsichtfolien fixiert und auf einem Flachbettscanner eingescannt. Digitale Aufnahmen wurden mit dem Programm *ImageJ* 1.41 (Abramoff et al., 2004) ausgewertet.

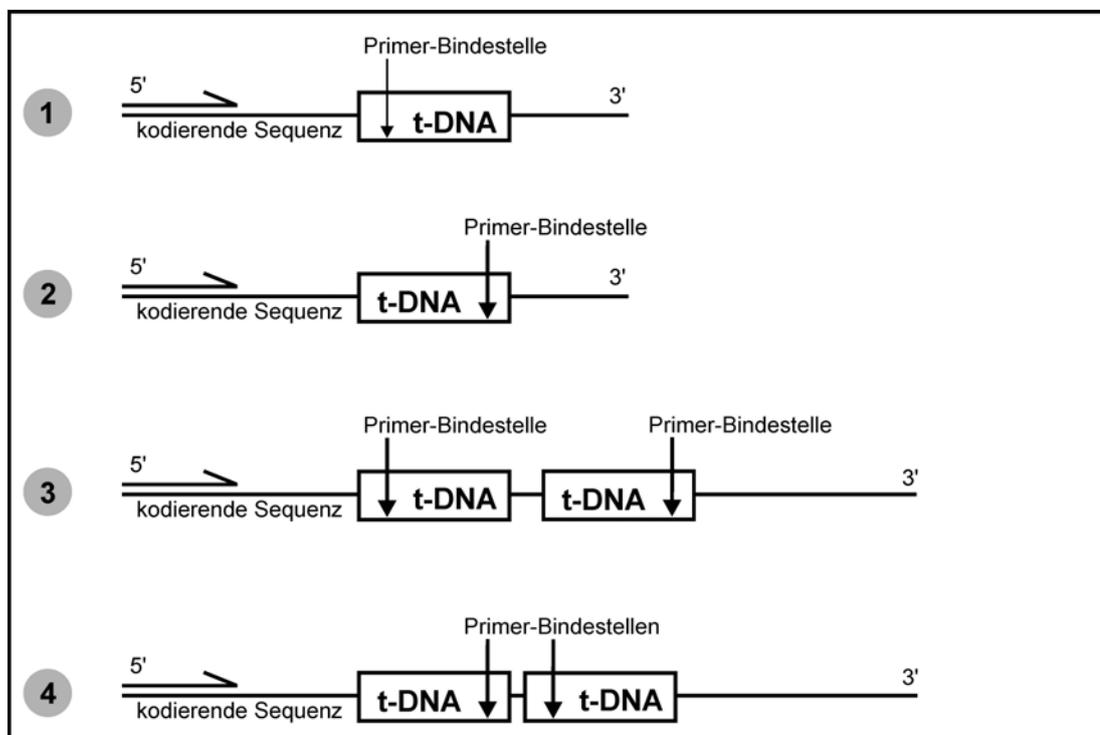
#### MS-Agarplatten

1/10 MS  
0,5 % Saccharose  
0,7 % Phytoagar  
10 mM MES

Mit KOH auf pH 5,8 einstellen, anschließend autoklavieren.

#### 4.4.2 Genotypisierung von t-DNA-Insertionslinien

Für die Bestimmung von t-DNA-Insertionen wurden pro zu untersuchende Linie vier PCR-Reaktionen durchgeführt: Mit dem genspezifischen Sense- und Antisenseprimern um wildtypische Pflanzen zu erkennen (1), mit genspezifischen Sense und t-DNA spezifischem Primern um eine Insertion nachzuweisen (2), dem genspezifischen Antisenseprimer und dem t-DNA spezifischen Primer um eine inverse Orientierung/mehrfache Insertion auszuschließen (3) und letztlich mit dem t-DNA spezifischen Primer alleine um eine doppelte, gespiegelte Insertion auszuschließen (4). Daraus ergeben sich vier Möglichkeiten der Insertion (siehe Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Möglichkeiten der t-DNA-Insertion.** In (1) einfache Insertion, (2) reverse Insertion, (3) doppelte Insertion, gespiegelt, (4) doppelte Insertion, revers gespiegelt.

Für die Bestimmung der t-DNA-Insertionen wurden folgende Oligonukleotidprimer benutzt:

**SALK-Linie 040274C**

t-DNA spezifischer Primer (LBb1.3)	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
Genspezifischer Primer (Vps28-2_S)	ATGGAGGTCAAATTATGG
Genspezifischer Primer (Vps28-2_AS)	TTAATTACCAGCTTTAGG

**SAIL-Linie 690 E05**

t-DNA spezifischer Primer (Lb1)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
Genspezifischer Primer (Vps28_S)	ATCGATGGAGGTCAAGTTA
Genspezifischer Primer (Vps28_AS)	GGATCCTAAATTACCAGCATTAGG

Alle PCR Reaktionen wurden wie unter 4.6.1 beschrieben durchgeführt, die resultierenden PCR-Fragmente aufgereinigt (siehe 4.6.9) und sequenziert (siehe 4.6.11) um die genaue Insertionsstelle der t-DNA zu bestimmen.

**4.4.3 Kreuzung von stabil transformierten *Arabidopsis*-Linien**

Da *Arabidopsis thaliana* hermaphroditische Blüten besitzt und sich somit fast einzig durch Selbstung vermehrt, müssen bei Kreuzungen die Empfängerpflanzen männliche Geschlechtsorgane entledigt werden. Deshalb werden zuerst Blüten mit reifen Antheren und bereits bestäubte Blüten abgeschnitten und dann Infloreszenzen mit geeigneten Blüten emaskuliert. Mit Pollen reifer Antheren einer Spenderpflanze werden die Narben der emaskulierten Blüten bestäubt und abschließend markiert.

**4.5 Klonierungen****4.5.1 Vektoren**

Die in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte dienen der Proteinexpression in Bakterien und der transienten Expression in Pflanzenzellen. Dabei wurden folgende Zielvektoren nach entsprechender Vorbereitung (Linearisierung, Dephosphorylierung) für die Ligation benutzt (siehe 4.6.5 und 4.6.6).

**pAmy**

Der Vektor pAmy ist ein pflanzlicher Expressionsvektor der auf dem Klonierungsvektor pUC18 basiert. Für hohe Expressionsraten besitzt er einen 35S CaMV (*cauliflower mosaic virus*)-Promotor und einen 3'nos (Nopalin-Synthase) – Terminator. Eine Ampicillinresistenz-Kassette dient der Selektion, Klonierung erfolgt standardmäßig durch NcoI und BamHI/XbaI/BglII Restriktionsschnittstellen (Crofts et al., 1999).

**pAmy-HDEL**

Entspricht wie pAmy einem modifizierten pUC18 Vektor; allerdings keine BglII Restriktionsschnittstelle.

**pGD5**

Ist eine modifizierte Version von pAmy-HDEL. Anstelle der NcoI Restriktionsschnittstelle am N-Terminus des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF) besitzt er NheI.

**pSN09**

Kodiert für SNX2a-GFP. NheI/NotI Restriktionsschnittstellen wurden für die Insertion der SNX2a-Sequenz verwendet. Basiert auf pGD5 (Niemes et al., 2010b).

**pSar1**

Ein Derivat von pUC18. Der ORF ist durch ClaI/BamHI bzw. ClaI/XbaI begrenzt (Phillipson et al., 2001).

**pDS26**

N-terminale YFP-Fusion mit dem TGN lokalisierten SNARE SYP61 (YFP-SYP61). Die SNARE-Sequenz ist durch ClaI/BamHI bzw. ClaI/XbaI begrenzt. Basierend auf YFP-SYP81 (Bubeck et al., 2008).

**pBP30**

Kodiert den Golgi-Marker Man1-RFP/GFP. d35S-Promotor, ORF inklusive RFP/GFP und Terminator, basierend auf dem Plasmid *Bluescript*. Austausch der gesamten Klonierungskassette inklusive Fluorophor ist mit BglII/SalI Restriktionsschnittstellen möglich. Zwischen der Man1-Sequenz und dem Fluorophor befindet sich eine XbaI Restriktionsschnittstelle.

**pGEX-4T-3**

Der Vektor pGEX-4T-3 ist ein bakterieller Expressionsvektor, welcher zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen eingesetzt wird. Mit Hilfe des lac-q Promotors kann durch Zugabe von IPTG die Expression von Proteinen induziert werden. Durch Affinitätsreinigung mittels GST-Sepharose kann anschließend das

Fusionsprotein isoliert werden. Auch dieser Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

#### 4.5.2 Oligonukleotidprimer

Alle Oligonukleotide sind in 5'- 3'- Richtung angegeben. Unterstrichen sind eingeführte Schnittstellen für Restriktionsenzyme, in der Spalte *Konstrukt* sind diese zudem namentlich aufgeführt. Außerdem ist hier der Konstruktname nach laborinterner Nomenklatur zu finden. Die Spalte *Zielvektor* gibt Aufschluss darüber in welchen Vektor PCR-Fragmente mit den jeweiligen Oligonukleotidprimern kloniert wurden. Für die Synthese aller Oligonukleotide wurde die Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) beauftragt.

	<i>Konstrukt</i>	<i>Zielvektor</i>	<i>Oligonukleotid: Sense/Antisense</i>
Box-GFP	pDS09 NcoI/BamHI	pDS10	CGAGCT <u>CCATGG</u> CAGTGAAACAAAAGG/ TCGCGG <u>GATCCT</u> TACTTGTACAGCTC
Box	Zur Klonierung, NcoI/Clal	Zusammengelagerte Oligos mit fertigen Schnittstellen	<u>CCATGG</u> CAGTGAAACAAAAGGAGAAGAAGAAG CAGAAGCCTCGAAGCGGATGTCTCTCAAACATTCTG TGTGGGAAGAATGGATCGAT/ <u>CGATCC</u> ATTCTTCCCACACAGAATGTTTGAGAGACA TCCGCTTCGAGGCTTCGAGGCTTCTGCTTCTTCTTC TTCTCCTTTTGTTCAC <u>TGC</u>
GFP	Zur Klonierung, Clal/NotI	pAmy-HDEL	TAGTGGAT <u>CGATGG</u> TGAGCAAGGGCCGAGGA/ CCTATC <u>GCGGCCGCC</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGC
Ubiquitin	Zur Klonierung, NotI/XbaI	pAmy-HDEL	CTCTCT <u>GCGGCCGC</u> ATGCAAATCTTCGTGAAAAC/ ATCACATCTAGATTATCCACCACGAAGACG
Box-GFP-Ub	pDS10 NcoI/XbaI	pAmy-HDEL	Box, GFP, Ubiquitin als Dreifachligation in pAmy-HDEL
Box-GFP-UbΔGG	pDS21 NcoI/BamHI	pDS10	CGAGCT <u>CCATGG</u> CAGTGAAACAAAAGG/ CTCTAGT <u>GGATCCT</u> CATCTTAAACGGAGAAC
VPS28	pDS27 Clal/BamHI	pSar1	AACAACATCGATGGAGGTCAAGTTA/ AACAAC <u>CGATCCT</u> AAATTACCAGCATTAGG
YFP-VPS28	pDS26 Clal/BamHI	pDS13 (YFP-SYP61)	AACAACATCGATGGAGGTCAAGTTA/ AACAAC <u>CGATCCT</u> AAATTACCAGCATTAGG
VPS28-GFP	pDS25 NheI/NotI	pSN09	ACCACCGCTAGCATGGAGGTCAAGTTA/ ACCACCG <u>GCGCCGCG</u> GATTACCAGCATTAGG
loop für RNAi	NcoI/NotI	SNX2a-RNAi	AAATAACCATGGTCTTTTTTCTTTTA/ TTCCAG <u>GCGGCCGCC</u> CAATCCAAATGTAAG
VPS28 für RNAi Sense	NheI/NcoI	VPS28	ACCACCGCTAGCGAGGGGAAGATTAAG/ ACCAC <u>CCATGG</u> ATTACCAGCATTAGG
VPS28 für RNAi Antisense	NotI/BglIII	VPS28	ACCACCG <u>GCGCCGC</u> ATTACCAGCATTAGG/ ACCAC <u>GATCTG</u> AGGGGAAGATTAAG
RNAi-VPS28	pDS35 NheI/BglIII	pGD5	VPS28-RNAi Sense, loop und VPS28-RNAi Antisense als Dreifachligation in pGD5 GFP

	<b>Konstrukt</b>	<b>Zielvektor</b>	<b>Oligonukleotid: Sense/Antisense</b>
GST-VPS28	EcoRI/Sall	pGEX-4T-3	CTGAAA <u>G</u> AATTCCGTC AAGTTATGGAAT/ GTGGCAG <u>T</u> CGACTTAATTACCAGCATT
VPS22	pNF04 NcoI/BglII	pAmy	TGGACCATGGTCATTTAAGTATCAGATC/ ATAA <u>A</u> GATCTAAGATGCGACGACGA
VPS22-Mut.	pNF05	pNF04	AGTTCAGATTGATGAAGTTTGCA/ TGCAA <u>A</u> CTTCATCAATCTGAACT
VPS22-GFP	NheI/NotI	pSN09	TGGAGCTAGCTCATTTAAGTATCAGATC/ ATAA <u>G</u> CGGCCGCAAGATGCGACGACGA
VPS22-RFP	pDS32 BglII/XbaI	pBP30	ACCACC <u>A</u> GATCTATGCGACGACGACCA/ ACCACC <u>T</u> CTAGAAGTATCAGATCCGAT
GST-VPS22	EcoRI/Sall	pGEX-4T-3	GTGAAA <u>G</u> AATTCCCGACGACCAGGAATT/ AGCATGG <u>T</u> CGACTTAAGTATCAGATCC
VPS2	pDS29 ClaI/XbaI	pPP12	ACCACC <u>G</u> CTAGCATGATGAATTCAATC/ ACCACC <u>G</u> CGGCCGCGCATTTTTCTAAGGTT
VPS2-GFP	pDS24 NheI/NotI	pSN09	ACCACC <u>G</u> CTAGCATGATGAATTCAATC/ ACCACC <u>G</u> CGGCCGCGCATTTTTCTAAGGT
VPS2-RFP	pDS31 BglII/XbaI	pBP30	ACCACC <u>A</u> GATCTATGATGAATTCAATC/ ACCACC <u>T</u> CTAGAGCGCATTTTTCTAAG
GST-VPS2	EcoRI/Sall	pGEX-4T-3	CATGAT <u>G</u> AATTCAATCTTCGG/ ACAGGAG <u>T</u> CGACTCACATTTTTCTAAG
VPS2-DN	pDS30 ClaI/XbaI	pSar1	ACCACC <u>A</u> TCGATGATGAATTCAATC/ ACCACC <u>T</u> CTAGATTATATACCTCCACTGTC
Ubiquitin	BglII/PstI	für RFP-TMD23-Ub	AGTCTG <u>A</u> GATCTATGCAAATCTTCGTGAAAAAC CTA <u>T</u> G <u>C</u> AGTTATCCACCACGAAGACGGAG
RFP-TMD23-Ub	pFK13 PstI/BglII	RFP-TMD23 (Brandizzi et al., 2002b)	Ligation von Ubiquitin (Ub) in RFP-TMD23
UbΔGG	BglII/PstI	für RFP-TMD23- UbΔGG	AGTCTG <u>A</u> GATCTATGCAAATCTTCGTGAAAAAC CTA <u>T</u> G <u>C</u> AGCTAACGAAGACGGAGGACGAGATG
RFP-TMD23-UbΔGG	pFK17 PstI/BglII	RFP-TMD23 (Brandizzi et al., 2002b)	Ligation von UbiquitinΔGG (UbΔGG) in RFP-TMD23

Oligonukleotide wurden mittels PCR zur Amplifizierung der Zielfragmente benutzt und anschließend in die vorbereiteten Vektoren ligiert (siehe 4.5.1). Die Box-Sequenz wurde mit Hilfe von zusammen gelagerten Oligonukleotiden gewonnen (mit *sticky ends*). Als *loop* für das RNAi-VPS28 Konstrukt wurde die *hairpin*-Sequenz des Vektors pHannibal (CSIRO, Australien) mit den angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Konstrukte RFP-TMD23-Ub und RFP-TMD23-UbΔGG wurden in Zusammenarbeit mit Fabian Künzl, im Rahmen seiner Diplomarbeit, hergestellt.

## 4.6 Molekularbiologische Methoden

### 4.6.1 DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Etwa 100 mg Pflanzenmaterial wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Alle weiteren Schritte wurden mit dem *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Niederlande) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA-Extraktion diente vor allem dazu, t-DNA-Insertionslinien mittels PCR zu untersuchen.

### 4.6.2 RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Etwa 100 mg Pflanzenmaterial dienten als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung. Mit Hilfe des *RNeasy Plant-Kits* (Qiagen, Niederlande) wurde RNA nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 4.6.3 Synthese von cDNA aus RNA

Mittels reverser Transkriptase wurden RNA im Bereich 10 ng – 5 µg in Einzelstrang cDNA transkribiert. Alle Schritte wurden gemäß des von Sambrook et al. beschriebenen Protokolls zur *First-strand cDNA synthesis* im Thermocycler durchgeführt (Sambrook und Russel, 2001).

### 4.6.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die von Kary Mullis entwickelte (Mullis und Faloona, 1987) Methode der Polymerase Kettenreaktion dient zur Amplifikation von DNA. In einem dreistufigen Prozess wird die zu vervielfältigende DNA denaturiert, sequenzspezifische Oligonukleotidprimer können sich anlagern und die Polymerase kann diese durch den Einbau von Desoxynukleotiden verlängern. Der nächste Zyklus beginnt dann mit der erneuten Denaturierung.

Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Kapitel 4.5.2 aufgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

20 ng Template DNA  
100 ng Sense Primer  
100 ng Antisense Primer  
1 µl dNTP-Mix (10 mM)  
10 µl 5 x HF-Puffer  
0,25 µl Phusion Polymerase (5 U/µl)

Zu Beginn der PCR wurde der Reaktionsansatz für 2 min bei 94 °C erhitzt und erst dann die in sterilem Wasser verdünnte Polymerase hinzugefügt (*hot start*). Die

Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotidprimer wurde mit Hilfe folgender empirischer Formel errechnet:

$$T_{\text{Anlagerung}} (^{\circ}\text{C}) = (\text{A}+\text{T}) \times 2 + (\text{C}+\text{G}) \times 4;$$

wobei nur solche Basen einbezogen werden, die tatsächlich binden.

Abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes wurde die Polymerisierungszeit gewählt. Die Phusion Polymerase kann maximal 2000 Basenpaare pro Minute amplifizieren. 30-38 Zyklen wurden folgendermaßen durchgeführt:

Denaturierung: 94 °C für 20 s  
 Anlagerung: 46 °C - 54 °C für 30 s  
 Polymerisierung: 72 °C für 30 s

Anschließend wurde der PCR-Ansatz mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.6.8) analysiert. Nun wurde das PCR-Fragment aufgereinigt (siehe 4.6.9) und durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (siehe 4.6.5) die Schnittstellen für die Klonierung in die entsprechenden Zielvektoren freigelegt.

#### 4.6.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

DNA wurde sequenzspezifisch mit Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsansatz von 20-50 µl gespalten. Die Menge der eingesetzten Restriktionsendonukleasen und die empfohlene Temperatur wurden nach Angaben des Herstellers gewählt. Der Restriktionsendonukleasen Puffer wurde wie in Tabelle 4.1 dargestellt, angesetzt:

**Tabelle 4.1: Zusammensetzung verschiedener 10x Restriktionsendonukleasen Puffer**

Komponenten	RP 0	RP 50	RP 100	RP 150
MgCl <sub>2</sub>	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

Um bei Verwendung mehrerer Restriktionsendonukleasen den optimalen Puffer zu wählen, wurde eine Kompatibilitätstabelle verwendet (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: Kompatibilität der Restriktionsendonukleasen Puffer**

Enzyme	RP0	RP50	RP100	RP150	Enzyme	RP0	RP50	RP100	RP150
BamHI	+	++	+++	+++	PstI	+++	+++	+++	+++
BglII	++	+++	+++	+++	PvuI	+	++	+++	+++
Clal	+++	+++	+++	++	SacI	+++	+++	++	+
EcoRI		+++	+++	+++	SalI	+	+	++	+++
EcoRV	+	+	+	+++	Scal	+	+++	+++	++
HindIII	++	+++	+++	++	SmaI	+	+	+	+
KpnI	+++	+	+	+	SnaBI	+++	+++	++	+
NcoI	+	++	+++	+++	SphI	+	+	+++	+++
NdeI	+	+	++	+++	StuI	+++	+++	+++	+++
NheI	+++	+++	+++	++	XbaI	+	+++	+++	+++
NotI	+	+++	+++	+++					

Die Spaltung durch Restriktionsendonukleasen erfolgte bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde eine Aufreinigung wie in 4.6.9 beschrieben, durchgeführt.

#### 4.6.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Alkalische Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) katalysiert die Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende. Damit soll verhindert werden, dass ein linearisierter Vektor religiert.

Nach der in Kapitel 4.6.9 beschriebenen Aufreinigung wurden mit Restriktionsendonukleasen gespaltene Vektoren in einem Volumen von 40 µl eluiert und zur Dephosphorylierung 5 µl 10x *Fast-AP* Puffer und 5 µl *Fast-AP* (1 U/µl) hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 45 min bei 37 °C.

#### 4.6.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden Vektor und PCR-Fragment etwa im molaren Verhältnis 1:2 eingesetzt und die T4-DNA-Ligase (1 U/µl) samt mitgeliefertem Puffer nach Herstellerangaben eingesetzt. Typischerweise wurden Ligationen im 20 µl Volumen 1 h bei RT inkubiert.

5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien verwendet (siehe 4.2.4).

#### 4.6.8 Agarosegel-Elektrophorese

Um DNA nach ihrer Größe elektrophoretisch zu trennen wird eine Matrix aus Agarose benutzt, so dass sich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten

ergeben. Damit die zu analysierende DNA unter UV-Licht detektiert werden konnte, wurde dem Gel Ethidiumbromid hinzugefügt.

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde modifiziert nach Sambrook und Russel (2001) in 0,5x TBE mit 4x Ladepuffer durchgeführt.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA enthielten die Gele 0,5-1,0 % (w/v) Agarose und wurden mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für analytische Gele und 0,1 µg/ml für präparative Gele versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung analytischer Gele erfolgte mit einer elektrischen Feldstärke von 10 V/cm, die Auftrennung präparativer Gele mit 5 V/cm.

Analytische Gele wurden wie in Kapitel 4.11 beschrieben ausgewertet, DNA aus präparativen Gelen wie in Punkt 4.6.10 beschrieben extrahiert.

5x TBE Puffer (Stammlösung)

54 g/l Tris  
27.5 g/l Borsäure  
20 ml 0.5 M EDTA (pH8.0)

In ddH<sub>2</sub>O.

4x Ladepuffer

24 % (w/v) Saccharose  
0.1 % (w/v) Bromophenolblau  
40 mM EDTA

In ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.6.9 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA wurde das *NucleoSpin Extract II-Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 4.6.10 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen

Die DNA-Bande gewünschter Größe wurde mit einer schwachen UV Lampe detektiert und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde das *NucleoSpin Extract II-Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 4.6.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch eine Kombination der von Frederick Sanger (Sanger et al., 1977) vorgestellten Methode des Kettenabbruchs und der von Mostafa Ronaghi entwickelten Methode (Ronaghi et al., 1996) des *Pyrosequencings*. Etwa 2 µg DNA wurden durch Natriumperchlorat/Isopropanol-

Fällung vorbereitet und getrocknet. Alle Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma MWG, Ebersberg durchgeführt und die Ergebnisse elektronisch übermittelt.

#### 4.6.12 Digitale Sequenzabgleichung

Die von der Firma MWG (Ebersberg) ermittelten DNA-Sequenzinformationen wurden mit den Originalsequenzen unter Verwendung des Programmes *AlignX* aus *Vector NTI 9* (Invitrogen, Karlsruhe) verglichen.

### 4.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### 4.7.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um schnell und wenig arbeitsintensiv Plasmid-DNA zu isolieren, erfolgte eine Mini-Präparation; dabei wurde in Kauf genommen, dass Qualität und Reinheit der gewonnenen DNA niedrig ist.

Die Hälfte einer 3 ml ü.N.-Kultur wurde bei 10.000  $g_{max}$  für 1 min zentrifugiert und das Sediment in 150  $\mu$ l TES-Puffer resuspendiert. Nach Hinzufügen von 20  $\mu$ l Lysozym-Lösung (10 mg/ml), wurde der Ansatz 5 min inkubiert und anschließend die Lyse durch Zugabe von 300  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O beendet. Nach 15 min Inkubation bei 72 °C wurden die Proben 15 min bei 10.000  $g_{max}$  zentrifugiert und danach der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die enthaltene DNA durch Zugabe von 30  $\mu$ l 5 M NaClO<sub>4</sub> und 400  $\mu$ l Isopropanol gefällt worden war, konnte die DNA durch Zentrifugation (15 min, 10.000  $g_{max}$ ) sedimentiert werden. Der Überstand wurde verworfen und die getrockneten Sedimente in 50  $\mu$ l TE gelöst.

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### TES-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0  
5 mM EDTA, pH 8,0  
250 mM Saccharose

In ddH<sub>2</sub>O, danach wurde die Lösung steril filtriert.

#### TE-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0  
0.1 mM EDTA, pH 8,0

In ddH<sub>2</sub>O, danach wurde die Lösung steril filtriert.

#### 4.7.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die schnelle Isolierung mittlerer Mengen an sauberer Plasmid-DNA (50-200 µg), wurde das Plasmid-Kit *NucleoBond PC100* von Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Alle Schritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.7.3 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine Maxi-Präparation wurde durchgeführt, um große Mengen sehr sauberer Plasmid-DNA zu erhalten. Ein Extraktionsschritt mittels Phenol ermöglicht es Proteine quantitativ zu entfernen, eine zusätzliche Inkubation mit Ribonuklease A spaltet die enthaltenen Ribonukleinsäuren.

Eine 500 ml LB-Flüssigkultur wurde nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 250 rpm eine Stunde im SLA3000 Rotor der Sorvall Zentrifuge bei 4.000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 8 ml gekühltem TE 50/1 Puffer resuspendiert. Nach Überführen in SS34 Zentrifugationsgefäße wurden die Proben mit 2,5 ml Lysozym-Lösung versetzt, vorsichtig etwa zehn Mal invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Jetzt wurde die Lyse mit 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und nach weiteren 5 min auf Eis die Ribonukleinsäure-Spaltung durch Ribonuklease A begonnen. Dazu wurden 50 µl Ribonuklease A Lösung (20 mg/ml) mit 150 µl 10 % Triton X-100 (v/v) und 750 µl TE 50/1 gemischt, die Proben zehn Mal invertiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend 1 h bei 18.000 rpm im SS34 Rotor zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde 1:1 mit equilibriertem Phenol (pH 8,0; 0,1 % Hydroxychinolin) versetzt und gründlich durchmischt. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben bei 4.000 rpm im ausschwingenden Rotor für 10 min zentrifugiert und der abgenommene Überstand auf selbige Art und Weise 1:1 mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde in Corex Zentrifugationsgefäße überführt, mit TE egalisiert und mit 5 M NaClO<sub>4</sub> (10 % des abgenommenen Volumens) und Isopropanol (80 % des abgenommenen Volumens) die DNA gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 10.000 rpm im HB6 Rotor war die DNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und nachdem die Sedimente getrocknet waren, 500 µl TE hinzugefügt und ü.N. bei 4 °C resuspendiert.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

## TE 50/1 Puffer

50 mM Tris, pH 8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

In ddH<sub>2</sub>O, danach wurde die Lösung steril filtriert.

## TE-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0  
0.1 mM EDTA

In ddH<sub>2</sub>O, danach wurde die Lösung steril filtriert.

## Lysozym Lösung

10 mg/ml In ddH<sub>2</sub>O.

## 4.8 Zellbiologische Methoden

### 4.8.1 Herstellung von Protoplasten aus Tabakblättern

Für den enzymatischen Verdau der Zellwand wurden vor Beginn der Arbeiten 50 ml einer Enzymlösung (Macerozym R10 und Zellulase R10) auf sieben Petrischalen verteilt. Die Isolierung von Mesophyll-Protoplasten erfolgte unter sterilen Bedingungen aus den Blättern 6-8 Wochen alter Tabakpflanzen.

Mit einem Skalpell wurden geeignete Blätter (hellgrüne Farbe, geflecktes Muster, ovale Form) der kultivierten Tabakpflanzen (siehe 4.3.1) gelöst und in eine Petrischale zur Weiterverarbeitung gegeben. Nun wurde die gesamte Blattunterseite mit einem speziell gefertigten Stößel vorsichtig penetriert, um es der Enzymlösung zu ermöglichen bis zu den Mesophyllzellen im Blattinneren vorzudringen. Danach wurde der Hauptleitbündel des Blattes mit dem Skalpell herausgetrennt und die beiden Blatthälften mit der Unterseite in die verdünnte Enzymlösung gelegt. Vier bis sechs Blatthälften wurden in jede Petrischale gegeben und ü.N. bei 25 °C und Dunkelheit inkubiert.

Nach 6-48 h Inkubation wurden die Petrischalen etwa 30 min vor der eigentlichen Versuchsdurchführung vorsichtig geschwenkt um die entstandenen Protoplasten aus den Blattresten herauszulösen und um weitere Protoplasten zu gewinnen. Jetzt wurde der gesamte Ansatz auf einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 100 µm gegeben, welchen nur die Protoplasten, nicht aber die unverdauten Blattreste passieren können. Zur graduellen Umstellung des pH-Wertes, wurden die Zellen nun mit Elektroporationspuffer gewaschen und die verbliebenen Protoplasten aus dem Filter gelöst. Nach 15 min Zentrifugation bei 80 g<sub>max</sub> im ausschwingenden Rotor der Heraeus Zentrifuge bildeten die Protoplasten eine flotierende Phase und

Zelltrümmer und Medium konnten mit der peristaltischen Pumpe abgesaugt werden. Nachdem die Protoplasten weitere zwei Mal gewaschen wurden, konnten sie auf eine Zelldichte von  $4 \cdot 10^6$  pro ml eingestellt werden.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 10x Enzymlösung

2 % (w/v) Macerozyme R10

4 % (w/v) Zellulase R10

In TEX-Puffer ca. eine halbe Stunde resuspendieren, danach steril filtrieren. 5 ml Aliquots werden bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt und bei Bedarf 1:10 mit TEX-Puffer verdünnt.

#### 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

0,4 M Saccharose

Alle Reagenzien wurden in einem Becherglas gemischt, der pH mit KOH bei 5,7 eingestellt und das genaue Volumen in einem Kolben mit geringem Durchmesser eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in eine autoklavierte Schott-Flasche steril filtriert.

#### Elektroporationspuffer

2,4 g/l HEPES

6 g/l KCl

600 mg/l  $\text{CaCl}_2$

0,4 M Saccharose

Das Ansetzen des Puffers erfolgte wie oben beschrieben, der pH-Wert wurde allerdings auf 7,2 eingestellt.

### 4.8.2 Transformation von Protoplasten durch Elektroporation

In sterile Plastikküvetten wurden  $500\ \mu\text{l}$  der konzentrierten Protoplasten (siehe 4.8.1) mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (um Scherkräfte zu vermeiden) vorgelegt. Zu jedem Ansatz wurden 5-50  $\mu\text{g}$  DNA in  $100\ \mu\text{l}$  Elektroporationspuffer hinzugefügt und die Suspension durch vorsichtiges Schütteln gemischt.

Die Elektroporation wurde mit  $1000\ \mu\text{F}$  und  $160\ \text{V}$  mit Hilfe des *Gene-Pulsers* durchgeführt. Vor erneuter Elektroporation wurden die Elektroden in  $\text{ddH}_2\text{O}$  gereinigt, mit Ethanol abgeflammt und in Elektroporationspuffer abgekühlt. Die elektroporierten Zellen wurden anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Nach der

Inkubation wurden die Zellen in Petrischalen (Durchmesser 5,5 cm) überführt und die Küvetten je zweimal mit 1 ml TEX-Puffer nachgespült. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen 6-48 h bei 25 °C und Dunkelheit inkubiert.

#### 4.8.3 Sekretionsanalyse

Nach 12-24 h Inkubation wurden die Ansätze in 10 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 100 g<sub>max</sub> zentrifugiert, um eine flotierende Schicht Protoplasten zu erhalten. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wurde mittels des feinen, beim Zusammendrücken der Pipettierhilfe entstehenden Luftstromes, eine Öffnung erzeugt, durch die, ohne in Kontakt mit den Protoplasten zu kommen, 500 µl des Kulturmediums abgenommen werden konnte. Die entstandene Mediumprobe wurde sofort in der gekühlten Eppendorf Zentrifuge bei 14.000 g<sub>max</sub> zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen und auf Eis gelagert. Die verbliebene Suspension wurde mit 250 mM NaCl auf 10 ml aufgefüllt, das Sediment gelöst und bei 100 g<sub>max</sub> 5 min zentrifugiert. Nun wurde mit einer peristaltischen Pumpe die gesamte flüssige Phase abgesaugt und die Sedimente bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C eingefroren.

#### 4.8.4 Messung enzymatischer Aktivität

Die Messung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde sowohl im Medium als auch in Zellenextrakten durchgeführt. Dafür wurde der *Cereal  $\alpha$ -amylase assay*-Kit verwendet. Das enthaltene Substrat p-Nitrophenylmaltoheptaosid wird durch Zugabe von  $\alpha$ -Amylase zu p-Nitrophenol umgesetzt, welches photometrisch bestimmt werden kann.

Die wie in Kapitel 4.8.3 beschrieben geernteten Proben wurden mit  $\alpha$ -Amylase Extraktionspuffer verdünnt. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem kurzen Ultraschallpuls homogenisiert und Zelltrümmer bei 20.000 g<sub>max</sub> sedimentiert. 30 µl des klaren Überstandes und 30 µl des Mediums wurden mit 30 µl des geblockten Substrates versetzt und in einem Wasserbad bei 40 °C für 20-60 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 150 µl einer 1% (w/v) Tris-Lösung beendet, 200 µl der Proben auf eine Mikrotiterplatte gegeben und der Substratumsatz bei 405 nm photometrisch bestimmt.

$\alpha$ -Amylase Extraktionspuffer

50 mM Maleinsäure  
50 mM NaCl  
80 mM NaOH  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,005 % (w/v) Natriumazid

In ddH<sub>2</sub>O, pH mit HCl auf 5,7 einstellen.

#### Substratlösung

54,5 mg p-Nitrophenylmaltoheptaoside (geblockt)

100 U Glucoamylase, pH 5,2

100 U  $\alpha$ -Glucosidase, pH 5,2

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml auffüllen.

#### 4.8.5 Vakuolenpräparation aus Tabakmesophyllprotoplasten

Nach 24-48 h Inkubationszeit wurden transformierte Tabakprotoplasten mehrerer gleicher Ansätze in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Mit Kochsalzlösung (250 mM NaCl) wurde die Suspension aufgefüllt (5 ml wurden für die Herstellung eines Gesamtzellextraktes an dieser Stelle abgezweigt) und bei 100 g<sub>max</sub> für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment auf Eis gelagert. 5 ml des 42 °C warmen Lysis-Mediums wurden den Zellen zugefügt und unter vorsichtigem Schwenken im Wasserbad (42 °C) inkubiert. Nachdem die Lyse auf Eis gestoppt worden war, wurde der Gesamtansatz mittels einer abgetrennten Pipettenspitze in ein gekühltes 10 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden zuerst 3 ml eines 1:1 Gemisches aus Lysis-Medium und Vakuolenpuffer und dann 1 ml des Vakuolenpuffers alleine aufgeschichtet. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 3000 g<sub>max</sub> reicherten sich die isolierten Vakuolen als rot gefärbte Interphase der beiden dem Sediment aufgelagerten Phasen an. Etwa 500  $\mu$ l der Interphase wurden abgenommen und 1:1 mit Vakuolenpuffer gemischt. Jetzt konnten die Vakuolen am CLSM analysiert werden. Für die SDS-PAGE wurden die Zellen durch einen mehrere Sekunden andauernden Ultraschallimpuls homogenisiert, zu gleichen Teilen mit SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend bei -80 °C eingefroren. Die zur Herstellung des Gesamtextraktes abgezweigten 5 ml der Protoplastensuspension wurden für 10 min bei 100 g<sub>max</sub> zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 250  $\mu$ l Vakuolenpuffer aufgenommen, mittels Ultraschallimpuls homogenisiert und 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt. Bis zur SDS-PAGE wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### Lysis-Medium

2 mM DTT  
5 mM HEPES  
20 mM EDTA  
0,2 M Mannitol  
10 % (w/v) Ficoll-400

In ddH<sub>2</sub>O; pH 8,0 einstellen. Lagerbar bei -80 °C. Vor Benutzung 150 µg/ml BSA und 10 µg/ml Neutralrot hinzugeben.

### Vakuolenpuffer

0, 10 mM HEPES  
6 M Betain

In ddH<sub>2</sub>O; pH 7,5. Lagerbar bei -80°C. Vor Benutzung 150 µg/ml BSA, 0,1 µg/ml Pepstatin A und 30 µg/ml PMSF hinzugeben.

## 4.9 Proteinbiochemische Methoden

### 4.9.1 Herstellung von Antikörpern

Die unter Punkt 4.5 beschriebenen pGEX-Expressionsvektoren wurden in den *E.coli*-Stamm BL-21 transformiert und die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach Affinitätsaufreinigung mit Gluthation-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg), wurden die Proben mittels SDS-PAGE (siehe 4.9.2) aufgetrennt und mit Coomassieblau gefärbt. An die Entfärbung anschließend wurden die entsprechenden Proteinbanden ausgeschnitten. Nach Elektroelution der Proteine aus dem Gel und dreimaliger Dialyse wurden die Fusionsproteine bis zur Trocknung eingeeengt und als Antigen zur Antikörperherstellung eingesetzt (Eurogentec, Belgien). Für eine detaillierte Beschreibung sei auf Bubeck et al., 2008 verwiesen.

### 4.9.2 SDS-PAGE

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen erfolgte unter denaturierenden, diskontinuierlichen Bedingungen nach Lämmli (Laemmli, 1970). Es wurden 10 % und 12 % Gele zur Auftrennung benutzt. Die aufzutragenden Proteinproben wurden stets 1:1 mit Probenpuffer versehen und 10 min bei 95 °C denaturiert. Um die molekulare Masse der Proteine bestimmen zu können wurde ein Molekularmassenmarker (*Pageruler Protein ladder SM0671*, Fermentas) mit aufgetragen.

Das Trenngels (siehe Tabelle 4.3) wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 1 h Polymerisierung wurde das Isopropanol mit Wasser abgespült, das Sammelgel (siehe Tabelle 4.3) gegossen und der Kamm zur Formung der Probenaschen zwischen die Glasplatten eingeführt. Nach einer weiteren Stunde Polymerisierung, konnte der Kamm entfernt werden und mit einer Hamilton-Spritze etwa 20 µl Probengemisch pro Tasche geladen werden. Die Elektrophorese wurde in selbst konstruierten Apparaturen bei 40 mA und maximal 180 V durchgeführt. Die Angaben gelten für ein Gel der Größe 200\*100\*2 mm.

**Tabelle 4.3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

Trenngel (%)	10	12	Sammelgel	
ddH <sub>2</sub> O	11,5 ml	10 ml	20 % Saccharose	11,3 ml
3 M Tris, pH 8,8	3,2 ml	3,2 ml	1 M Tris, pH 6,8	1 ml
Protogel	7,5 ml	9 ml	Protogel	2,5 ml
10 % SDS	225 µl	225 µl	10 % SDS	150 µl
TEMED	12,5 µl	12,5 µl	TEMED	30 µl
10 % APS	75 µl	75 µl	10 % APS	50 µl
Endvolumen	22,5 ml	22,5 ml	Endvolumen	15 ml

Zur Analyse wurde das Gel 2-12 h mit Coomassieblau Färbelösung auf einer Laborwippe inkubiert; unspezifisch gefärbte Bereiche wurden im Anschluss mit einer Ethanol/Essigsäure basierten Lösung entfärbt.

#### Probenpuffer Stammlösung

0,1 % (w/v) Bromophenolblau  
 5 mM EDTA  
 200 mM Tris pH 8,8  
 1 M Saccharose  
 In ddH<sub>2</sub>O

Aufbewahrung bei 4 °C.

#### Probenpuffer

900 µl Probenpuffer Stammlösung  
 300 µl 10 % SDS  
 18 µl 1 M DTT

Frisch ansetzen.

#### Phaseolin Extraktionspuffer

1 mM EDTA  
 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
 0,2 % (v/v) Triton-X-100  
 100 mM Tris, pH 7,8  
 200 mM NaCl

**Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)**

10 % (w/v) in ddH<sub>2</sub>O.

**Protogel**

30 % (w/v) Acrylamid  
0,8 % (w/v) Bisacrylamid

In ddH<sub>2</sub>O.

**5x Elektrodenpuffer**

5 g SDS  
30 g Tris  
144 g Glycin

Mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen.

**Coomassieblau Färbelösung**

0,2 % (w/v) Coomassie brillant blue R250  
50 % (v/v) Ethanol  
10 % (v/v) Essigsäure

In ddH<sub>2</sub>O.

**Entfärbelösung**

10 % (v/v) Ethanol  
10 % (v/v) Essigsäure

In ddH<sub>2</sub>O.

**4.9.3 Western-Blot**

Als Western-Blot bezeichnet man den Proteintransfer von SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembran durch Elektrophorese. Whatman-Papier und Nitrocellulosemembran wurden nach Größe des Gels zugeschnitten und die Membran in Blotpuffer equilibriert. Das *semi-dry* Blotting System von Bio-Rad wurde nach Angaben des Herstellers verwendet und der Proteintransfer erfolgte für 2 h bei 200 mA. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran auf einer Laborwippe 5 min bei RT in Ponceau-Lösung inkubiert. Die Ponceau-Lösung wurde wiederverwendet und die Membran kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um Hintergrundfärbung zu entfernen. Zur vollständigen Entfärbung der Membran wurde mit TBS-T auf einer Laborwippe inkubiert.

Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindung während des immunologischen Proteinnachweises wurde die Nitrocellulosemembran 1 h auf der Laborwippe in Blocklösung inkubiert und danach drei Mal 5-10 min in TBS-T gewaschen. Der Primärantikörper wurde in TBS mit 1 % (w/v) BSA und 0,2 % (w/v) NaN<sub>3</sub> bis zur

gewünschten Konzentration verdünnt und konnte so mehrere Wochen aufbewahrt werden. Nun wurde die Membran mindestens 1 h mit dem verdünnten Primärantikörper inkubiert und anschließend erneut drei Mal 5-10 min mit TBS-T gewaschen. Nachdem die Nitrocellulosemembran 1 h mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (in Blocklösung verdünnt) inkubiert worden war, wurde zwei Mal 10 min mit TBS-T und ein Mal mit TBS gewaschen.

Mit dem *AceGlow* Chemilumineszenzsubstrat konnten Protein Signale mittels Western-Blot Dokumentationssystem von Intas detektiert und digital aufgenommen werden. Die Aufnahme und Bearbeitung der Immunoblots erfolgte mit der *ChemoStar Imager* Software (Intas, Göttingen). Nitrocellulosemembranen konnten nach mehreren Waschschritten in TBS-T getrocknet und aufbewahrt werden.

#### Blotpuffer

25 mM Tris  
50 mM Glycin  
10 % (v/v) Methanol  
  
In ddH<sub>2</sub>O.

#### Blocklösung

5 % (w/v) Milchpulver  
1 % (w/v) BSA  
  
In TBS.

#### Ponceau-Lösung

0,2 % (v/v) Ponceau S  
3 % (v/v) Trichloressigsäure  
  
In ddH<sub>2</sub>O.

#### TBS

50 mM Tris/HCl pH 7,4  
0,9 % (w/v) NaCl  
  
In ddH<sub>2</sub>O.

#### TBS-T

1 % (v/v) Tween20 in TBS

### 4.9.4 Verwendete Antikörper

Während der verwendete Sekundärantikörper kommerziell erhältlich ist, mussten die VPS-Primärantikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit den gewonnenen Antigenen hergestellt werden. Hierfür wurde die Firma Eurogentec (Belgien) beauftragt.

### Primärantikörper

Polyklonaler Antikörper gegen das *green fluorescent protein* (GFP) aus *Aequorea victoria*; aus Kaninchen, eingesetzte Verdünnung 1:2500, (Tse et al., 2004).

VPS28, polyklonal aus Kaninchen, Verdünnung 1:2000

VPS22, polyklonal aus Kaninchen, Verdünnung 1:1000–1:2000

VPS2, polyklonal aus Kaninchen, Verdünnung 1:2000

### Sekundärantikörper

Meerrettich Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG, aus Ziege, Verdünnung 1:10000 – 1:15000; Sigma-Aldrich (USA).

## 4.10 Immunologische Untersuchung von Pflanzenzellen

### 4.10.1 BY2 Immunmarkierung nach Paraformaldehyd-Fixierung

Drei Tage alte BY2–Tabaksuspensionskulturen wurden verwendet um mittels Antikörper–Antigen Bindung endogene Lokalisierungsstudien durchzuführen. Um die so erhaltenen Signale in räumliche Relation setzen zu können wurden neben wildtypischen auch stabil transformierte Zelllinien benutzt. Nach Fixierung durch Inkubation in 1,5 % (w/v) Paraformaldehyd ü.N. bei 4 °C wurden die Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS auf eine mindestens 2 h Inkubation mit 0,1 % (w/v) NaBH<sub>4</sub> vorbereitet. Hierbei wird die Zellwand permeabilisiert und durch Reduktion von Aldehydgruppen eine übermäßig starke Autofluoreszenz verhindert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellwand der Suspensionskulturen mit Hilfe von 0,1 % (w/v) Pectolyase Y23/1 und 1 % (w/v) Cellulase enzymatisch verdaut. Mehrmaliges Waschen mit TBS und Blockierung freier Bindungsstellen durch halbstündige Inkubation mit Blocklösung folgten anschließend.

Für die Immunreaktion wurden die Zellen mit 1:50–1:250 verdünnten Primärantikörper ü.N. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem Sekundärantikörper für 3 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem finalen Waschen konnten die markierten Zellen mikroskopisch analysiert werden.

PBS

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
22,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
87 g NaCl

pH 7,4 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen.

## Blocklösung

5 % (w/v) Milchpulver  
1 % (w/v) BSA

In PBS.

Paraformaldehyd,  $\text{NaBH}_4$  sowie Pectolyase Y23/1 und Cellulase wurden in TBS bis zum Erreichen der Endkonzentration verdünnt. Mit Paraformaldehyd fixierte Zellen sind bei 4 °C etwa eine Woche lagerbar.

**4.10.2 BY2 Immunmarkierung nach Glutaraldehyd-Fixierung**

Drei Tage alte Tabak-Suspensionskulturen wurden für 15 min bei RT mit 1 % (w/v) Glutaraldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit MS-Nährmedium (siehe 4.3.3) wurden die Zellwände mittels einstündiger Inkubation in 0,1 % (w/v) Pectinase und 1 % (w/v) Cellulase bei 28 °C enzymatisch aufgeschlossen. Durch ü.N. Inkubation mit 0,1 % (w/v)  $\text{NaBH}_4$  wurde die starke Autofluoreszenz, verursacht durch Glutaraldehyd, maximal reduziert. Mehrmaliges Waschen mit MS-Medium und die Blockierung freier Bindungsstellen durch halbstündige Inkubation mit Blocklösung 1 folgten. Nun wurde der Überstand verworfen und zweimal mit Blocklösung 2 gewaschen, bevor der im gleichen Medium verdünnte Antikörper zur Inkubation dazugegeben wurde. Die Immunreaktion wurde mit dem 1:50-1:250 verdünnten Primärantikörper über Nacht durchgeführt. Im Anschluss folgte dreimaliges Waschen und eine anschließende halbstündige Inkubation mit Blocklösung 2. Die Zellen wurden nun 1 h mit dem etwa 1:200 verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und nach erneutem Waschen mit Blocklösung 2 am CLSM analysiert.

## Blocklösung 1

1 % (w/v) BSA  
In PBS. Steril filtriert. Lagerung bei 4 °C.

## Blocklösung 2

0,25 % (w/v) BSA  
0,25 % (w/v) Gelatine  
0,05 % (v/v) NP-40 (IGEPAL CA-630)  
0,02 % (w/v) Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

In PBS. Steril filtriert. Lagerung bei 4 °C.

Mit Glutaraldehyd fixierte Zellen sind bei 4 °C etwa eine Woche lagerbar.

### 4.10.3 Verwendete Antikörper

#### Primärantikörper

VPS28, polyklonal aus Kaninchen, Verdünnung 1:200

VPS22, polyklonal aus Kaninchen, Verdünnung 1:50–1:200

VPS2, polyklonal aus Kaninchen, Verdünnung 1:100–1:250

#### Sekundärantikörper

Alexa-Fluor<sup>TM</sup> 405 gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen, aus Ziege, Invitrogen, (Karlsruhe), Verdünnung 1:100 -1:200

Alexa-Fluor<sup>TM</sup> 546 gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen, aus Ziege, Invitrogen, (Karlsruhe), Verdünnung 1:100 -1:200

Alexa-Fluor<sup>TM</sup> 568 gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen, aus Ziege, Invitrogen, (USA), Verdünnung 1:100 -1:200

## 4.11 Digitale Bildbearbeitung und Fotografie

Die Zusammenstellung aller Bildtafeln, sowie alle gezeigten Modelle wurden mit dem Programm *Corel Draw 11* (Corel Corporation) angefertigt. Digitalen Modifizierungen (z.B. Helligkeit und Kontrast) wurden mit dem gleichen Programm, bzw. mit dem Programm *Gimp* (GPL) durchgeführt. Tabakpflanzen und *Arabidopsis* Pflanzen wurden mit einer Nikon Digitalkamera und größtmöglicher Auflösung aufgenommen. Agarosegele wurden mit dem Dokumentationssystem *BioDocAnalyze* (Biometra) auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

## 4.12 Mikroskopie

### 4.12.1 Konfokalmikroskopie

Die fixierten BY2-Zellen zur Immunfluoreszenz–Untersuchung wurden auf einen Objektträger pipettiert und konnten nach Auflegen eines Deckglases untersucht werden. Transformierte Tabakprotoplasten (siehe 4.8.2) wurden 5 min bei 100  $g_{max}$  im ausschwingenden Rotor zentrifugiert und anschließend durch Absaugen des Mediums, auf ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml konzentriert. Maximal 150  $\mu$ l der Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben der zuvor, durch Abkleben eines 15x10 mm großen Rechteckes mit Klebeband als Abstandshalter zum Schutz der Protoplasten, präpariert worden war.

Protoplasten bzw. BY2-Zellen für Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe nach Transformanten durchsucht und die Aufnahmen anschließend mit Lasern verschiedener Wellenlängen (siehe Tabelle 4.4) mit Bedingungen gemäß der zu untersuchenden Moleküle angefertigt. Dazu wurde ein *Lamba-Scan* über das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes von 400-750 nm durchgeführt und so der optimale Fluoreszenzbereich für die jeweiligen Proteine bestimmt.

**Tabelle 4.4: CLSM Bedingungen für verschiedene fluoreszierende Proteine**

	Lasertyp	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionsmaxima [nm]	Metadetektor (Emission) [nm]
GFP	Argon	488	507	496 – 518
YFP	Argon	514	529	529 – 550
RFP	Helium/Neon	543	603	593 – 636
Alexa-Fluor® 488	Argon	488	520	496 - 529
Alexa-Fluor® 546	Helium/Neon	546	572	561 - 614
Alexa-Fluor® 568	Argon	568	603	593 - 636

Es wurden der Anregungswellenlänge entsprechende Hauptfarbteiler (HFT) benutzt. Für Koexpressionsstudien wurde der kombinierte HFT 488/543 für GFP/RFP oder GFP/YFP genutzt. Fluorophore wurden abwechselnd mit dem *multi-tracking* Modus des Mikroskops angeregt. Die *Pinholes* wurden mit einer *Airy Unit* für jede Wellenlänge angepasst (102 µm, 108 µm, 115 µm, 121 µm, 131 µm, 138 µm). Die Leistung der Laser wurde bei allen Proben eines Experiments auf gleichem Niveau belassen.

Für Aufnahmen von Protoplasten aus *N. tabacum* sowie Aufnahmen der Immunfluoreszenz von BY2-Zellen wurde ein C-apochromatische 63/1,2 Wasser korrigiertes Objektiv benutzt. Für die Behandlung mit Wortmannin wurden Proben 1 h vor der Analyse mit 10-30 µM WM (gelöst in DMSO) inkubiert. Für die statistischen Erhebungen zur Kollokalisierung wurden transiente Genexpressionsstudien als Blindexperiment durchgeführt und pro Versuchsansatz immer n>15 Zellen untersucht. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Zur digitalen Nachbearbeitung der Bildaufnahmen wurden die Programme *Zeiss LSM Image Browser* (Zeiss) sowie *CorelDraw 11* (Corel Corporation) verwendet.

## 4.12.2 Verwendete Markerproteine- und Linien

### Plasmide

YFP-SYP61 (Uemura et al., 2004)  
GFP-BP80 (daSilva et al., 2005)  
Man1-GFP (Nebenführ et al., 1999)  
Man1-RFP (Nebenführ et al., 1999)  
ARA6-mRFP (Ueda et al., 2004)  
mRFP-ARA7 (Ueda et al., 2004)  
mRFP-VSR2 (Miao et al., 2006)  
aleurain-GFP (Humair et al., 2001)  
GFP-sporamin (daSilva et al., 2005)

### Stabil transformierte BY2-Zellen

GFP-BP80 (Tse et al., 2004)  
GONST1-YFP (Tse et al., 2004)

## 4.12.3 Elektronenmikroskopie

Zur Immunmarkierung wurden die Wurzelspitzen fünf Tage alter *Arabidopsis* Keimlinge abgetrennt und auf Trägerplättchen überführt. Nun wurden die Spitzen erst mit einer Hochdruckgefrieranlage gefroren und anschließend mittels einer Gefriersubstitutionseinheit das Wasser durch trockenes Aceton mit 0,1 % (v/v) Uranylacetat zur Kontrastgebung biologischer Membranen ersetzt. Dieser Prozess dauert etwa drei Tage und ist von einer schrittweisen Anhebung der Temperatur von -85 °C auf -35 °C begleitet. Dann wurden die Zellen mit dem Harz Lowicryl HM20 infiltriert und eingebettet. Nach 48 h Polymerisierung bei RT unter UV-Licht konnten Ultradünnschnitte hergestellt werden. Diese wurden nun mit den entsprechenden Primärantikörpern im Verhältnis 1:25-1:200 inkubiert. Nach Waschen mit TBS und 1 % (w/v) BSA erfolgte die Inkubation mit dem goldgekoppelten Sekundärantikörper (1:50) bevor die Ultradünnschnitte nach erneutem Waschen durch wässrige Uranylacetat bzw. Bleicitrat-Lösung abschließend nachkontrastiert wurden. Die elektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur von Zellen erfolgte an einem Phillips CM10 TEM bei 80 kV oder dem JEOL JEM1400 TEM bei ebenfalls 80 kV. Aufnahmen wurden mit der TVIPS Digitalkamera FastScan F214 angefertigt.

### 4.13 Datenbanken sowie Sequenzvergleich- und Analyse

Die Sequenzen aller zu untersuchenden pflanzlichen Proteine wurden anhand der *Arabidopsis* Datenbank *The Arabidopsis Information Resource* – TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) und der Datenbank für Membranproteine der Universität zu Köln - Aramemnon (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>) ermittelt. Für organismenübergreifende Datenbankrecherchen wurde die Homepage *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt. Sequenzabgleiche wurden mit dem Programm *Blast* (Altschul et al., 1990) durchgeführt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alle Sequenzvergleiche, sowohl auf Nukleotidebene als auch Proteinebene, wurden mit dem Programm *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) ausgeführt.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., and Ram, S.J.** (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Alam, S.L., Langelier, C., Whitby, F.G., Koirala, S., Robinson, H., Hill, C.P., and Sundquist, W.I.** (2006). Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT-II EAP45 GLUE domain. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1029-1030.
- Altenbach, D., and Robatzek, S.** (2007). Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1031-1039.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amerik, A.Y., Li, S.J., and Hochstrasser, M.** (2000). Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **381**, 981-992.
- Babst, M.** (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9.
- 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.
- Barth, M., and Holstein, S.E.** (2004). Identification and functional characterization of Arabidopsis AP180, a binding partner of plant alphaC-adaptin. *J Cell Sci* **117**, 2051-2062.
- Bishop, N., and Woodman, P.** (2001). TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem* **276**, 11735-11742.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C.** (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* **15**, 441-447.
- Bowers, K., and Stevens, T.H.** (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 438-454.
- Bowers, K., Lottridge, J., Helliwell, S.B., Goldthwaite, L.M., Luzio, J.P., and Stevens, T.H.** (2004). Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* **5**, 194-210.
- Brandizzi, F., Saint-Jore, C., Moore, I., and Hawes, C.** (2003a). The relationship between endomembranes and the plant cytoskeleton. *Cell Biol Int* **27**, 177-179.
- Brandizzi, F., Snapp, E.L., Roberts, A.G., Lippincott-Schwartz, J., and Hawes, C.** (2002a). 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**, 1293-1309.

- Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.M., and Paris, N.** (2002b). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* **14**, 1077-1092.
- Brandizzi, F., Hanton, S., DaSilva, L.L., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J., and Hawes, C.** (2003b). ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J* **34**, 269-281.
- Bubeck, J., Scheuring, D., Hummel, E., Langhans, M., Viotti, C., Foresti, O., Denecke, J., Banfield, D.K., and Robinson, D.G.** (2008). The syntaxins SYP31 and SYP81 control ER-Golgi trafficking in the plant secretory pathway. *Traffic* **9**, 1629-1652.
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W., and Vierstra, R.D.** (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* **139**, 921-939.
- Casadaban, M.J., and Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**, 179-207.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A.** (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.
- Chen, H., and De Camilli, P.** (2005). The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2766-2771.
- Chow, C.M., Neto, H., Foucart, C., and Moore, I.** (2008). Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-golgi endosomal membrane domain in *Arabidopsis* that contributes substantially to the cell plate. *Plant Cell* **20**, 101-123.
- Chrispeels, M.J.** (1991). Sorting of Proteins in The Secretory System. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 21-53.
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S., and Emr, S.D.** (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol* **175**, 815-823.
- Clague, M.J.** (2002). Membrane transport: a coat for ubiquitin. *Curr Biol* **12**, R529-531.
- Cram, W.J.** (1980). Pinocytosis in plants. *New Phytol* **84**, 1-17.
- Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L.E., Ashford, D.A., and Denecke, J.** (1999). Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell* **11**, 2233-2248.
- Crowell, E.F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y.D., Schumacher, K., Gonneau, M., Hofte, H., and Vernhettes, S.** (2009). Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 1141-1154.
- daSilva, L.L., Taylor, J.P., Hadlington, J.L., Hanton, S.L., Snowden, C.J., Fox, S.J., Foresti, O., Brandizzi, F., and Denecke, J.** (2005). Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell* **17**, 132-148.

- Denecke, J., De Rycke, R., and Botterman, J.** (1992). Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *Embo J* **11**, 2345-2355.
- Denecke, J., Carlsson, L.E., Vidal, S., Hoglund, A.S., Ek, B., van Zeijl, M.J., Sinjorgo, K.M., and Palva, E.T.** (1995). The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell* **7**, 391-406.
- Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y.D., and Schumacher, K.** (2006). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 715-730.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.D., and Friml, J.** (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**, 520-527.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T.** (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**, 857-902.
- Doyotte, A., Russell, M.R., Hopkins, C.R., and Woodman, P.G.** (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* **118**, 3003-3017.
- Dupre, S., and Haguenaer-Tsapis, R.** (2001). Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol* **21**, 4482-4494.
- Dupre, S., Urban-Grimal, D., and Haguenaer-Tsapis, R.** (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 89-111.
- Dupree, P., and Sherrier, D.J.** (1998). The plant Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 259-270.
- Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T.A., Hurley, J.H., and Lippincott-Schwartz, J.** (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4846-4851.
- Finley, D., Sadis, S., Monia, B.P., Boucher, P., Ecker, D.J., Croke, S.T., and Chau, V.** (1994). Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* **14**, 5501-5509.
- Foresti, O., and Denecke, J.** (2008). Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic* **9**, 1599-1612.
- Foresti, O., Gershlick, D.C., Bottanelli, F., Hummel, E., Hawes, C., and Denecke, J.** (2010). A recycling-defective vacuolar sorting receptor reveals an intermediate compartment situated between prevacuoles and vacuoles in tobacco. *Plant Cell* **22**, 3992-4008.
- Galan, J.M., and Haguenaer-Tsapis, R.** (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* **16**, 5847-5854.
- Geetha, T., Jiang, J., and Wooten, M.W.** (2005). Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* **20**, 301-312.

- Geldner, N., Hyman, D.L., Wang, X., Schumacher, K., and Chory, J.** (2007). Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* **21**, 1598-1602.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., and Jurgens, G.** (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Gorden, P., Carpentier, J.L., Moule, M.L., Yip, C.C., and Orci, L.** (1982). Direct demonstration of insulin receptor internalization. A quantitative electron microscopic study of covalently bound <sup>125</sup>I-photoreactive insulin incubated with isolated hepatocytes. *Diabetes* **31**, 659-662.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H.** (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-323.
- Haas, T.J., Sliwinski, M.K., Martinez, D.E., Preuss, M., Ebine, K., Ueda, T., Nielsen, E., Odorizzi, G., and Otegui, M.S.** (2007). The Arabidopsis AAA ATPase SKD1 is involved in multivesicular endosome function and interacts with its positive regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5. *Plant Cell* **19**, 1295-1312.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I.** (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* **5**, 461-466.
- Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E.** (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol* **180**, 389-402.
- Happel, N., Honing, S., Neuhaus, J.M., Paris, N., Robinson, D.G., and Holstein, S.E.** (2004). Arabidopsis mu A-adaptin interacts with the tyrosine motif of the vacuolar sorting receptor VSR-PS1. *Plant J* **37**, 678-693.
- Hara-Nishimura, I.I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., and Nishimura, M.** (1998). Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**, 825-836.
- Hartl, F.U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579.
- Hasdemir, B., Murphy, J.E., Cottrell, G.S., and Bunnett, N.W.** (2009). Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2. *J Biol Chem* **284**, 28453-28466.
- Haywood, V., Kragler, F., and Lucas, W.J.** (2002). Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**, S303-325.
- Hebert, D.N., Foellmer, B., and Helenius, A.** (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425-433.
- Hicke, L.** (2001). A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527-530.
- Hicke, L., and Dunn, R.** (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-172.

- Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A.S., Kim, J., Prag, G., Emr, S.D., and Hurley, J.H.** (2004). Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* **431**, 221-225.
- Hillmer, S., Depta, H., and Robinson, D.G.** (1986). Confirmation of endocytosis in higher-plant protoplasts using lectin-gold conjugates. *Eur J Cell Biol* **41**, 142-149.
- Hillmer, S., Freundt, H., and Robinson, D.G.** (1988). The partially coated reticulum and its relationship to the Golgi apparatus in higher plant cells. *Eur J Cell Biol* **47**, 206-212.
- Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Hinz, G.** (2001). Vacuolar storage proteins are sorted in the cis-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J Cell Biol* **152**, 41-50.
- Hinz, G., Hillmer, S., Baumer, M., and Hohl, I.** (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., Colanesi, S., Hillmer, S., Rogers, J.C., and Robinson, D.G.** (2007). Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic* **8**, 1452-1464.
- Hoh, B., Hinz, G., Jeong, B.K., and Robinson, D.G.** (1995). Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J Cell Sci* **108 ( Pt 1)**, 299-310.
- Holstein, S.E.** (2002). Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* **3**, 614-620.
- Holstein, S.E., and Oliviusson, P.** (2005). Sequence analysis of Arabidopsis thaliana E/ANTH-domain-containing proteins: membrane tethers of the clathrin-dependent vesicle budding machinery. *Protoplasma* **226**, 13-21.
- Holwerda, B.C., Padgett, H.S., and Rogers, J.C.** (1992). Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell* **4**, 307-318.
- Hong, W.** (2005). SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 493-517.
- Humair, D., Hernandez Felipe, D., Neuhaus, J.M., and Paris, N.** (2001). Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* **13**, 781-792.
- Hurley, J.H.** (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 4-11.
- Hurley, J.H., and Emr, S.D.** (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277-298.
- Hurley, J.H., and Yang, D.** (2008). MIT domainia. *Dev Cell* **14**, 6-8.
- Hurley, J.H., and Ren, X.** (2009). The circuitry of cargo flux in the ESCRT pathway. *J Cell Biol* **185**, 185-187.
- Hurley, J.H., and Hanson, P.I.** (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 556-566.

- Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G.** (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* **399**, 361-372.
- Hwang, Y.S., Bethke, P.C., Cheong, Y.H., Chang, H.S., Zhu, T., and Jones, R.L.** (2005). A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function. *Plant Physiol* **138**, 1347-1358.
- Ikeda, F., and Dikic, I.** (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep* **9**, 536-542.
- Isono, E., Katsiarimpa, A., Muller, I.K., Anzenberger, F., Stierhof, Y.D., Geldner, N., Chory, J., and Schwechheimer, C.** (2010). The deubiquitinating enzyme AMSH3 is required for intracellular trafficking and vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 1826-1837.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., and Peterson, P.A.** (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **121**, 317-333.
- Jahn, R., and Scheller, R.H.** (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643.
- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C., and Gaude, T.** (2008). Evidence for a sorting endosome in *Arabidopsis* root cells. *Plant J* **53**, 237-247.
- Jauh, G.Y., Phillips, T.E., and Rogers, J.C.** (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882.
- Kang, B.H., Nielsen, E., Preuss, M.L., Mastronarde, D., and Staehelin, L.A.** (2011). Electron tomography of RabA4b- and PI-4Kbeta1-labeled trans Golgi network compartments in *Arabidopsis*. *Traffic* **12**, 313-329.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D.** (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* **162**, 413-423.
- Kim, H.T., Kim, K.P., Lledias, F., Kisselev, A.F., Scaglione, K.M., Skowyra, D., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L.** (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* **282**, 17375-17386.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727.
- Kirchhausen, T., and Harrison, S.C.** (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **23**, 755-761.
- Kirsch, T., Paris, N., Butler, J.M., Beevers, L., and Rogers, J.C.** (1994). Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3403-3407.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M., and Friml, J.** (2006). Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **18**, 3171-3181.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wisniewska, J., Paciorek, T., Benkova, E., and Friml, J.** (2008). ARF GEF-dependent

- transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* **18**, 526-531.
- Komada, M.** (2008). Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. *Curr Drug Discov Technol* **5**, 78-84.
- Kostelansky, M.S., Sun, J., Lee, S., Kim, J., Ghirlando, R., Hierro, A., Emr, S.D., and Hurley, J.H.** (2006). Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex. *Cell* **125**, 113-126.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, S.K., Siu, C.L., Hillmer, S., Jang, S., An, G., Robinson, D.G., and Jiang, L.** (2007). 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.
- Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H.G., Svergun, D.I., and Weissenhorn, W.** (2008). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J Mol Biol* **378**, 818-827.
- Lavy, M., and Yalovsky, S.** (2006). Association of Arabidopsis type-II ROPs with the plasma membrane requires a conserved C-terminal sequence motif and a proximal polybasic domain. *Plant J* **46**, 934-947.
- Leung, K.F., Dacks, J.B., and Field, M.C.** (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* **9**, 1698-1716.
- Lewis, M.J., and Pelham, H.R.** (1996). SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* **85**, 205-215.
- Lin, Y., Kimpler, L.A., Naismith, T.V., Lauer, J.M., and Hanson, P.I.** (2005). Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J Biol Chem* **280**, 12799-12809.
- Linder, M.E., and Deschenes, R.J.** (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 74-84.
- Lipka, V., Kwon, C., and Panstruga, R.** (2007). SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 147-174.
- Lucas, W.J., and Wolf, S.** (1993). Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol* **3**, 308-315.
- Luhtala, N., and Odorizzi, G.** (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* **166**, 717-729.
- Lupashin, V., and Sztul, E.** (2005). Golgi tethering factors. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 325-339.
- Madshus, I.H.** (2006). Ubiquitin binding in endocytosis--how tight should it be and where does it happen? *Traffic* **7**, 258-261.
- Marty, F.** (1999). Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-600.

- Matheson, L.A., Hanton, S.L., and Brandizzi, F.** (2006). Traffic between the plant endoplasmic reticulum and Golgi apparatus: to the Golgi and beyond. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 601-609.
- Matsuoka, K., and Neuhaus, J.** (1999). Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* **50**, 165-174.
- Matsuoka, K., Matsumoto, S., Hattori, T., Machida, Y., and Nakamura, K.** (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**, 19750-19757.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E.** (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121-132.
- Meyer, D.I., Krause, E., and Dobberstein, B.** (1982). Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature* **297**, 647-650.
- Miao, Y., Yan, P.K., Kim, H., Hwang, I., and Jiang, L.** (2006). Localization of green fluorescent protein fusions with the seven Arabidopsis vacuolar sorting receptors to prevacuolar compartments in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **142**, 945-962.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Munro, S., and Pelham, H.R.** (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 Pelham, H.R.** (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Murk, J.L., Humbel, B.M., Ziese, U., Griffith, J.M., Posthuma, G., Slot, J.W., Koster, A.J., Verkleij, A.J., Geuze, H.J., and Kleijmeer, M.J.** (2003). Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13332-13337.
- Nebenfuehr, A., and Staehelin, L.A.** (2001). Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 160-167.
- Nebenfuehr, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A.** (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol* **121**, 1127-1142.
- Neuhaus, J.M., and Rogers, J.C.** (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* **38**, 127-144.
- Nickerson, D.P., Russell, M.R., and Odorizzi, G.** (2007). A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep* **8**, 644-650.
- Nickerson, D.P., West, M., Henry, R., and Odorizzi, G.** (2010). Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles. *Mol Biol Cell* **21**, 1023-1032.

- Niemes, S., Labs, M., Scheuring, D., Krueger, F., Langhans, M., Jesenofsky, B., Robinson, D.G., and Pimpl, P.** (2010a). Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. *Plant J* **62**, 601-614.
- Niemes, S., Langhans, M., Viotti, C., Scheuring, D., San Wan Yan, M., Jiang, L., Hillmer, S., Robinson, D.G., and Pimpl, P.** (2010b). Retromer recycles vacuolar sorting receptors from the trans-Golgi network. *Plant J* **61**, 107-121.
- Nikko, E., and Andre, B.** (2007). Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic* **8**, 566-581.
- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P.A.** (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**, 707-718.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D., and Williams, R.L.** (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* **449**, 735-739.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D.** (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* **95**, 847-858.
- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y.C., Jiang, L., and Robinson, D.G.** (2006). Plant Retromer: Identification, Localization to the Prevacuolar Compartment and Microvesicles, and Preliminary Evidence for an Interaction with Vacuolar Sorting Receptors. *Plant Cell* **18**, 1239-1252.
- Otegui, M.S., and Spitzer, C.** (2008). Endosomal functions in plants. *Traffic* **9**, 1589-1598.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C.** (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Park, J.H., Oufattole, M., and Rogers, J.C.** (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**, 913-918.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-926.
- Pesacreta, T.C., and Lucas, W.J.** (1984). Plasma membrane coat and a coated vesicle-associated reticulum of membranes: their structure and possible interrelationship in *Chara corallina*. *J Cell Biol* **98**, 1537-1545.
- Pfeffer, S.R., and Rothman, J.E.** (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem* **56**, 829-852.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Denecke, J.** (2001). Secretory bulk flow of soluble proteins is COPII dependent. *Plant Cell* **13**, 2005-2020.

- Pickart, C.M., and Cohen, R.E.** (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 177-187.
- Pickart, C.M., and Eddins, M.J.** (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72.
- Pimpl, P., Hanton, S.L., Taylor, J.P., Pinto-daSilva, L.L., and Denecke, J.** (2003). The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell* **15**, 1242-1256.
- Pineda-Molina, E., Belrhali, H., Piefer, A.J., Akula, I., Bates, P., and Weissenhorn, W.** (2006). The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic* **7**, 1007-1016.
- Piper, R.C., and Katzmann, D.J.** (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 519-547.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., and Spang, A.** (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508.
- Raiborg, C., and Stenmark, H.** (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445-452.
- Raiborg, C., Wesche, J., Malerod, L., and Stenmark, H.** (2006). Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J Cell Sci* **119**, 2414-2424.
- Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E., and Stenmark, H.** (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo J* **20**, 5008-5021.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., and Stevens, T.H.** (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-1402.
- Reichardt, I., Stierhof, Y.D., Mayer, U., Richter, S., Schwarz, H., Schumacher, K., and Jurgens, G.** (2007). Plant cytokinesis requires de novo secretory trafficking but not endocytosis. *Curr Biol* **17**, 2047-2053.
- Richter, C., West, M., and Odorizzi, G.** (2007). Dual mechanisms specify Doa4-mediated deubiquitination at multivesicular bodies. *Embo J* **26**, 2454-2464.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M.** (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749.
- Ritzenthaler, C., Nebenfuhr, A., Movafeghi, A., Stussi-Graud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L.A., and Robinson, D.G.** (2002). Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* **14**, 237-261.
- Robinson, D., and Hillmer, S.** (1990). Endocytosis in plants. *Physiol Plant* **79**, 96-104.
- Robinson, D.G., and Hinz, G.** (1997). Vacuole biogenesis and protein transport to the plant vacuole: a comparison with the yeast vacuole and the mammalian lysosome. *Protoplasma* **197**, 1-25.

- Robinson, D.G., and Hinz, G.** (1999). Golgi-mediated transport of seed storage proteins. *Seed Sci. Res.* **9**, 267-283.
- Robinson, D.G., Hinz, G., and Holstein, S.E.H.** (1998a). The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* **38**, 49-76.
- Robinson, D.G., Oliviusson, P., and Hinz, G.** (2005). Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic* **6**, 615-625.
- Robinson, D.G., Jiang, L., and Schumacher, K.** (2008a). The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiol* **147**, 1482-1492.
- Robinson, D.G., Hoh, B., Hinz, G., and Jeong, B.K.** (1995). One Vacuole or 2 Vacuoles - Do Protein Storage Vacuoles Arise De-Novo During Pea Cotyledon Development. *J. Plant Physiol.* **145**, 654-664.
- Robinson, D.G., Baumer, M., Hinz, G., and Hohl, I.** (1998b). Vesicle transfer of storage proteins to the vacuole: The role of the Golgi apparatus and multivesicular bodies. *J. Plant Physiol.* **152**, 659-667.
- Robinson, D.G., Scheuring, D., Naramoto, S., and Friml, J.** (2011). ARF1 Localizes to the Golgi and the Trans-Golgi Network. *Plant Cell* **23**, 846-849.
- Robinson, D.G., Langhans, M., Saint-Jore-Dupas, C., and Hawes, C.** (2008b). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci* **13**, 405-408.
- 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.
- Rojo, E., and Denecke, J.** (2008). What is moving in the secretory pathway of plants? *Plant Physiol* **147**, 1493-1503.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P.** (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* **242**, 84-89.
- Roth, A.F., and Davis, N.G.** (2000). Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. *J Biol Chem* **275**, 8143-8153.
- Rothman, J.E., and Wieland, F.T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.
- Rotin, D., Staub, O., and Haguener-Tsapis, R.** (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**, 1-17.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbe, S.** (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J Biol Chem* **281**, 12618-12624.
- Rue, S.M., Mattei, S., Saksena, S., and Emr, S.D.** (2008). Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting. *Mol Biol Cell* **19**, 475-484.
- Russinova, E., and de Vries, S.** (2006). Receptor-Mediated Endocytosis in Plants. *In* J Samaj, ed, *Plant Endocytosis*, Vol 1. Springer, Heidelberg, 103115.

- Rutherford, S., and Moore, I.** (2002). The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 518-528.
- Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G.J., and Klumperman, J.** (2002). Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell* **13**, 1313-1328.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D.** (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* **136**, 97-109.
- Sambrook, J., and Russel, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., and Bell, S.D.** (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* **322**, 1710-1713.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Satiat-Jeunemaitre, B., and Hawes, C.** (1992). Redistribution of a Golgi glycoprotein in plant cells treated with Brefeldin A. *J Cell Sci* **103**, 1153-1166.
- Schekman, R., and Orci, L.** (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Schellmann, S., and Pimpl, P.** (2009). Coats of endosomal protein sorting: retromer and ESCRT. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 670-676.
- Scheuring, D., Viotti, C., Bubeck, J., Sturm, S., Krueger, F., Robinson, D.G., Pimpl, P., and Schumacher, K.** Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi-Network/Early Endosome in Arabidopsis. Manuskript eingereicht bei Plant Cell.
- Shahriari, M., Richter, K., Keshavaiah, C., Sabovljevic, A., Huelskamp, M., and Schellmann, S.** (2011). The Arabidopsis ESCRT protein-protein interaction network. *Plant Mol Biol* doi: **10.1007/s11103-011-9770-4**.
- Shahriari, M., Keshavaiah, C., Scheuring, D., Sabovljevic, A., Pimpl, P., Hausler, R.E., Hulskamp, M., and Schellmann, S.** (2010). The AAA-type ATPase AtSKD1 contributes to vacuolar maintenance of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **64**, 71-85.
- Shelness, G.S., and Blobel, G.** (1990). Two subunits of the canine signal peptidase complex are homologous to yeast SEC11 protein. *J Biol Chem* **265**, 9512-9519.
- Shih, S.C., Sloper-Mould, K.E., and Hicke, L.** (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* **19**, 187-198.
- Shim, S., Kimpler, L.A., and Hanson, P.I.** (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* **8**, 1068-1079.
- Shimada, T., Watanabe, E., Tamura, K., Hayashi, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2002). A vacuolar sorting receptor PV72 on the membrane of

- vesicles that accumulate precursors of seed storage proteins (PAC vesicles). *Plant Cell Physiol* **43**, 1086-1095.
- Shivas, J.M., Morrison, H.A., Bilder, D., and Skop, A.R.** (2010). Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends Cell Biol* **20**, 445-452.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., and Stenmark, H.** (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem* **280**, 19600-19606.
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R.R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J.E., and Sollner, T.** (1994). A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* **78**, 937-948.
- Sorek, N., Bloch, D., and Yalovsky, S.** (2009). Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 714-720.
- Spitzer, C., Reyes, F.C., Buono, R., Sliwinski, M.K., Haas, T.J., and Otegui, M.S.** (2009). The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in *Arabidopsis* and are required for plant development. *Plant Cell* **21**, 749-766.
- Spitzer, C., Schellmann, S., Sabovljevic, A., Shahriari, M., Keshavaiah, C., Bechtold, N., Herzog, M., Muller, S., Hanisch, F.G., and Hulskamp, M.** (2006). The *Arabidopsis* elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development* **133**, 4679-4689.
- Springael, J.Y., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., and Andre, B.** (1999). NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J Cell Sci* **112 ( Pt 9)**, 1375-1383.
- Staelin, L.A.** (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**, 1151-1165.
- Stringer, D.K., and Piper, R.C.** (2011). A single ubiquitin is sufficient for cargo protein entry into MVBs in the absence of ESCRT ubiquitination. *J Cell Biol* **192**, 229-242.
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M.** (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 2583-2594.
- Swanson, S.J., Bethke, P.C., and Jones, R.L.** (1998). Barley aleurone cells contain two types of vacuoles. Characterization Of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* **10**, 685-698.
- Tanchak, M.A., and Fowke, L.C.** (1987). The morphology of multivesicular bodies in soybean protoplasts and their role in endocytosis. *Protoplasma* **138**, 173-182.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D.** (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* **15**, 578-589.
- Teo, H., Gill, D.J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Vallis, Y., Emr, S.D., and Williams, R.L.** (2006). ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain

- structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* **125**, 99-111.
- Tse, Y.C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S.W., Robinson, D.G., and Jiang, L.** (2004). Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* **16**, 672-693.
- Ueda, T., Uemura, T., Sato, M.H., and Nakano, A.** (2004). Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *Plant J* **40**, 783-789.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H.** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* **29**, 49-65.
- van Weering, J.R., Verkade, P., and Cullen, P.J.** (2010). SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 371-380.
- Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y.D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., Jurgens, G., de Vries, S.C., Robinson, D.G., and Schumacher, K.** (2010). Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* **22**, 1344-1357.
- Vitale, A., and Denecke, J.** (1999). The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**, 615-628.
- Vitale, A., Bielli, A., and Ceriotti, A.** (1995). The Binding Protein Associates with Monomeric Phaseolin. *Plant Physiol* **107**, 1411-1418.
- Walter, P., and Blobel, G.** (1981a). 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**, 551-556.
- Walter, P., and Blobel, G.** (1981b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**, 557-561.
- Walter, P., Ibrahimi, I., and Blobel, G.** (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**, 545-550.
- Whyte, J.R., and Munro, S.** (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci* **115**, 2627-2637.
- Williams, R.L., and Urbe, S.** (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 355-368.
- Wink, M.** (1993). The plant vacuole: A multifunctional compartment. *J. Exp. Botany* **44**, 231-246.
- Winter, V., and Hauser, M.T.** (2006). Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci* **11**, 115-123.

- Wollert, T., and Hurley, J.H.** (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864-869.
- Wollert, T., Yang, D., Ren, X., Lee, H.H., Im, Y.J., and Hurley, J.H.** (2009). The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* **122**, 2163-2166.
- Xu, P., and Peng, J.** (2008). Characterization of polyubiquitin chain structure by middle-down mass spectrometry. *Anal Chem* **80**, 3438-3444.
- Yoshimori, T., Yamagata, F., Yamamoto, A., Mizushima, N., Kabeya, Y., Nara, A., Miwako, I., Ohashi, M., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y.** (2000). The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **11**, 747-763.
- Zouhar, J., and Rojo, E.** (2009). Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Curr Opin Plant Biol* **12**, 677-684.

## 6 Symbole und Abkürzungen

$\alpha$	alpha
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
Amy	$\alpha$ -Amylase
AP	Alkalische Phosphatase
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BFA	Brefeldin A
Box	[GC-CG]-Box
Bp	Basenpaare ( <i>base pairs</i> )
BSA	Rinderserumalbumin
CCVs	<i>clathrin-coated vesicles</i>
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
COP	Hüllprotein ( <i>coat protein</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1-4-Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
DV	<i>dense vesicle</i>
E	Extinktion
EE	<i>early endosome</i> , frühes Endosom
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
et al.	<i>et alteri</i>
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
$g_{\max}$	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
Isopropanol	2-Propanol
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LE	<i>late endosome</i> , spätes Endosom
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
min	Minute
MVB	<i>multivesicular body</i> , multivesikulärer Körper
NaCl	Natriumchlorid
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat

---

PM	Plasmamembran
PSV	Proteinspeichervakuole
PVC	Prävakuoläres Kompartiment
RE	<i>recycling endosome</i> , Recycling Endosom
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROP	<i>Rho-related GTPase from plants</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP	Restriktionspuffer
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Sekretionsindex
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TE	N-Tris-methyl-2-aminoethan-sulfonsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i>
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzymeinheit
Ub	Ubiquitin
UIM	Ubiquitin interagierendes Motiv
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
VSR	vakuolärer Sortierungsrezeptor
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht zu Volumen
wt	Wildtyp
YFP	gelb ( <i>yellow</i> ) fluoreszierendes Protein

**Die Symbole A, T, G und C stehen für die Basen der DNA:**

A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin

**Symbole für Aminosäuren (*single-letter code*):**

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