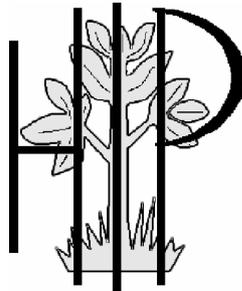


Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften



**Biochemische und Zellbiologische
Charakterisierung des
Retromer-vermittelten Proteintransports
in Pflanzen**

Oliver Heinzerling

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Oliver Heinzerling
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

**Biochemische und Zellbiologische
Charakterisierung des
Retromer-vermittelten Proteintransports
in Pflanzen**

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

Würde ich Vollkommenheit anstreben,
würde mein Buch nie fertig

Tai T'ung (13. Jahrhundert)



Gewidmet Papa und Anni

Die Bäume

**Wir sitzen nicht auf Thronen.
Uns schmeichelt nur der Wind.
Wir haben dennoch Kronen,
die schöner als eure sind.**

Erich Kästner

Danksagung

Mein erster Dank geht an meine Eltern. Sie standen meinen Interessen immer offen gegenüber, unterstützten mich vorbehaltlos und ermöglichten mir dadurch nicht zuletzt mein Studium.

Herrn Prof. Dr. David G. Robinson danke ich sehr herzlich für die aktuelle und interessante Themenstellung und seine engagierte und motivierende Betreuung dieser Arbeit, die auch über das rein Wissenschaftliche hinaus ging. Ebenso danke ich ihm dafür, dass er mir den Aufenthalt im Labor von Dr. Jürgen Denecke in Leeds ermöglichte. Hierfür auch ein Dank an die Europäische Kommission für die Gewährung eines Marie-Curie Fellowship.

Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch danke ich für die Übernahme des Koreferats. Einen großen Dank möchte ich hier Herrn Dr. Peter Oliviusson zukommen lassen. Seine Unterstützung half mir wesentlich dieses für mich neue Feld zu erschließen. Herrn Dr. Stefan Hillmer danke ich für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie, Herrn Dr. Giselbert Hinz bei den zellbiologischen Fragestellungen, sowie weit darüber hinausgehend für viele begeisternde und anregende Diskussionen auch jenseits der reinen Forschungsinteressen.

Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Meike Barth, Heinrich Bürgers, Eva Besemfelder, Steffi Gold, Frau Spelger, Yaodong Yang, Andrea Olbrich, sowie den später hinzugekommenen Kollegen Julia Bubeck, Dr. Markus Langhans, Dr. Peter Pimpl und Frau Larenz danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

An Dr. Liwen Jiang aus Hong Kong geht mein Dank für die großartige Zusammenarbeit bei der Fluoreszenzmikroskopie. Dr. Jürgen Denecke, Luis daSilva und Chris Snowden aus Leeds danke ich für die Hilfe beim Amyassay und die kollegiale Aufnahme in ihrem Labor.

Ein Dankeschön möchte ich auch Herrn Böttger aus der Feinmechanikwerkstatt und Herrn Greulich aus der Elektrowerkstatt, sowie Herrn Wolfbeiß aus der Glasbläserei aussprechen. Ohne ihren vielfältigen, schnellen und immer sehr freundlichen Einsatz bei Reparaturen und Spezialanfertigungen hätten viele Experimente nicht durchgeführt werden können.

Danke an alle meine Freunde und Kollegen, die mich unterstützt und mir auf vielfältige Weise geholfen haben. Besonders Katharina Stengel, Holger Bauer, Silvia Neumann und Malik Lutzmann haben mir immer wieder nicht nur fachliche Inspiration, sondern auch praktische Hilfe geboten. Für die intensive Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit möchte ich Herrn Dr. Giselbert Hinz und Herrn Dr. Peter Pimpl danken, sowie auch Herrn Dr. Gunter Braun, Herrn Dr. Stefan Hillmer und Herrn Dr. Malik Lutzmann für die Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Herrn Dr. Rupert Schreiner danke ich für seine beharrliche und überzeugende Motivation und andauernde Unterstützung nicht nur beim Schreiben dieser Arbeit.

Allen, die auch in schwierigen Zeiten an das Gelingen dieser Arbeit glaubten und mich unterstützten, danke ich sehr. Uschi und Gunter Braun für so Vieles in den letzten 30 Jahren, Jürgen Blum für die einzigartige Freundschaft.

Ein ganz besonderes Dankeschön an Cathrine, die in der Zeit des Niederschreibens dieser Arbeit eine wundervolle Stütze war: Tack så mycket !

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Sekretorische Weg.....	1
1.1.1 Früher Sekretorischer Weg (ER-Golgi)	3
1.1.2 Allgemeine Prinzipien des vesikulären Transports	4
1.2 Proteinsortierung am Golgi-Apparat	7
1.2.1 Später Sekretorischer Weg – vom TGN zur Plasmamembran	7
1.2.2 Rezeptorvermittelter Transport vom Golgi-Apparat zum PVC und zur lytischen Vakuole.....	8
1.3 Das prävakuoläre Kompartiment	9
1.3.1 Multivesikuläre Körper (MVBs) als lytisches PVC.....	11
1.3.2 Molekularer Aufbau des PVCs in Pflanzen	13
1.4 Der Rezeptor BP-80.....	14
1.4.1 Funktion des BP-80.....	15
1.4.2 Subzelluläre Lokalisierung von BP-80 und seinen Homologen.....	16
1.5 Recycling vakuolärer Sortierungsrezeptoren vom PVC	18
1.6 Ziel der Arbeit: Retromer-vermittelter Transport in Pflanzen.....	24
2 ERGEBNISSE	26
2.1 Identifikation von pflanzlichen Retromerhomologen.....	26
2.2 Verschiedene Isoformen von Retromerproteinen.....	31
2.3 Klonieren und Exprimieren einzelner Retromerproteine.....	33
2.4 Herstellung der Antikörper	40
2.5 Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern aus Hefe und <i>Arabidopsis</i>	42
2.6 Verteilung der Retromerproteine in subzellulären Fraktionen	43
2.7 Abgelöste Vps35, Vps29, Vps26 Proteine verbleiben zusammen als Subkomplex.....	45

2.8	Retromer bindet an PVC Membranen und Mikrovessikel	47
2.9	Elektronenmikroskopischer Nachweis von retromerbeschichteten Vesikeln	49
2.10	Retromer ist in situ am PVC lokalisiert (CLSM)	51
2.11	Retromer lokalisiert in situ am PVC (EM)	54
2.12	Wortmanninbehandlung trennt Vps35 und VSR_{At-1}	56
2.13	Funktionelle Eigenschaften des Retromer.....	59
2.13.1	VSR _{At-1} lässt sich mit Vps35-Antikörpern immunpräzipitieren	59
2.13.2	Inhibition des retromervermittelten Transports.....	61
2.13.3	Expression von fluoreszenzmarkierten Retromerproteinen in Tabakprotoplasten.....	66
3	DISKUSSION UND AUSBLICK	70
3.1	Identifikation, Klonierung und Expression von pflanzlichen Retromerhomologen.....	70
3.2	Retromerproteine und ihre Bindung an Membranen	71
3.3	Retromer bindet an PVC Membranen und retromerbeschichtete Mikrovessikel	73
3.4	Retromer ist an MVBs/PVC in situ lokalisiert.....	74
3.5	Wortmanninbehandlung trennt Vps35 und VSR_{At-1}	75
3.6	Wechselwirkung von Retromer und VSR	78
3.6.1	Amylase-Assay mit Vps26-Retromermutanten.....	78
3.6.2	Expression fluoreszenzmarkierter Retromerproteine	80
3.6.3	Identifikation der Vps35-VSR-Interaktion durch Immunpräzipitation	81
3.7	Zusammenfassung und Ausblick	82
4	MATERIAL UND METHODEN	85
4.1	Chemikalien, Materialien und Enzyme	85
4.2	Bakterienstämme und Plasmide.....	85
4.2.1	Bakterienstämme.....	85
4.2.2	Verwendete Plasmide.....	86
4.3	Desoxyoligonukleotide.....	88

4.4	Antikörper	90
4.4.1	Primäre Antikörper	90
4.4.2	Sekundäre Antikörper	91
4.5	DNA und Proteinsequenz Computeranalyse	92
4.6	Allgemeine molekularbiologische Methoden	92
4.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	92
4.6.2	Reverse Transkription (RT)	93
4.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	93
4.6.4	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	93
4.6.5	Spektrophotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration von RNA und DNA .	94
4.6.6	Ligation	94
4.6.7	Transformation von Bakterien	94
4.6.8	Isolierung von Plasmid-DNA.....	95
4.6.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	97
4.6.10	DNA-Sequenzierung	97
4.6.11	Plasmidkonstruktionen.....	97
4.7	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	102
4.8	Aufreinigung der Fusionsproteine	103
4.8.1	Solubilitätsscreen	103
4.8.2	Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose 4B.....	104
4.8.3	Aufreinigung aus Einschlußkörpern (Inclusionbodies).....	105
4.8.4	TEV-Spaltung und Aufreinigung	106
4.9	Gewinnung und Aufreinigung von Antikörpern	106
4.10	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	107
4.10.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	107
4.10.2	TCA-Fällung von Proteinen.....	107
4.10.3	Chloroform/Methanol-Fällung von Proteinen.....	107
4.10.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	108
4.10.5	Coomassie-Färbung	109
4.10.6	Western-Blot-Analyse (Immunoblot)	109
4.11	Pflanzenmaterial	110
4.11.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
4.11.2	Kultivierung von <i>Nicotiana tabacum</i>	111
4.11.3	Zellkulturen	111

4.11.4	Protoplastengewinnung aus Tabakmesophyll	112
4.12	Zellbiologische Methoden	112
4.12.1	Subzelluläre Fraktionierung	112
4.12.2	Saccharosedichtegradientenzentrifugation	113
4.12.3	Dissoziation von P100-Membranen	114
4.12.4	Gelfiltration dissoziierter P100-Membranen	114
4.12.5	Immunpräzipitation	114
4.12.6	α -Amylase-Assay	115
4.12.7	Lysis von Hefen	117
4.13	Elektronenmikroskopie.....	117
4.13.1	Immunnegativkontrastierung	117
4.13.2	Probenvorbereitung für die Immunelektronenmikroskopie	118
4.14	Fluoreszenzmikroskopie	118
4.14.1	Immunfluoreszenz.....	118
4.14.2	Fluoreszenzmikroskopie an transformierten Protoplasten	120
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	122
6	ANHANG	137
6.1	Abkürzungen	137
6.2	Sequenzen.....	141
6.2.1	AtVps26 (At5g53530).....	141
6.2.2	AtVps26 – Mutationen.....	142
6.2.3	AtVps26 – alternatives Splicing.....	143

Zusammenfassung

Rezeptoren saurer Hydrolasen, die für das Lysosom in Säugerzellen oder die Vakuole in Hefen bestimmt sind, zyklieren zwischen dem Golgi-Apparat und dem prävakuolären Kompartiment (PVC). Ihr Rücktransport vom prävakuolären Kompartiment zum Golgi-Apparat geschieht mit Hilfe eines pentameren Proteinkomplexes, dem sogenannten Retromer. Dieser Komplex wird an die Membran des PVC rekrutiert und bindet die Hydrolase-Rezeptoren. Der Retromerkomplex besteht aus zwei Subkomplexen, einem großen aus Vps35, Vps26 und Vps29 und einem kleinen aus Vps5 und Vps17 (vps für vacuolar protein sorting). Während der größere vermutlich die Frachtauswahl bedingt, ist der kleinere möglicherweise für die Vesikelbildung verantwortlich (Seaman et al., 1998). Seit der ersten Arbeit zu Vps35 aus Hefe (Paravicini et al., 1992) gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen weitere strukturelle Bestandteile des Retromerkomplexes in Hefe und Säugern zu identifizieren und den retromervermittelten Transport vakuolärer bzw. lysosomaler Sortierungsrezeptoren auch funktionell zu charakterisieren (Haft et al., 2000; Seaman et al., 1998; Seaman, 2004; Arighi et al., 2004). In Pflanzenzellen hingegen lagen keinerlei dementsprechende Informationen zur Existenz oder Funktion eines retromervermittelten Transports vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Gene der den Hefen und Säugern homologen Retromerproteine AtVps35, AtVps26, AtVps29 und AtVps5 aus *Arabidopsis* identifiziert und aus cDNA isoliert. Die Proteine des großen Retromersubkomplexes wurden rekombinant exprimiert und Antikörper gegen deren GST-Fusionsproteine hergestellt. Mit Hilfe dieser Antikörper konnten in Pflanzenzellen AtVps35, AtVps26 und AtVps29 sowohl cytosolisch wie auch membrangebunden nachgewiesen werden.

Des weiteren gelang es die Anwesenheit eines möglichen Retromerkomplexes in Salzextrakten von Arabidopsismikrosomen nachzuweisen und seine Größe durch Gelfiltration zu bestimmen. Dieser Komplex koequilibrierte im Saccharosedichtegradienten mit Membranen des PVC und mit Membranen aus

hochdichten Fraktionen. Immunogoldmarkierung dieser Membranen aus den hochdichten Fraktionen mit Retromerantikörpern zeigte Markierungen von 90 nm großen proteinbeschichteten Mikrovesikeln bei denen es sich möglicherweise um retromerbeschichtete Vesikel handelt.

CLSM-Immunfluoreszenzmikroskopie an Tabak-BY-2 Zellen zeigte ein hohes Maß an Kolo-kalisation der Retromermarkierungen mit denen der PVC-Marker AtPep12 und VSR_{At-1}. Die Anwesenheit der pflanzlichen Retromerproteine an der Oberfläche der multivesikulären Körper (MVBs¹) konnte zusätzlich an hochdruckgefrorenen und anschließend gefriersubstituierten BY-2 Zellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Behandlung der BY-2 Zellen mit Wortmannin führte zu einem Anschwellen des PVCs und einer Trennung der vormals kolo-kalisierten Vps35- und VSR-Signale.

Durch Immunpräzipitation konnte eine Interaktion von AtVps35 mit dem vakuolären Sortierungsrezeptor VSR_{At-1} nachgewiesen werden. Alle diese Daten lassen auf eine Beteiligung der retromerbeschichteten Vesikel am retrograden Proteintransport vom PVC zum Golgi-Apparat schließen. Damit stützt diese Arbeit die Hypothese, dass der Rücktransport von vakuolären Sortierungsrezeptoren aus dem PVC nicht nur selektiv sondern auch retromervermittelt geschieht. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen somit ferner die Auffassung, dass die Transportmaschinerie zum lytischen Kompartiment und das Rezeptorrecycling zwischen den endosomalen oder prävakuolären Kompartimenten und dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) grundsätzlich bei allen Eukaryoten, also auch den Pflanzen, hochkonserviert ist.

¹ MVB von multivesicular bodies, „multivesikuläre Körper“

Summary

Receptors of acid hydrolases destined for the vacuole in yeast and the lysosome in mammalian cells cycle between the Golgi and the prevacuolar compartment. Their retrograde transport from the prevacuolar compartment occurs with the help of a pentameric protein complex, the so-called retromer. This complex is recruited at the membrane of the PVC and binds the receptors. The retromer complex has two subunits, a larger one consisting of Vps35, Vps29, Vps26 and a smaller one with Vps17 and Vps5. While the large subunit selects cargo, the small one may drive vesicle budding (Seaman et al., 1998). After the first results on Vps35 had been obtained on yeast (Paravicini et al., 1992), several groups succeeded in identifying further components of the retromer complex in yeast and mammals and also characterised retromer-mediated transport of vacuolar or lysosomal sorting receptors (Haft et al., 2000; Seaman et al., 1998; Seaman, 2004; Arighi et al., 2004). At the outset of this work there was no information available on the existence or function of a retromer-mediated transport in plant cells.

In the present dissertation *Arabidopsis* homologues to the retromer proteins AtVps35, AtVps26, AtVps29 and AtVps5 from yeast and mammals were identified and their genes isolated from cDNA. The proteins constituting the larger subunit of retromer were expressed recombinantly and antibodies prepared against each of the respective GST-fusion proteins. With these antibodies the existence of AtVps35, AtVps26 and AtVps29 in plant cells were demonstrated both in soluble and membrane bound forms.

With these antibodies it was possible to demonstrate the presence of a retromer-like protein complex in salt-extracts prepared from *Arabidopsis* microsomes and to determine its size by gel filtration. This complex coequilibrates in a sucrose density gradient with prevacuolar and with high-density sedimenting membranes. Immunogold negative staining of the latter showed positive labelling of 90-nm-diameter coated microvesicles that are possibly retromer-coated vesicles.

Confocal laser scanning immunofluorescence microscopy performed on tobacco BY 2 cells revealed high degrees of colabelling between all retromer

antibodies and the PVC-markers PEP12 and VSR_{At-1}. The presence of plant retromer at the surface of MVBs was demonstrated in the electron microscope by immunogold labeling of sections obtained from high-pressure frozen and freeze-substituted BY 2 cells. Treatment of BY-2 cells with wortmannin led to swelling of the PVC and a separation of the VPS35 and VSR signals.

By immunoprecipitation, an interaction of AtVps35 with the vacuolar sorting receptor VSR_{At-1} was detected. It was therefore possible to infer from this experiment that retromer-coated vesicles are involved in retrograde protein trafficking from the PVC to the Golgi. This supports the notion that retrograde transport of vacuolar sorting receptors from the PVC is both selective and retromer-mediated. The results of this work therefore support the concept that the transport machinery to the lytic compartment and the recycling of receptors between endosomal or prevacuolar compartments and the TGN is well conserved among eukaryotes.

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen sind im Unterschied zu Bakterienzellen in viele membranumschlossene und funktionell unterscheidbare Kompartimente unterteilt. Die Separierung in getrennte Reaktionsräume macht diese voneinander unabhängig und ermöglicht der Zelle sich verschiedenen Umgebungen anzupassen. Die Ausbildung von separierten Organellen bedingt aber auch ein komplexeres Kommunikations- und Transportsystem zwischen den Reaktionszentren innerhalb der Zelle.

Nur ein Verständnis des Transports zwischen den einzelnen Kompartimenten, deren Aufbau und Struktur sowie der Vorgänge innerhalb der Kompartimente lässt auch die eukaryotische Zelle in ihrer Gesamtheit und damit den eukaryotischen Organismus besser verstehen.

1.1 Der Sekretorische Weg

Die komplexen Funktionen der eukaryotischen Zelle können nur durch kontinuierlichen Transport von Proteinen zwischen den einzelnen Kompartimenten aufrecht erhalten werden. Dabei sind sämtliche Kompartimente außer Zellkern, Peroxisomen, Mitochondrien und Plastiden in einem dynamischen Gleichgewicht der Aufnahme und Abgabe von Membranen miteinander verbunden. Neben einer Vielzahl von Proteinen werden auch Lipide und kleinere Moleküle wie z.B. Hormone oder Neurotransmitter zwischen den verschiedenen Kompartimenten und dem Extrazellularraum hin- und hertransportiert. Bild 1-1 A gibt einen Überblick über die verbundenen Kompartimente, sowie ihre topologische Beziehung zueinander. Der sekretorische Weg umfasst dabei alle vom endoplasmatischen Retikulum (ER) nach außen gerichteten Transporte zur Plasmamembran oder zu den Lysosomen. Er kann unterteilt werden in einen frühen sekretorischen Weg vom ER bis zum Golgi-Apparat und einen späten sekretorischen Weg ab dem Golgi-Apparat.

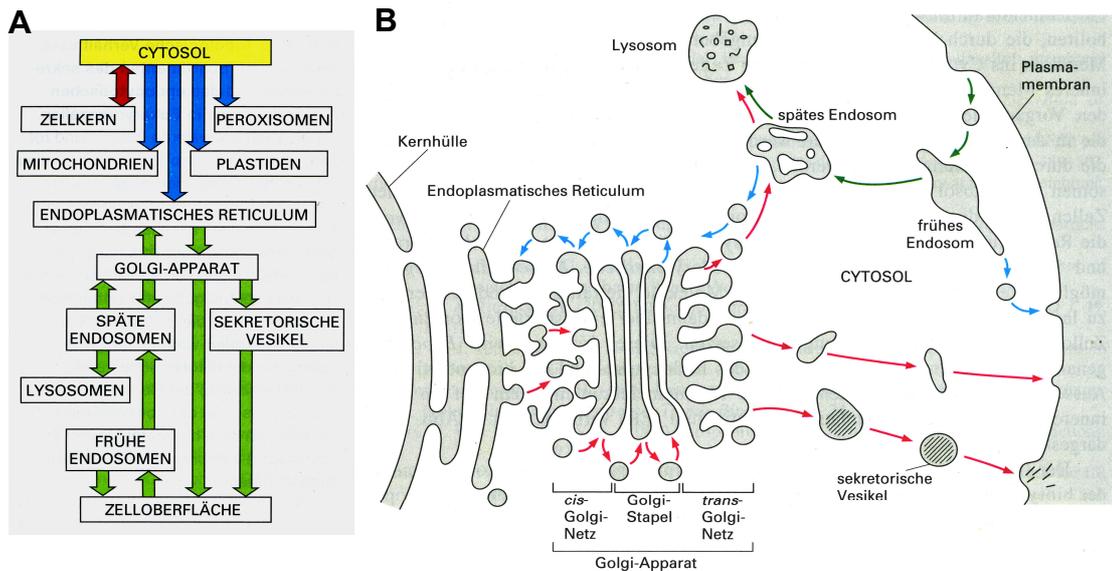


Bild 1-1: A: Proteine werden entweder durch gerichteten Transport (rot), durch Transmembrantransport (blau) oder durch vesikulären Transport (grün) intrazellulär befördert. Jede dieser Transportformen wird durch Sortiersignale gesteuert. Der gerichtete und der vesikuläre Transport findet zwischen topologisch äquivalenten Kompartimenten statt, während beim Transmembrantransport Proteine in topologisch andersartige Kompartimente transferiert werden. **B:** Der Proteintransport des biosynthetisch-sekretorischen Wegs (rote Pfeile) und des endozytischen Wegs (grüne Pfeile) im Überblick. Blaue Pfeile markieren Rücktransportwege durch die Moleküle zur Wiederverwendung an ihren Ursprungsort zurücktransportiert werden. Nur der sich im Gleichgewicht befindende Transport zwischen endozytotischem und sekretorischem Weg in anterograder wie retrograder Richtung kann zu einem Strukturerehalt des Endomembransystems und damit der Zelle führen (Abbildung: Alberts et al., 2003).

Proteine, die für den sekretorischen Weg bestimmt sind, tragen ein 16-30 Aminosäurereste langes ER-Lokalisationssignal, das für den Transport der Ribosomen mit dem naszierenden Protein zur ER-Membran sorgt. Dort werden die Proteine während ihrer Synthese durch die Membran in das ER-Lumen transloziert. Dieser Prozess wird als kotranslatonaler Transport bezeichnet (Rapoport et al., 1996). Noch während der Translokation wird die Signalsequenz entfernt. Vom ER gelangen die Proteine je nach weiterer, spezifischer Signalsequenz in ihr individuelles Zielorganell, wie beispielsweise Golgi-Apparat, Lysosom oder Vakuole oder aber sie verbleiben im ER (Chrispeels, 1991; Gomord und Faye, 1996; Pelhalm, 1995). Tragen sie keine weiteren Signale, werden sie grundsätzlich auf dem sog. „default pathway“ zur Plasmamembran transportiert und dort in den Extrazellulärraum sekretiert (Pfeffer und Rothman, 1987).

Auch wenn der Sekretorische Weg sehr viele Gemeinsamkeiten in allen eukaryotischen Organismen besitzt, gibt es gerade bei Pflanzen einige

Besonderheiten. Dazu zählen unter anderem auch die Bildung einer Zellplatte während der Zellteilung, die Sekretion von Polysacchariden der Zellwand oder auch das Vorhandensein spezieller Kompartimente wie z.B. Proteinspeichervakuolen (Jiang et al., 2001). Daher sind Ergebnisse aus Arbeiten an Hefe oder Säugerzellen nicht direkt auf die entsprechenden Vorgänge bei Pflanzenproteinen übertragbar und genaue Vorhersagen über Transportmechanismen in Pflanzen schwierig (Bassham und Raikhel, 2000). Alle vorwärts (anterograd) und rückwärts (retrograd) gerichteten Transporte bilden ein System, das in einem dynamischen Gleichgewicht steht (siehe Bild 1-1 B). Die Störung eines einzelnen Transportweges führt unmittelbar zur Störung des Gesamtsystems.

1.1.1 Früher Sekretorischer Weg (ER-Golgi)

Der Sekretorische Weg beginnt mit dem Eintritt der Proteine in das ER. Nach der Translokation wird das neusynthetisierte Protein im Lumen des ER durch die Bildung inter- und intramolekularer Disulfidbrücken, sowie Glykosylierungen modifiziert und mit Hilfe von Chaperonen wie BiP, Calreticulin und Calnexin gefaltet. Der Weitertransport zum Golgi-Apparat wird durch COPII-beschichtete² Vesikel vermittelt. Diese werden am ER gebildet und die entsprechenden Frachtproteine inkorporiert. Jedoch dürfen nicht alle sekretorischen Proteine, die sich im Endomembransystem befinden das ER verlassen. Da zur Sekretion kein spezifisches ER-Exportsignal nötig ist (Chrispeels, 1991), wurde die „bulk flow“-Theorie postuliert. Danach werden alle Proteine, die kein spezifisches Sortiersignal tragen, in den Extrazellularraum sekretiert. Proteine, die in der Zelle verbleiben und damit von diesem Hauptstrom („bulk-flow“) abzweigen, müssen ein entsprechendes Signal tragen (Pfeffer und Rothman, 1987). Folgerichtig müssen Proteine, die im ER verbleiben, aktiv zurückgehalten werden. Dies geschieht entweder durch fortwährenden, selektiven Rücktransport aus dem Golgi-Apparat oder aber durch Verhindern des Transports der Proteine dorthin. Die „bulk flow“-Hypothese wird durch die Identifikation von ER-Retentionssignalen an ER-residenten Proteinen gestützt.

² COP von Coat Protein = Hüll- oder Beschichtungsprotein

So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine HDEL-Sequenz³ am C-Terminus des Chaperons BiP dessen ER-Retention bewirkt. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass die HDEL-Sequenz und die verwandte KDEL-Sequenz bei Hefen, Säugern und Pflanzen als generelle ER-Retentionssignale dienen. ER-ansässige Membranproteine besitzen ein Dilysin-Motiv (KKXX oder KXKXX) mit derselben Wirkung. Der entsprechende retrograde Transport zum ER wird von COPI-Vesikeln vermittelt. Für den unterschiedlichen Aufbau der jeweiligen Transportvesikel, sowie für Einzelheiten des ER-Golgi-Transports sei auf die Übersichtsliteratur verwiesen (Kirchhausen, 2000; Barlowe, 2000; Barlowe, 2003).

1.1.2 Allgemeine Prinzipien des vesikulären Transports

Am vesikulären Transport sind verschiedene Vesikel beteiligt, die alle auf ihrer cytosolischen Seite mit einer charakteristischen Proteinhülle beschichtet sind. Während COPI- und COPII-Vesikel zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat verkehren, sind Clathrin beschichtete Vesikel⁴ auf zwei verschiedenen Routen in rezeptorvermittelten Prozessen anzutreffen, einmal von der Plasmamembran in Richtung Frühes Endosom und einmal vom Golgi-Apparat zum Späten Endosom (Kirchhausen, 2000).

All diese vesikelvermittelten Transporte haben dabei die folgenden drei Schritte gemeinsam: Im ersten Schritt werden die Frachtmoleküle angereichert, die Hüllproteine assemblieren sich und das Transportvesikel schnürt sich von der Donormembran ab. Im zweiten Schritt kommt es zur Dissoziation der Proteinhülle mit darauf folgender Anlagerung an die Akzeptormembran. Im dritten Schritt fusioniert das Transportvesikel mit dieser (siehe schematische Darstellung in Bild 1-2 A). Die allgemeinen Prinzipien des vesikulären Transports sollen am Beispiel der CCVs kurz erläutert werden. Diese sind unter anderem am rezeptorvermittelten Transport vom Golgi-Apparat zum prävakuolären Kompartiment (PVC) beteiligt (siehe 1.2.2).

³ HDEL-Sequenz: HDEL steht für das Tetrapeptid His-Asp-Glu-Leu, KDEL für Lys-Asp-Glu-Leu

⁴ CCVs, Clathrin coated Vesicles

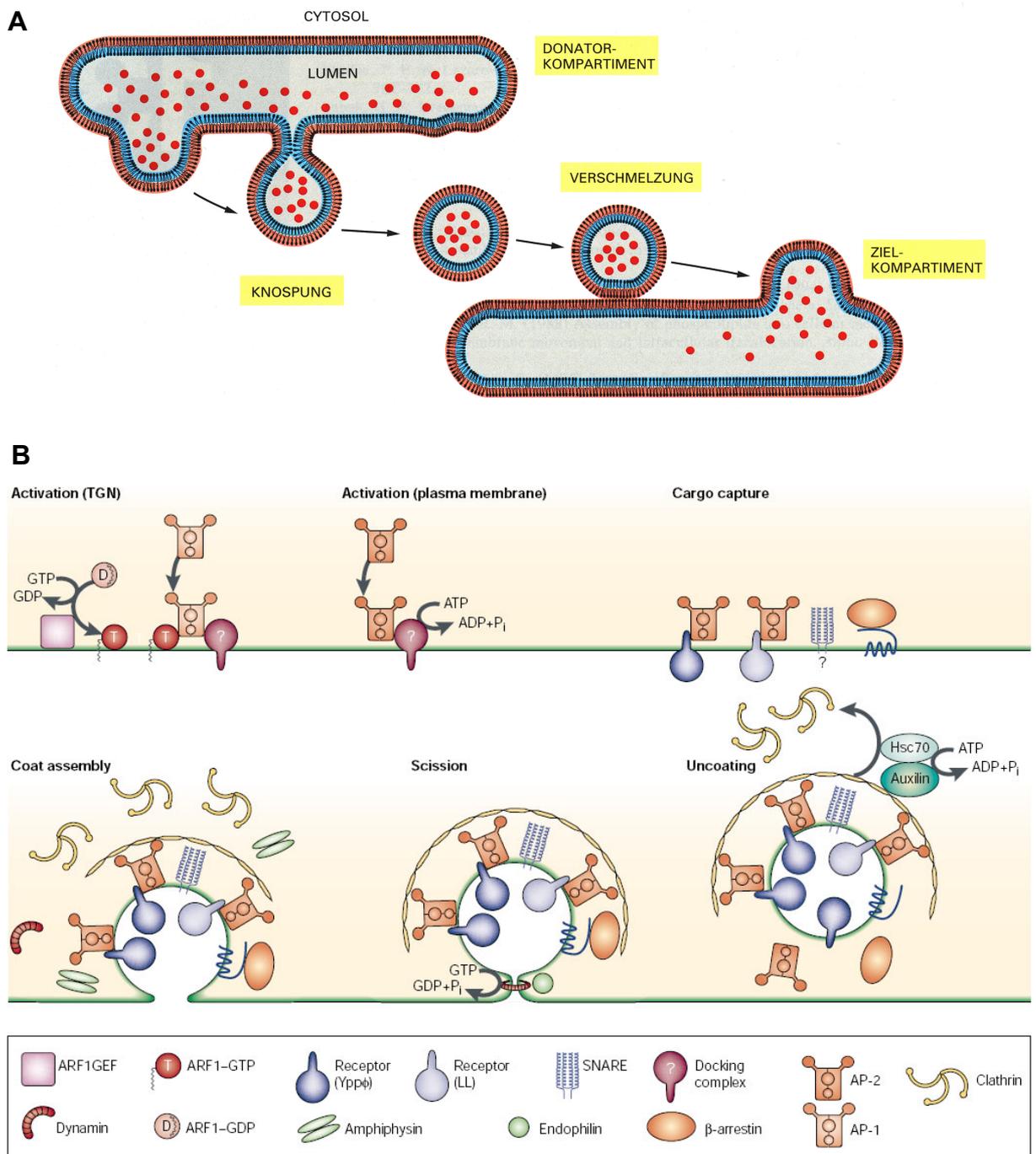


Bild 1-2: A: Der vesikuläre Transport von proteinbeschichteten Transportvesikeln lässt sich in drei Phasen einteilen. In der ersten Phase wird das Transportvesikels von der Donormembran abgeschnürt und in der zweiten Phase in Richtung der Ziellmembran transportiert. Nach der Dissoziation seiner Proteinhülle kommt es schließlich in der dritten Phase nach der Erkennung der korrekten Ziellmembran zur Fusion mit derselben (Abbildung Alberts, 2003). **B:** Die Bildung von CCVs. Die Aktivierung der Hüllassemblierung erfolgt durch Rekrutierung der GTPase ARF1 an die Membran. Das eine Ende des Adaptorproteins (AP) bindet an Frachtmoleküle, das andere an weitere Hüllproteine einschließlich Clathrin. Die Polymerisation der Clathrintriskelia führt zur Bildung eines Käfigs aus regelmäßigen Fünf- und Sechsecken, zur Deformation der Membran und letztendlich zur Abschnürung des fertigen CCVs. Die Dissoziation der CCV-Proteinhülle wird über eine ATP-abhängige Reaktion von Hsc70 und Auxilin von außerhalb der Vesikelhülle gesteuert und führt zur Clathrindeassemblierung (Abbildung Kirchhausen, 2000).

Die Proteinhülle der CCVs ist hauptsächlich aus Clathrin und Adaptorplexen aufgebaut. Die GTPase ARF aktiviert die Hüllassemblierung wodurch Clathrintriskelia ein Gitter bilden, das durch die Adaptorproteine mit den zu transportierenden Rezeptoren verbunden wird (siehe Bild 1-2 B). Bislang wurden 4 verschiedene AP-Komplexe identifiziert, AP-1 bis AP-4 (siehe 1.2.2; Holstein, 2002). Die weiterführende Polymerisation von Clathrintriskelia führt zur Bildung eines Käfigs, zur Membrandeformation und schließlich zur Abschnürung des fertigen CCVs. Die Dissoziation der CCV-Proteinhülle an der Zielmembran wird über eine ATP-abhängige Reaktion von Hsc70 und Auxilin von außerhalb der Vesikelhülle gesteuert und führt zur Clathrindeassemblierung (Kirchhausen, 2000). Nach diesem Schritt müssen die Vesikel noch mit ihrem Zielkompartiment verschmelzen. Dieser Vorgang bedarf wirksamer Kontrollmechanismen um die Transportspezifität zu gewährleisten. Dabei sind zwei Teilprozesse zu unterscheiden, zum einen die korrekte Zuordnung der Transport- zu den richtigen Zielkompartimenten und des weiteren die eigentliche Fusion. Beim ersterwähnten Prozess sind neben SNARE⁵ auch Rab-Proteine und sogenannte Tethering-Faktoren beteiligt. Bei der Fusion der Vesikel mit der Zielmembran hingegen nur die SNARE-Proteine. Für einen umfassenderen Überblick sei auf die Übersichtsartikel von Sanderfoot und Raikhel (1999), Vernoud et al. (2003), Sztul und Lupashin (2006) sowie Jordens et al. (2005) verwiesen.

Das gegenwärtige Modell der Spezifität der Vesikelfusion besagt, dass diese – zumindest zum Teil– auf entsprechenden SNARE-Proteinen mit einer genau definierten subzellulären Lokalisation beruht. Gemäß der ursprünglich verwendeten Terminologie finden sich v-SNAREs hauptsächlich am transportierten Vesikel, während t-SNAREs vor allem mit der Zielmembran verbunden sind (Sollner et al., 1993). Neben der Interaktion von v-SNAREs und t-SNAREs ist die Hauptfunktion von SNAP und NSF deren Disassemblierung und Regeneration.

⁵ SNARE von SNAP receptors; SNAP: Soluble NSF Attachment Protein; NSF: N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor

Neben den SNAREs scheinen vor allem Zielfindungs-GTPasen, die sog. Rabs eine entscheidende Rolle für die Spezifität zu spielen. Auf jeder cytosolischen Oberfläche ist an jedem Organell eine Rab-GTPase zu finden. Wie im Bild 1-3 zu sehen, unterstützen sie den Beginn der v-SNARE/t-SNARE-Wechselwirkung im Zusammenspiel mit membranständigen Sec1p-Homologen. Dabei regulieren sie die Geschwindigkeit der Fusion und ermöglichen außerdem nochmals eine Kontrolle der Spezifität (Sanderfoot und Raikhel, 1999). Sowohl SNAREs als auch Rabs lassen sich durch ihre charakteristische Verteilung auf den Zellmembranen sehr gut als Marker verwenden. So lokalisiert beispielsweise das t-SNARE Pep12p aus Hefe spezifisch am PVC (Becherer et al., 1996) ebenso wie sein Homolog in *Arabidopsis* (da Silva Conceição et al., 1997).

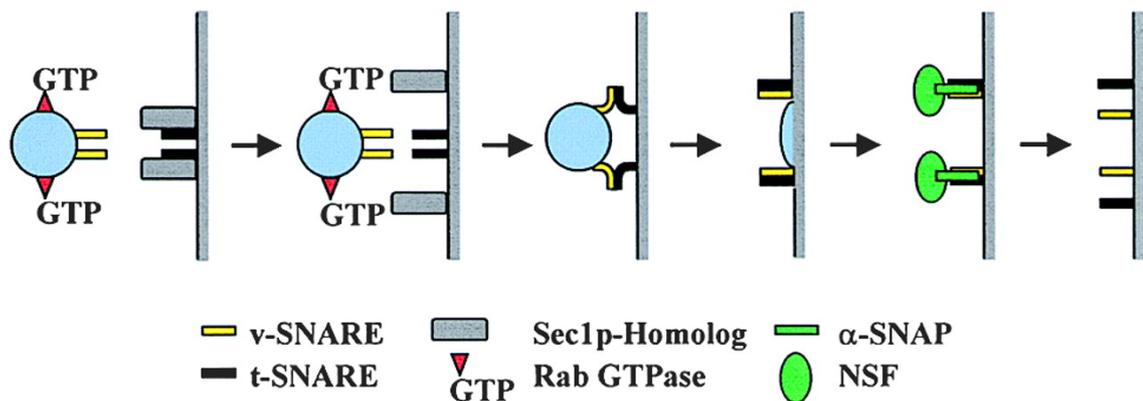


Bild 1-3: Der SNARE-Mechanismus der Vesikelfusion. Das v-SNARE und mit der Vesikelmembran assoziierte Rab-GTPasen erkennen das t-SNARE und das Sec1p-Homolog auf der Zielmembran. Im Anschluss an das Andocken wird das Sec1p-Homolog verlagert und die spezifische Protein-Proteinwechselwirkung zwischen v- und t-SNARE vermitteln die Vesikelfusion. Schließlich sorgen SNAP und NSF zusammen für die Dissoziation des v-t-SNARE-Paares (Abbildung: Sanderfoot und Raikhel, 1999).

1.2 Proteinsortierung am Golgi-Apparat

1.2.1 Später Sekretorischer Weg – vom TGN zur Plasmamembran

In Pflanzen teilen sich am Golgi-Apparat Transportwege zu verschiedenen Vakuolen und zur Plasmamembran. Beim Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran handelt es sich um den Standardweg („default pathway“) für zu sekretierende Proteine. Dies wurde u.a. in Experimenten mit einer sekretierten Form von GFP (secGFP) gezeigt (Batoko et al., 2000). Wie

allerdings Membranproteine zur Plasmamembran gelangen, ist im Detail nicht bekannt. In Pflanzen konnten bis jetzt keine Transportvesikel zur Plasmamembran eindeutig identifiziert werden. Allerdings wurden schon verschiedene t-SNAREs, u.a. Homologe von SNAP25 und Syntaxin, an der Plasmamembran in Pflanzen lokalisiert (Jürgens, 2004). Die Überexpression von NtSYR1, einem Homologen von Syntaxin aus Tabak, führte beispielsweise zur Anreicherung des secGFP im ER und Golgi und inhibierte dessen Sekretion (Geelen et al. 2002).

Der sekretorische Standardweg führt vom ER via dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran. Der gezielte Transport zur Vakuole benötigt ein Aussortieren vom Hauptstrom („Bulk flow“), vermutlich am Golgi-Apparat (siehe 1.1.1 und 1.2.2). Die hierfür erforderlichen spezifischen Signalsequenzen unterscheiden sich voneinander in Abhängigkeit vom jeweiligen Organismus (Hadlington und Denecke, 2000).

1.2.2 Rezeptorvermittelter Transport vom Golgi-Apparat zum PVC und zur lytischen Vakuole

Das gegenwärtige Modell der rezeptorvermittelten Sortierung am TGN besagt, dass lösliche Proteine aufgrund vakuolärer Sortiersignale (vacuolar sorting determinants, VSDs) die Vakuole erreichen. Diese Sortiersignale werden durch integrale Transmembranrezeptorproteine erkannt (Neuhaus und Rogers, 1998). Die Rezeptor-Liganden-Komplexe werden über Adaptorproteinkomplexe (AP-1) in CCVs rekrutiert und zum prävakuolären Kompartiment (PVC) transportiert. Dieser Transportweg ist in Säugern (Ghosh et al., 2003; Doray et al., 2002; Gruenberg and Stenmark, 2004) und Hefe (Wurmser und Emr, 1998; Deloche et al., 2001; Costaguta et al., 2001) charakterisiert und wurde inzwischen auch in Pflanzen nachgewiesen (Paris und Neuhaus, 2002; Jürgens, 2004; Tse et al., 2004). Obwohl die verschiedenen CCVs evolutionär hoch konserviert sind, sind die jeweiligen Rezeptorsequenzen in Pflanzen, Tieren und Hefen recht unterschiedlich. Gemeinsam sind ihnen aber die gleichartigen Sortierungsmotive (Tyrosin und/oder Dileucin) in ihren cytoplasmatischen Schwänzen zur Interaktion mit dem μ -Adaptin des AP1-Adapterkomplexes (siehe Bild 1-4). Dies wurde z.B. für den Mannose-6-Phosphat- und den

Sortilinrezeptor in Säugern (Bonifacino and Traub, 2003; Hassan et al., 2004), den Vps10p-Rezeptor in Hefe (Dennes et al. 2002), wie auch die BP-80-artigen vakuolären Sortierungsrezeptoren (VSR) in Pflanzen (Happel et al., 2004) gezeigt. Bild 1-4 fasst die wichtigsten Merkmale dieser Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung am TGN zusammen, sowie den Bezug zu den Hüllproteinen eines CCV.

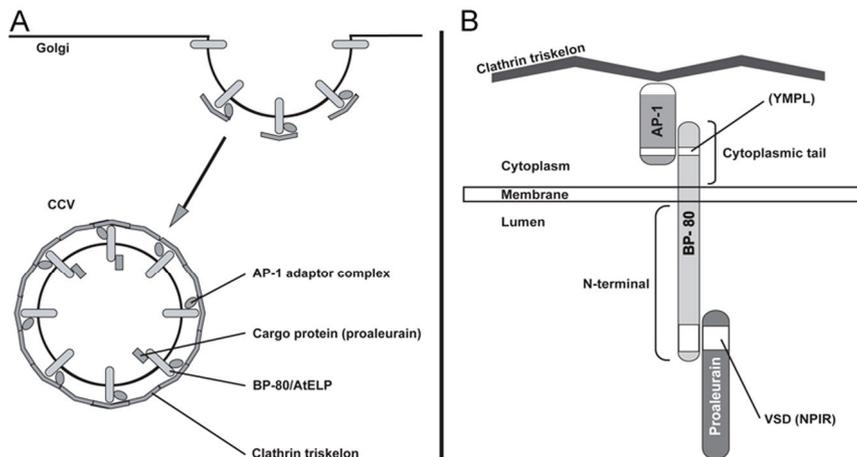


Bild 1-4: Modell der rezeptorvermittelten Sortierung in Pflanzen

Dargestellt sind mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor BP-80 und dem Frachtprotein Proaleurain im TGN (siehe 1.4). **A** Bildung und Knospung eines Clathrin beschichteten Vesikels (CCVs) am TGN. **B** Spezifische Proteinkomponenten und ihre Interaktionen innerhalb eines CCVs. AP-1, Adaptorproteinkomplex AP-1; NPIR, vakuoläres Sortiersignal (VSD) von Proaleurain; YMPL, Tyrosinmotiv des cytoplasmatischen Schwanzes von BP-80 (Abbildung: Lam et al., 2005).

1.3 Das prävakuoläre Kompartiment

Eukaryotische Zellen besitzen neben dem sekretorischen Pfad zwischen verschiedenen Kompartimenten (s. 1.1) auch die Fähigkeit, eine Vielzahl von Makromolekülen durch Endozytose zu internalisieren. Das PVC oder Späte Endosom (late endosome) ist ein Organell an der Schnittstelle zwischen der sekretorischen und der endozytischen Transportroute auf dem Weg zum lytischen, respektive vakuolären Kompartiment (Lysosom oder Vakuole). Arbeiten an Säuger- und Hefezellen zeigten, dass es sich bei PVCs um intermediäre Organellen am biosynthetisch-sekretorischen Weg zur Vakuole handelt. In ihnen laufen der sekretorische und der endozytotische Weg zusammen. (Lemmon und Traub, 2000; Maxfield und McGraw, 2004). Durch

den niedrigeren pH-Wert im PVC dissoziiert das Transportgut von seinem Rezeptor. Die Rezeptoren sowie fehlsortierte Proteine werden darauf zum Golgi-Apparat zurücktransportiert, um für einen weiteren Transportvorgang zur Verfügung zu stehen (Robinson et al., 2000).

Es gibt mehrere funktionell unterschiedliche endosomale Kompartimente. Einige dieser Kompartimente besitzen charakteristische interne Vesikel von denen sich die Bezeichnung „multivesikuläre Körper“ (multivesicular bodies, MVB) ableitet. Der Ursprung dieser Mikrovesikel scheint im Frühen oder auch Recycling-Endosom (early or recycling endosome) zu liegen (Parton et al., 1992). Ihre Zusammensetzung unterscheidet sich von der sie umgebenden Membran (Griffiths et al., 1990; Kobayashi et al., 1998). Ihre Bildung wird mit der „receptor down-regulation“ (Rezeptor-Herrunterregelung, d.h. einem Drosseln der Rezeptoraktivität) in Verbindung gebracht (Katzmann et al., 2002). Die Mikrovesikel und der lösliche Inhalt der MVBs gelangen aller Wahrscheinlichkeit nach durch direkte Fusion ins Innere des lytischen Kompartiments (Luzio et al., 2000; Katzmann et al., 2002). Unter anderem spielen dabei auch die sogenannten ESCRT-Proteine (ESCRT von endosomal sorting complex required for transport) eine entscheidende Rolle (Hurley und Emr; 2006).

Die hohe Komplexität des vakuolären Systems in Pflanzen sowie das Bestehen mehrerer vakuolärer Transportrouten insbesondere zur Proteinspeichervakuole erschweren die funktionelle und morphologische Charakterisierung des PVCs (Jiang und Rogers, 1998; Bethke und Jones, 2000; siehe auch Bild 1-5). Die pflanzliche lytische Vakuole wird als funktionelles Äquivalent zur Vakuole in Hefezellen und zum Lysosom in Säugerzellen gesehen. Allerdings war lange ungeklärt, ob es sich beim pflanzlichen PVC ebenso um das Äquivalent zum Endosom oder MVB in Säuger- oder Hefezellen handelt.

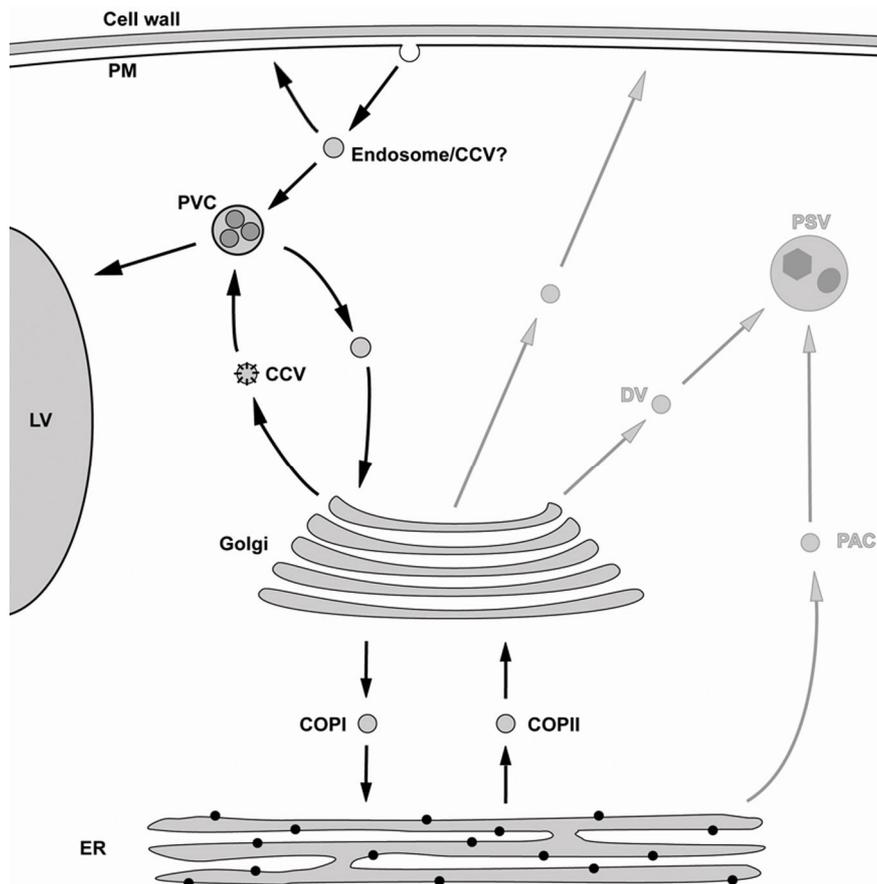


Bild 1-5: Modell des endozytotischen und lysosomal sekretorischen Wegs in Pflanzen

Die Transportrouten zur lytischen Vakuole (LV) beginnen entweder am Golgi-Apparat oder der Plasmamembran (PM). Sie werden durch clathrinbeschichtete Vesikel (CCVs) vermittelt und sind denen in Säuger- und Hefezellen ähnlich (Jiang und Rogers, 2003). In Samen gelangen die Speicherproteine entweder durch einen von sog. Dense Vesicles (elektronendichten Vesikeln, siehe 1.4) vermittelten Transport via Golgi-Apparat zur Proteinspeichervakuole (PSV) wie er in Erbsenkotyledonen beschrieben wurde (Robinson et al. 1998), oder via einer Golgi-unabhängigen Route die von PAC-Vesikeln (Precursor Accumulating Vesicles) vermittelt wird (beschrieben in Kürbissamen von Hara-Nishimura et al., 1998; DV = dense vesicles; Abbildung: Lam et al., 2005)

1.3.1 Multivesikuläre Körper (MVBs) als lytisches PVC

Die Anwesenheit von Peroxidase und saurer Phosphatase in MVBs zeigt, dass diese Organellen auf der biosynthetischen Route zur lytischen Vakuole liegen (Record und Griffing, 1988). Typischerweise sind MVBs in Pflanzen geringfügig kleiner als ein Dictyosom und besitzen an ihrer Oberfläche osmiophile Plaques (s. Bild 1-7A), eine Eigenschaft, die sie mit multivesikulären Endosomen in Säugerzellen teilen (Raposo et al., 2001; van Dam und Stoorvogel, 2002). Auf ein MVB kommen dabei im Allgemeinen ca. zwei Golgi-Apparate (Segui-Simarro und Staehelin, 2006).

Die Arbeit von Tse et al. (2004) legte nahe, dass MVBs identisch mit PVCs sind, da beide durch Immunogoldmarkierungen von Tabak BY-2 Zellen mit VSR-Antikörpern markiert werden. Interessanterweise war die VSR-Markierung eher auf die begrenzende Membran beschränkt als auf die internen Vesikel der MVBs. Demnach sollte nur ein kleiner Anteil der VSRs, die zum PVC gelangen, zur Degradation bestimmt sein.

Die Identität von MVBs mit PVCs bestätigte sich durch die unterschiedlichen und unterscheidbaren Effekte der Chemikalien BFA und Wortmannin in Pflanzenzellen (siehe Bild 1-6 Mitte). Während BFA bei niedrigen Konzentrationen zu schnellen und dramatischen Veränderungen in der Morphologie des Golgi-Apparates von BY-2 Zellen führt (Ritzenthaler et al. 2002), beeinflusst es nicht die MVBs.

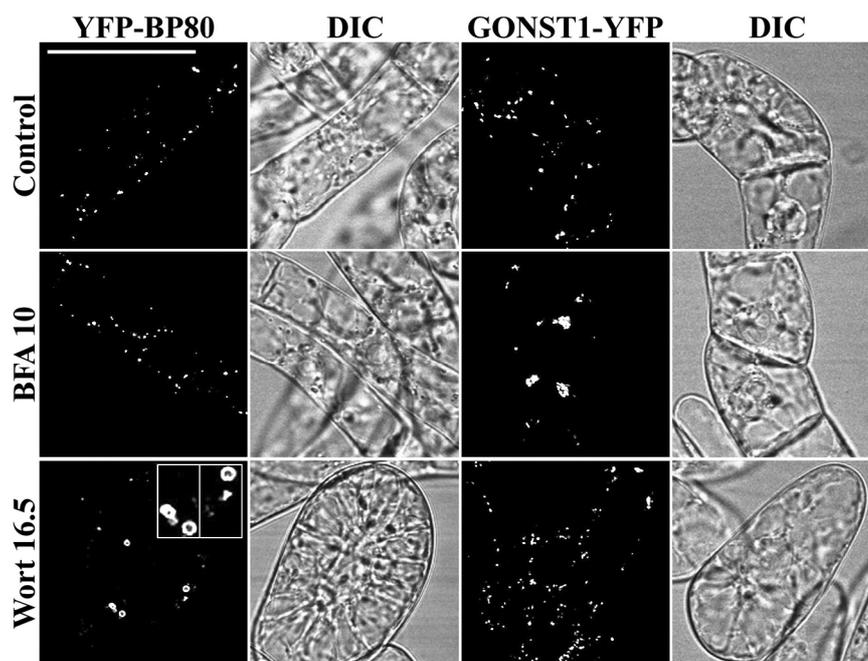


Bild 1-6: Dynamik YFP-markierter PVCs in transgenen Tabak BY-2 Zellen

YFP-BP-80-markierte PVCs in transgenen Tabak BY-2 Zellen zeigen ein typisches punktiertes Muster, das nicht durch Brefeldin A (BFA)-Behandlung bei 10µg/ml beeinflussbar ist, aber durch eine 10µg/ml Wortmanninbehandlung die Bildung kleiner Vakuolen induziert werden kann (linke Seite). GONST1-YFP-markierte Golgistapel zeigen ein ähnlich punktiertes Erscheinungsbild, das nicht auf Wortmanninbehandlung reagiert, aber durch BFA-Behandlung die Bildung von Aggregaten induzierbar war (rechte Seite). Maßstab = 50µm; Abbildung: Lam et al., 2005.

Genau entgegengesetzt verursacht Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidyl-3-kinase (Vanhaesebroek et al., 1997), ein Anschwellen der MVBs (Bild

1-6 unten und Bild 1-7 B; siehe auch Tse et al., 2004), die mit dem Verlust der osmiophilen Plaques und einer Reduktion der internen Vesikel einhergehen. Diese Veränderungen wurden auch an Multivesikulären Endosomen in Säugerzellen beobachtet (Bright et al., 2001; Sachse et al., 2002).

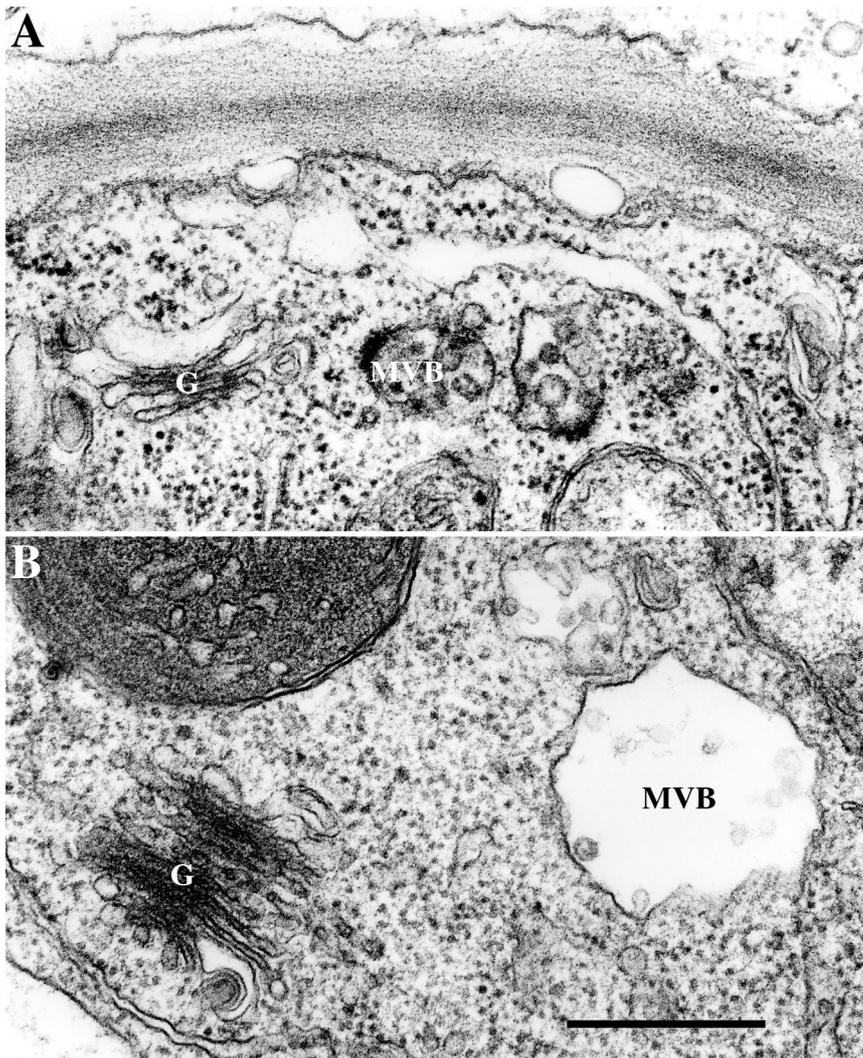


Bild 1-7: Multivesikuläre Körper in BY-2 Zellen

A Morphologie multivesikulärer Körper in BY-2 Zellen unter Normalbedingungen; **B** Morphologie multivesikulärer Körper in wortmanninbehandelten BY-2 Zellen. Die MVBs erscheinen dabei im letzteren Fall ausgedehnter und mit weniger internen Vesikeln; Maßstab = 500nm (Abbildung: Lam et al., 2005).

1.3.2 Molekularer Aufbau des PVCs in Pflanzen

Zur Untersuchung der molekularen Zusammensetzung des Pflanzen-PVCs wurde vor allem das vollständig sequenzierte *Arabidopsis* Genom genutzt.

Außerdem nutzte man die Kenntnis der Funktion bestimmter Rab GTPasen und SNAREs bei der Proteinsortierung und Vesikelfusion in Hefe (siehe 1.1.2). So ist in Hefe das Syntaxin Pep12p spezifisch mit dem PVC/Endosom assoziiert (Pelham, 1999). Dessen Ortholog aus *Arabidopsis*, AtPep12 (AtSYP22) kann die Hefe *pep12* Mutante funktionell komplementieren (Sanderfoot et al., 2000). AtPep12 konnte mittels Immunogoldelektronenmikroskopie und subzellulärer Fraktionierung an *Arabidopsis*-Wurzelspitzenzellen in einem post-Golgi-Kompartiment lokalisiert werden (Bassham et al. 1995; da Silva Conceição et al. 1997). An Erbsen-Wurzelspitzenzellen und Tabak BY-2 Zellen durchgeführte konfokale Immunmarkierungsuntersuchungen unter Verwendung von VSR-Antikörpern zeigten eindeutig ein hohes Maß an Koloalysierung mit der anti-AtPep12-Markierung, die von Golgimarkern deutlich separiert war (Li et al., 2002; Tse et al., 2004). Interessanterweise können in *Arabidopsis* Zellen auch bestimmte Endosomen für den endozytischen Weg abgegrenzt werden: das Frühe Endosom wird von den Proteinen Ara7, Rha1 und AtVam727 markiert, während das Späte Endosom/PVC durch die Anwesenheit von Ara6, AtSyp21 und AtSyp22 charakterisiert ist. Beide Kompartimente werden allerdings durch FM4-64, einem fluoreszierenden Endozytosemarker, in Form ununterscheidbarer punktierter Strukturen markiert (Ueda et al., 2004). Möglicherweise führt künftig auch eine proteomische Analyse isolierter PVCs zur Identifizierung sowohl von löslichen Frachtproteinen, wie auch von membrangebundenen Rezeptorproteinen des PVCs (Mo et al., 2003; Tse et al., 2004).

1.4 Der Rezeptor BP-80

BP-80 aus Erbsen (*pisum sativum*) ist der erstcharakterisierte vakuoläre Sortierungsrezeptor in Pflanzen. Das Protein wurde über ein synthetisches Peptid mit dem vakuolären Sortierungssignal (NPIR; vacuolar sorting determinant, VSD) von Proaleurain, einer Hydrolase der pflanzlichen lytischen Vakuole affinitätsgereinigt. NPIR ist eine sequenzspezifische vakuoläre Sortierungsdeterminante (ssVSD). Hierzu wurden CCVs aus Erbsenkotyledonen aufgereinigt und nach Detergenzsolubilisierung die gewonnenen

CCV-Proteine zur Säule gegeben (Kirsch et al., 1996). Das bindende Protein hatte eine molekulare Masse von 80 kDa und ist ein Typ I integrales Membranprotein, das eine einzelne Transmembrandomäne (TMD) enthält, sowie einen kurzen cytoplasmatischen Schwanz (cytoplasmic tail, CT). Inzwischen wurde erkannt, dass BP-80 zu einer eigenen Familie von Genen gehört (Ahmed et al., 1997; Paris et al., 1997; Shimada et al., 1997).

Der kurze cytoplasmatische Schwanz von BP-80 und seinen Homologen enthält ein konserviertes Tyrosinmotiv, YMPL. Dieses bindet an ein am TGN lokalisiertes *Arabidopsis* μ -Adaptin und scheint eine Rolle beim CCV-vermittelten Transport von Proteinen zu spielen (siehe 1.2.2 sowie Happel et al., 2004).

1.4.1 Funktion des BP-80

Es wurden mehrere *in vitro* Bindungsexperimente durchgeführt, die die Funktion und Bedeutung von BP-80 und seinen Homologen als pflanzliche vakuoläre Sortierungsrezeptoren zeigten. Zuerst wurde gezeigt, dass ein synthetisches Peptid, SSSFADSNPIRPVTDRAASTYC, das das vakuoläre Sortiersignal (VSD) von Proaleurain enthält, spezifisch und pH-abhängig mit BP-80 interagiert (Kirsch et al., 1994). Die Wechselwirkung von BP-80 mit der Proaleurain-VSD hat ein sehr schmales pH-Optimum zwischen pH 6,0 und 6,5. Bei einem pH-Wert von 4,0 findet keinerlei Bindung mehr statt. Ein weiteres Experiment bestätigte, dass BP-80 ebenso in der Lage ist, spezifisch an die VSDs von Prosporamin zu binden, sowie an ein Peptid, das den C-Terminus des Brasilnuss 2S Albumins darstellt (Kirsch et al., 1996). Bei Verwendung von *Arabidopsis* Lysaten erhielt man ähnliche Ergebnisse wobei eine Bindung mit Peptiden der nativen Proaleurain-Sequenz erzielt wurde. Alle diese Peptide sind sequenzspezifische VSDs (ssVSDs). Neben diesen Sortierungsdeterminanten gibt es noch andere, die nicht homolog sind : sog. C-terminale hydrophobe Sortierungsdeterminanten (ctVSD) und sog. proteinstrukturabhängige Sortierungsdeterminanten (psVSD) (Neuhaus und Matsuoka, 1999). Die Bindung an ctVSDs und psVSDs ist in der Literatur umstritten (zur Übersicht siehe Robinson et al., 2005).

Ein funktioneller Beweis, dass es sich bei BP-80 um einen vakuolären Sortierungsrezeptor handelt, wurde *in vivo* sowohl in Hefe (Humair et al., 2001) als auch in Pflanzenzellen erbracht (daSilva et al., 2005). In der erstgenannten Arbeit wurden *Petunia*-Aleurain-VSDs verwendet, um Signalpeptid-Aleurain-VSD-GFP Fusionskonstrukte (sp-Aleu-GFP) herzustellen. Wenn in Hefedeletionsmutanten des vakuolären Sortierungsrezeptors Vps10p (Δ Vps10p) dieses Konstrukt exprimiert wurde, kam es zur Sekretion des sp-Aleu-GFP-Konstrukts. Wurde jedoch BP-80 und das sp-Aleu-GFP-Konstrukt in den Δ Vps10p-Hefezellen koexprimiert, leitete der Rezeptor das sp-Aleu-GFP-Konstrukt zur Vakuole. Die Interaktion war spezifisch, da der Rezeptor andere Fusionskonstrukte nicht zur Vakuole transportierte.

Ein gekürztes sp-GFP-BP-80-Konstrukt, das die BP-80 Transmembrandomäne bzw. den cytoplasmatischen Schwanz enthielt (Jiang und Rogers, 1998), wurde zur Untersuchung der Rezeptor-Ligandenbindung in Pflanzenzellen verwendet (daSilva et al., 2005). Bereits zuvor wurde gezeigt, dass dieses Konstrukt in Tabak BY-2 Zellen im prävakuolären Kompartiment (PVC) lokalisiert ist (Tse et al., 2004). Die experimentelle Fragestellung war, ob das gekürzte sp-GFP-BP-80-Konstrukt mit dem endogenen BP-80 konkurriert, wenn es transient in Tabakprotoplasten exprimiert wird und dadurch eine Fehlsortierung der Frachtproteine bedingt. Tatsächlich führte die Koexpression des gekürzten sp-GFP-BP-80-Konstrukts mit einem vakuolär sortierten NPIR- α -Amylase-Fusionskonstrukt zur sonst nicht beobachteten Sekretion des letzteren in das Kulturmedium (daSilva et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Transport eines vakuolären Frachtproteins zur Zelloberfläche durch kompetitive Hemmung mit einem nicht-funktionellen, gekürzten BP-80 Rezeptor fehlgeleitet werden kann.

1.4.2 Subzelluläre Lokalisierung von BP-80 und seinen Homologen

Ebenfalls in Erbsen-Kotyledonen wurde die Verteilung von BP-80 und Speicherproteinen in isolierten Transportvesikeln bestimmt. Aufgereinigte CCVs enthielten große Mengen von BP-80, aber nur geringe Mengen der Erbsenspeicherproteine Vicilin und Legumin (Hohl et al., 1996). Im Gegensatz

dazu waren die Speicherproteine in sogenannten „dense vesicles“ (elektronendichten Vesikeln) angereichert, die wiederum wenig oder kein BP-80 enthielten (Hinz et al., 1999). Weitere Untersuchungen zur Analyse der Proteinverteilung innerhalb des Golgi-Apparates unter Verwendung quantitativer Immunogoldelektronenmikroskopie zeigten ebenfalls, dass BP-80 und Speicherproteine unterschiedlich lokalisiert sind (Hillmer et al., 2001). Die Speicherproteine aggregierten im cis-Golgi, der mit anti-Speicherproteinantikörpern massiv markiert war, während der trans-Golgebereich nur geringfügig markiert wurde. Ganz gegensätzlich stellte sich die Verteilung von BP-80 dar. Dessen maximale Markierungsdichte war im Bereich des trans-Golgi und nur geringfügig im cis-Golgi (Hillmer et al., 2001). Diese Daten stützten die Annahme, dass es sich bei BP-80 um einen Sortierungsrezeptor handelt, der seine Ladung am TGN aufnimmt.

Untersuchungen zur Lokalisierung von BP-80 wurden ebenso an Zellen durchgeführt, die keine Speicherproteine produzieren. Immunogoldelektronenmikroskopie und subzelluläre Fraktionierungen zeigten, dass VSR-Proteine nicht in der Vakuolenmembran lokalisiert sind (Ahmed et al., 1997; Paris et al., 1997; Sanderfoot et al., 1998). BP-80 wurde am Golgi-Apparat und am PVC in Wurzelspitzenzellen von Erbsen lokalisiert (Paris et al., 1997). AtELP, ein BP-80 Homolog aus *Arabidopsis*, äquivalent zu VSR_{At-1} (Ahmed et al., 1997) wurde ebenfalls am Golgi Apparat und einem möglichen PVC in *Arabidopsis* Wurzelspitzenzellen lokalisiert. Das PVC zeigte dabei morphologisch charakteristische Tubuli von ca. 100nm Durchmesser (Sanderfoot et al., 1998). Diese tubulären Strukturen sind allerdings auch im Erscheinungsbild des TGN zu finden (Robinson et al., 2000). Subzelluläre Fraktionierung zeigte, dass VSR_{At-1} (AtELP) sowohl in *Arabidopsis* Wildtyp (Ahmed et al. 1997; Sanderfoot et al. 1998) als auch in transgenen, den Golgimarker alpha-2,6-Sialyltransferase aus Säugern exprimierenden *Arabidopsis* Pflanzen (Wee et al. 1998) mit den Golgimembranen kofraktioniert. Zusätzlich kofraktioniert AtELP aus *Arabidopsis* Wurzelmembranen auf Saccharosedichtegradienten auch mit dem PVC-SNARE AtPep12p (Sanderfoot et al. 1998). Zusammengefasst

weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass VSR-Proteine in vegetativen Zellen sowohl am Golgi-Apparat als auch an einem möglichen PVC lokalisiert sind. Die relative Verteilung von Rezeptoren des BP-80-Typs in Tabak- und Erbsenzellen wurde in neueren Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die verwendeten Antikörper markierten jeweils spezifisch Proteine entweder des Golgi-Apparats oder des PVCs (Li et al., 2002). Dabei wurden fünf verschiedene VSR-Antikörper in unterschiedlichen Kombinationen in Doppelmarkierungsexperimenten an Erbsenwurzelspitzenzellen untersucht, wobei alle kolokalisierten. Die Ergebnisse zeigten, dass VSR-markierte Organellen größtenteils getrennt von ER, Golgi-Apparat und vakuolären Kompartimenten sind. Die Markierung mit VSR-Antikörpern kolokalisierte größtenteils mit der Markierung, die mit Pep12-Antikörpern als PVC-SNARE-Marker erhalten wurde. Letztere war wiederum größtenteils getrennt von jeglicher Markierung durch Golgimarker. Folglich müssen VSR-Proteine unter „steady-state“-Bedingungen am PVC konzentriert sein (Li et al., 2002). Dies wiederum bedeutet, dass vakuoläre Sortierungsrezeptoren zur Abgabe ihrer Fracht zum PVC gelangen und nur kurzfristig zum Golgi-Apparat recycelt werden, um dort Ladung aufzunehmen.

1.5 Recycling vakuolärer Sortierungsrezeptoren vom PVC

Der Rücktransport von vakuolären Sortierungsrezeptoren zum TGN für eine nächste Sortierungsrunde ist entscheidend, um den anterograden Transport von Hydrolasen zum lytischen Kompartiment der Zelle aufrecht zu erhalten. Somit ist er eine charakteristische Eigenschaft des PVCs. Obwohl der Mannose-6-Phosphatrezeptor aus Säugern und der Vps10p-Rezeptor aus Hefen nur eine geringe Ähnlichkeit in ihren Sequenzen besitzen, teilen sie beide die Eigenschaft schnell zwischen dem TGN und dem prävakuolären / prälysosomalen Kompartiment zu zyklieren (Ghosh et al., 2003; Cooper und Stevens, 1996). Wird der Rezeptor nicht korrekt zum TGN zurücktransportiert, führt dies zu einem Mangel an Verfügbarkeit des Rezeptors am TGN und folglich zu einem Zusammenbruch des anterograden Transports der Hydrolasen. Interessanterweise ist im Vergleich zur Fülle an Informationen in

Bezug auf die Sortierungsereignisse am TGN (siehe 1.2.2) sehr wenig über die analogen Ereignisse des Recyclings, besonders in Säugerzellen, bekannt. Obwohl bereits einige Proteine identifiziert werden konnten, sind ihre molekularen Funktionen in diesem Prozess noch nicht eindeutig geklärt. Die Situation wird dadurch kompliziert, dass sowohl in Säugern (Mallet und Maxfield, 1999) als auch in Hefen (Hetteema et al. 2003) zwei unterschiedliche Endosom-Golgi Rücktransportrouten identifiziert wurden.

Verschiedene cytosolische Proteine sind in das Recycling vom Endosom/PVC zum TGN einbezogen, neben TIP47 vor allem Retromer. TIP47, das nur in Säugerzellen vorkommt, bindet *in vitro* an die cytosolischen Schwänze sowohl der großen (CI-) als auch der kleinen (CD-) Mannose-6-Phosphatrezeptoren (Diaz und Pfeffer, 1998). Neuere Daten deuten allerdings darauf hin, dass TIP47 *in vivo* stattdessen als Lipidtröpfchen-bindendes Protein (lipid-droplet-binding protein) agiert (Hickenbottom et al., 2004; Robenek et al., 2005).

Die ersten Hinweise zum Recycling des Vps10p in Hefe kamen aus genetischen Screens bei denen fast 50 Proteine identifiziert wurden, die zum korrekten Transport der Hydrolasen zur Vakuole notwendig sind. Mutationen in jedem dieser vakuolären Sortierungsproteine (VPS-Proteine von vacuolar protein sorting proteins) führen zu Defekten im vakuolären Proteintransport (Bankaitis et al., 1986; Rothman und Stevens, 1986). Zur phänotypischen Analyse der Vps-Mutanten werden diese abhängig von ihrem morphologischen Erscheinungsbild und dem Ausmaß der Fehlsortierung der Hydrolasen in sechs Klassen (A – F) unterteilt (Banta et al., 1988; Raymond et al., 1992). Im Falle des Carboxypeptidase Y-Transports zur Vakuole wurde zunächst festgestellt, dass für diesen die zwei Proteine Vps10p, der Carboxypeptidase Y-Rezeptor wie auch Vps5p notwendig sind (Marcusson et al., 1994; Westphal et al., 1996). Neben der Abhängigkeit des Recyclings von Vps5p (Klasse B Vps-Mutante) zeigte sich, dass zwei weitere vakuoläre Proteinsortierungsmutanten *vps35* und *vps29* (Klasse A Vps-Mutanten) ebenfalls ähnliche Phänotypen wie die von *vps10* (Seaman et al., 1997) aufwiesen. Dabei kommt der anterograde Transport von Carboxypeptidase Y zum Erliegen. Der Rezeptor wird zur Vakuole transportiert und im Golgi vollständig dezimiert (Seaman et al., 1997).

In diesen Mutanten wird auch das normalerweise im TGN lokalisierte Modellprotein A-ALP zur Vakuole transportiert (siehe 3.6.3, sowie Notwehr et al., 1999). Durch diese Mutantenganalysen konnten in Hefen des weiteren noch folgende für das Recycling von Vps10p zum Golgi entscheidenden Proteine identifiziert werden: Vps17p sowie Vps26p (Horazdovsky et al., 1997; Seaman et al., 1998). Weitere Experimente mit Vernetzern (Cross-Linkern) zeigten, dass sich die genannten Proteine zu einem pentameren Komplex namens Retromer assemblieren, der an der Oberfläche des PVCs an den cytoplasmatischen Schwanz von Vps10p bindet (Seaman et al., 1998).

In Säugerzellen wurden RNAi-Experimente durchgeführt und so die mVps35- und mVps26-Konzentrationen stark abgesenkt. In der Folge kam es zu einer starken Hemmung des anterograden Transports der Hydrolase Cathepsin D (Seaman, 2004) und der kationenunabhängige Mannose-6-Phosphatrezeptor (CI-MPR) wurde entweder in den Lysosomen abgebaut oder zur Zelloberfläche transportiert (Arighi et al., 2004; Seaman, 2004).

Retromer bindet direkt an Vps10p via Vps35p, wobei Vps26p die Bindung zwischen Vps35p/Vps29p und der Membran erhöht (Reddy und Seaman, 2001). Außerdem ermöglicht die Bindung von Vps26p an Vps35p/Vps29p die Anlagerung von Vps17p und Vps5p an den trimeren Retromersubkomplex (Übersicht: Pfeffer, 2001 und Seaman, 2005). Enge Verwandte zu vier dieser fünf Proteine wurden in Säugerzellen identifiziert (Haft et al., 2000). Beim Homologen von Vps5p im Säugerkomplex handelt es sich um das Sorting Nexin 1 (SNX1). Ein Homologes zu Vps17p existiert im Säuger-Retromerkomplex nicht. Allerdings scheint dort sein Platz von Sorting Nexin 2 (SNX2) eingenommen zu werden, wobei diese Annahme immer noch umstritten ist (Gullapalli et al., 2004). Typisch für Vps5p und Vps17p, als auch SNX1 und SNX2 ist die Anwesenheit sogenannter BAR (coiled-coil) Domänen in ihren jeweiligen C-terminalen Regionen, die die Dimerisierung der zwei Polypeptide ermöglicht (Seaman und Williams, 2002).

Ebenso charakteristisch für SNX-Proteine sind die PX-Domänen, die die Bindung an Phosphatidylinositol 3-phosphat (PI-3P) ermöglichen (Yu und Lemmon, 2001). Demnach ist es wenig überraschend, dass Wortmannin als

Inhibitor der Phosphatidyl-3-kinase die Assoziation von Vps5p und Vps26p mit der endosomalen Membran beeinflusst (Cozier et al., 2002; Arighi et al. 2004). In Hefen ist *VPS34* das Gen der PI-3-Kinase, die zusammen mit einem Vps30p/Vps38p-Dimer unter anderem die Retromerfunktion im Organismus steuert (Burda et al., 2002). Erwartungsgemäß haben *vps34* und *vps38* Mutanten den gleichen Phänotyp wie *vps35* und *vps29* Mutanten (Seaman et al., 1997).

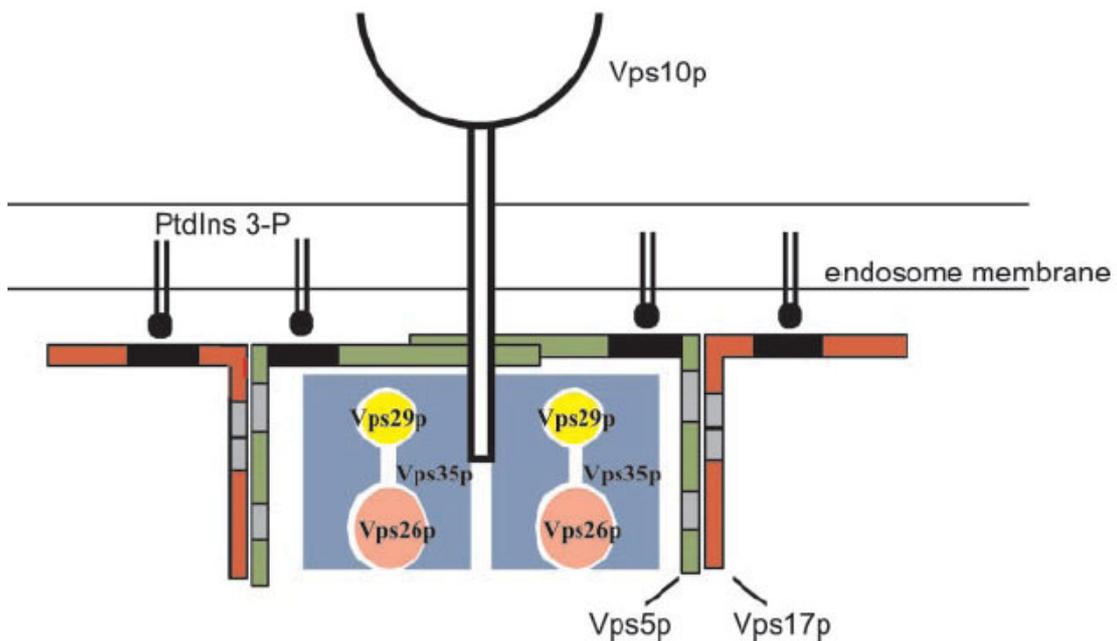


Bild 1-8: Aufbau des Retromerkomplexes. Der cytoplasmatische Schwanz von Vps10p wird von Retromer gebunden und der Rezeptor zum Golgi transportiert. Der Retromerkomplex besteht aus zwei Subkomplexen, ein kleinerer aus Vps5p und Vps17p und ein größerer aus Vps35p, Vps26p und Vps29p. Die Wechselwirkungen zwischen Vps5p und Vps17p werden dabei durch deren C-Termini vermittelt, während ihre N-Termini für die Bindung des großen frachterkennenden Subkomplexes an die Membran sorgen. Die Membranbindung kommt dabei vermutlich durch Bindung an Phosphatidylinositol-3-Phosphat über PX-Domänen (im Bild schwarz) zustande (Seaman und Williams, 2002).

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zur Bindung von Vps35p an Vps10p (Nothwehr et al., 1999) wurde kürzlich eine fast 200 Reste umfassende Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich des humanen Vps35 identifiziert, die für die direkte Bindung an den cytoplasmatischen Schwanz des CI-MPR verantwortlich ist. In dieser Sequenz befinden sich keine bekannten Bindemotive, so dass diese wahrscheinlich konformativer Natur sind (Arighi et

al., 2004). So besitzen weder die bei der Bindung beteiligten Aminosäurereste des CI-MPR (48-100) noch diejenigen des Vps35 (500-693) das tyrosinhaltige (YSKV, Reste 26-29) oder das saure Cluster-Dileucin-Motiv (Reste 153-162). Diese beiden Motive kommen ebenfalls im cytoplasmatischen Schwanz des CI-MPR vor und sind verantwortlich für die Sortierung desselben an der Plasmamembran bzw. dem TGN (Ghosh et al., 2003).

Obwohl der Beitrag von Retromer am Rezeptorrecycling vom PVC/Endosom in Hefen und Säugerzellen zweifelsfrei ist, wurden retromerbeschichtete Vesikel bisher weder *in situ* nachgewiesen noch isoliert oder *in vitro* induziert. Ferner scheint auch keine kleine GTPase wie Sar1 oder Arf1, die für die Rekrutierung der Hüllproteine in COP- oder clathrinbeschichtete Vesikeln benötigt werden (siehe 1.1.2) erforderlich zu sein. Neben den postulierten Vesikeln (siehe Modell Bild 1-9) werden auch Fusionstubuli als eine alternative Transportform diskutiert (Seaman, 2005).

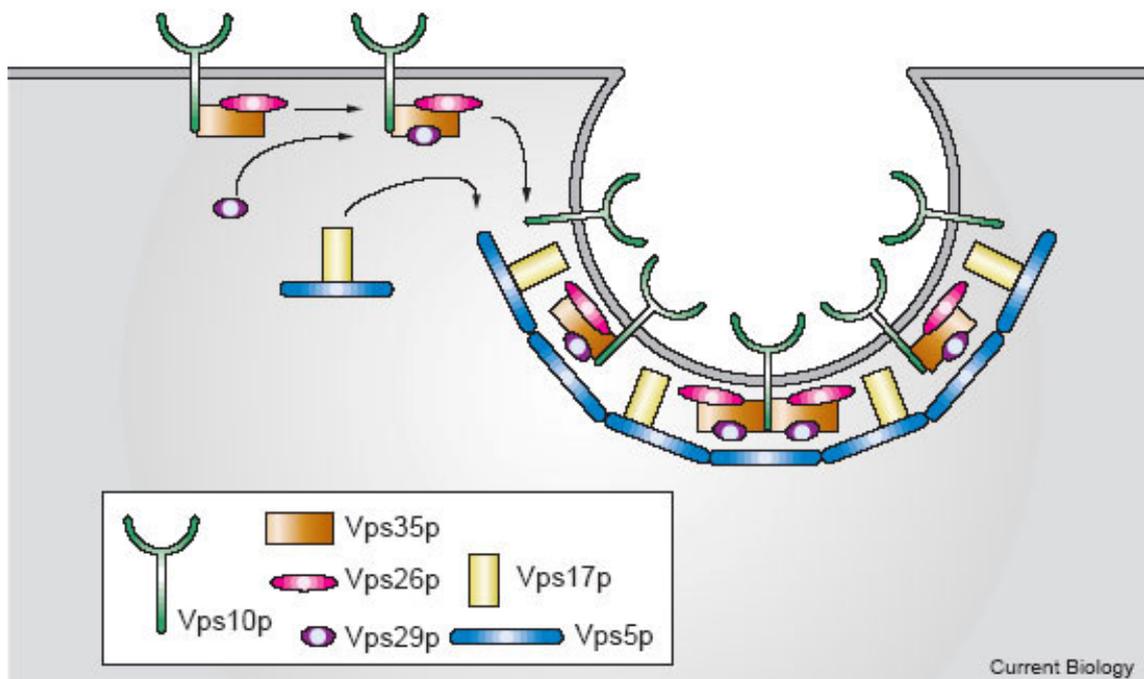


Bild 1-9: Modell der Bildung retromerbeschichteter Vesikel am Endosom. Das Modell umfasst die initiale Erkennung und Wechselwirkung von Vps35p mit dem cytoplasmatischen Schwanz der Fracht, hier im Bild Vps10p. Vps29p aktiviert anschließend Vps35p und führt zu einer Assemblage der Hüll- und Frachtproteine. Vps5p und Vps17p lagern sich dann an die Membran an und bewirken die Vesikelbildung. Im Vesikel bilden die frachterkennenden Subkomplexe aus Vps35p/Vps29p/Vps26p eine innere Hülle, während Vps5p/Vps17p die äußere Hülle bilden (Pfeffer et al., 2001).

Die enge Homologie zwischen den Bestandteilen des Retromers in Hefen und Säugern lässt vermuten, dass Retromer in der Evolution hochkonserviert ist und so auch in Pflanzen vorkommen sollte. Dieser Schluss wird auch durch die Arbeit von Haft et al. (2000) nahegelegt, die den hohen Grad an Konservierung zwischen dem Retromerkomplex aus Hefe und Mensch aufzeigte. In einer Datenbankrecherche wurden mögliche Homologe von Vps35 und Vps29 identifiziert (Dacks et al., 2003) und gezeigt, dass vor allem der in Vps35 entscheidende Asp123-Rest aus dem Hefeprotein (Nothwehr et al., 1999) auch in allen anderen betrachteten Arten konserviert ist, u.a. in *Arabidopsis* (Bild 1-10).

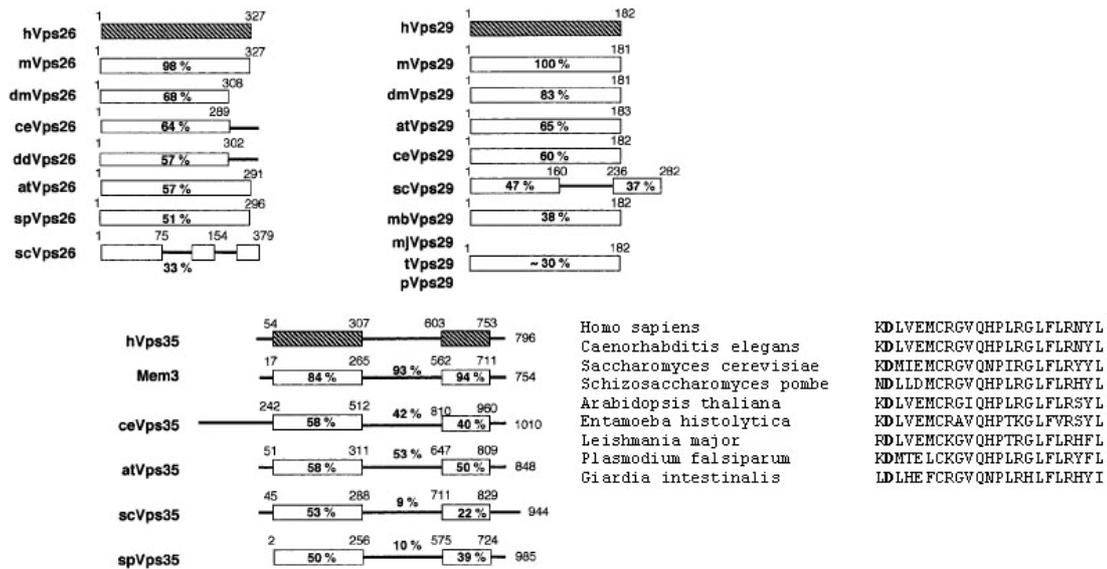


Bild 1-10: Genetische Verwandtschaft von Retromeruntereinheiten verschiedener Organismen. Die humanen Vps26, Vps29 und Vps35 sind evolutionär hoch konserviert. Abgebildet sind die angenommenen Domänenstrukturen von humanen (h) Vps26, Vps29 und Vps35, sowie deren verwandte Proteine aus *C. elegans* (ce), *S. cerevisiae* (se), *Schizosaccharomyces pombe* (sp), *Maus* (m), *A. thaliana* (at), *D. melanogaster* (dm), *Dictyostelium discoideum* (dd), *M. jannaschii* (mj), *M. thermoautotrophicum* (mb), *T. maritima* (t) und *P. abyssi* (p). Die konservierte Region von Vps35 von Aminosäureposition 131-153 (Nummerierung bezogen auf Vps35 aus homo sapiens). In Fettdruck ist die funktionell wichtige, vollständig konservierte Asp123-Position zu erkennen. Bild modifiziert nach Haft et al., 2000 und Dacks et al., 2003.

1.6 Ziel der Arbeit: Retromervermittelter Transport in Pflanzen

Durch die oben erwähnten Arbeiten, die zeigten, dass VSR_{At-1} im PVC von BY-2-Zellen angereichert ist (Li et al., 2002; Tse et al., 2004), erschien es folgerichtig der Frage nach dem Recycling der vakuolären Sortierungsrezeptoren in Pflanzen nachzugehen. In Hefe wurde für den vakuolären Sortierungsrezeptor der Carboxypeptidase Y, das Vps10p, der retromervermittelte Transport als Recyclingmechanismus identifiziert. Mittlerweile ist es in Hefen und Säugern gelungen genaue Vorstellungen vom retromervermittelten Recycling vakuolärer Sortierungsrezeptoren zu entwickeln und zu zeigen, dass der anterograde Transport zum prävakuolären Kompartiment direkt abhängig ist vom Funktionieren des retromervermittelten Rezeptorrecyclings zum TGN abhängig ist (Seaman, 2005). Neben einer hohen Homologie zwischen den jeweils am Transport beteiligten Proteinen gibt es eine starke Ähnlichkeit im vakuolären Transport selbst, so haben nicht zuletzt die vakuolären Sortierungsrezeptoren jeweils das PVC zum Ziel. Daher erscheint

es plausibel, dass auch in Pflanzen ein aus Retromerproteinen aufgebautes retrogrades Transportsystem für BP80 und dessen Homologe existiert.

Daher war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob in Pflanzen ein retromerartiger Komplex exprimiert wird und in diesem Fall erste Einblicke in dessen molekularen Aufbau zu gewinnen. Da in Hefe für Vps35 die Wechselwirkung mit dem vakuolären Sortierungsrezeptor Vps10 bekannt ist, sollte in einem ersten Schritt das pflanzliche Homologe aus *A. thaliana* identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurden zunächst Antikörper gegen Vps35 als dem primär mit dem Rezeptor interagierenden Baustein generiert. Zur weitergehenden Analyse der intrazellulären Lokalisierung des Komplexes, sowie seiner Wechselwirkungen wurden darauf weitere Antikörper gegen andere Untereinheiten (Vps26, Vps29) generiert.

Falls retromerartige Proteine in Pflanzen exprimiert werden sollte nicht nur ihrer Lokalisation und ihren Wechselwirkungen nachgegangen werden, sondern insbesondere auch die Natur eines eventuell vorhandenen retromervermittelten Transports untersucht werden: Ist er möglicherweise vesikulär und wenn ja, wie sehen diese Vesikel aus und wie groß sind sie ?

Des Weiteren sollten in einem *in vivo* Testsystem durch Messung sekretierter und retenierter Proteine zusätzlich erste Daten zur Funktion des retromervermittelten Transports gewonnen werden.

2 Ergebnisse

2.1 Identifikation von pflanzlichen Retromerhomologen

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es in Pflanzen einige Arbeiten zum rezeptorvermittelten, anterograden Transport der sauren Hydrolasen zur Vakuole. Unklar hingegen ist das Recycling ihrer Rezeptoren, also der retrograde Transport. In Hefe wurde für den vakuolären Sortierungsrezeptor der Carboxypeptidase Y, Vps10p, der retromervermittelte Transport als Recyclingmechanismus identifiziert. Des Weiteren existieren funktionelle Belege für Gemeinsamkeiten zwischen Vps10p und dem pflanzlichen BP80 (Humair et al., 2001), so dass es naheliegt auch in Pflanzen nach einem solchen aus Retromerproteinen aufgebauten Transportsystem für BP80 und dessen Homologe zu suchen. Der in Hefe beschriebene Retromerkomplex besteht aus 5 Proteinen (siehe Einleitung, sowie Seaman, 1998). Das Vorliegen des gesamten Arabidopsisgenoms erlaubt es, deren mögliche Homologe in *Arabidopsis* zu suchen und zu identifizieren.

Proteine enthalten verschiedene Domänen, die oft einem bestimmten evolutionären Ursprung oder einer bestimmten Funktion zugeordnet werden können. Die Conserved Domain Database (CDD) auf dem Webportal des NCBI ist eine Sammlung von Proteinsequenzzuordnungen (sog. Alignments) ursprünglicher Domänen und Vollängenproteinsequenzen. Durch die Suche in dieser Datenbank können konservierte Domänen auch in einer unbekanntem Proteinsequenz ermittelt werden.

Bei der Suche nach charakteristischen Domänensequenzen in den Heferetromerproteinen wurden nur zwei bekannte Domänen identifiziert. Bei diesen handelte es sich zum einen um die PX-Domäne in Vps5 und Vps17, sowie zum anderen um eine Phosphoesterasedomäne in Vps29. Zur Identifikation möglicher Homologe der Retromerproteine in *Arabidopsis* wurde zunächst mit Hilfe des BLAST-Algorithmus nach diesen charakteristischen Domänensequenzen der Retromerproteine gesucht.

Die PX-Domäne spielt eine entscheidende Rolle bei der Membranbindung, da sie eine spezifische Bindung an Phosphatidylinositol-3-haltige Membranen ermöglicht (Sato et al., 2001). Die Suche nach der PX-Domäne im Proteom von *Arabidopsis* identifizierte u.a. At5g06140, At5g58440, At5g07120 (siehe Tabelle 2-1), die möglicherweise eine PX-Domäne enthalten. Eine genauere Analyse durch ein ClustalW-Alignment bestätigte die charakteristischen Aminosäureabfolgen in der Sequenz der PX-Domänen bei den gefundenen Arabidopsisproteinen. Die in Bild 2-1 dargestellte Ähnlichkeit der beiden Sequenzen ist gemäß Yu und Lemmon (2001) hinreichend bezüglich der Eigenschaften der PX-Domänen, da die kritischen (im Bild markierten) Aminosäuren an den entscheidenden Positionen vorhanden sind.

```

NP_014712  YNLPQTGANISSPAEVEENSEKFGKTKIGSKVPPTEKAVAFKVEV KDPVKVGELTSIHVE
At5g06140  -----V TDPVKLGNVQAYIS
                                         *.*****: . . :.

NP_014712  YTVISESSLLELKYAQ--VSRRYRDFRWLYRQLQNNHWGKVIDPPPEKQSVG--SFKENF
At5g06140  YRVITKTNLPEYQGPEKIVIRRYSD FVWLRDRLFEKYKGFIFPLPEKSAVEKFRFSAEF
          * **:::. * * : .: * *** ** ** :* ::: * .*** **.* * . :*

NP_014712  IENRRFQMESMLKKICQDPVLQKDKDFLLFLTSDDFSESSEKRAFLTGSGAINDSNDLSE
At5g06140  IEMRRAALDIFVNRITALHPELQQSEDLRTFLQADEETMDRFR--FQETSIFKKPADLMQM
          ** ** :. ::::* . * **:::*: ** :*: : : : * * : : :.

```

Bild 2-1: ClustalW Alignment der Phox Homologie (PX)-Domäne von Vps5 aus Hefe und *Arabidopsis*. Die zur Bindung an Phosphatidylinositol-3-haltige Membranen entscheidenden, domänenbildenden Aminosäuren sind jeweils markiert. In pink ist dabei das für PX-Domänen charakteristische PXXP-Motiv zu erkennen. Im Weiteren sind die konservierten hydrophoben und aromatischen Reste in grün, konservierte basische Reste in blau, sowie konservierte amidische und saure Reste in rot gehalten. Nach Yu und Lemmon (2001) handelt es sich demnach auch bei der Domäne aus dem pflanzlichen Protein um eine PX-Domäne.

Neben der PX-Domäne war als einzige dokumentierte Domäne eine Phosphoesterasedomäne im humanen Vps29 beschrieben (Wang et al., 2005). Auch in *Arabidopsis* konnte ein Protein (At3g47810, siehe Tabelle 2-1) mit einer homologen Domäne identifiziert werden (siehe Bild 2-2). Inzwischen erschienen Arbeiten mit weiteren strukturellen und funktionellen Untersuchungen an Vps29-

Proteinen und der enthaltenen Phosphoesterasedomänen auch anderer Organismen (Damen et al., 2006; Collins et al., 2005).

```

hs  -MLVVLVLDLH10IPHR118CNSLPAKFKKLLVPGKIQHILCTGN118LCTKESYDYLKTLAGDVHIV
at  MVLVLAALGDLH10VPHR118AADLPPKFKSMLVPGKIQHIICTGN118LCIKEIH109DY109LKTICPDLHIV
      :***.*****:***. .**.***.:*****:***** ** :*****:. *:***

hs  RG62FDENLNYPEQKVVTVGQFKIGLI86HGHQVIPWGD109MASLALLQRQFD109V109DILISG118HT118HKF
at  RG62FDEDARYPENKTLTIGQFKLGLC86HGHQVIPWGD109LDL109SLAMLQRQLG109V109DILVTG118HT118HQF
      **:***: .***:*.:*:***:* * *****: ***:***: .***: .***:*

```

Bild 2-2: ClustalW Alignment der möglichen Phosphoesterasedomäne im AtVps29 (at), dargestellt mit dem zugeordneten humanen Vps29 (hs). In beiden Proteinen sind an den entscheidenden, markierten Positionen die zur Metallionenkomplexierung benötigten Aminosäuren vorhanden. Einzig der Aspartatrest 62D ist im pflanzlichen Protein gegen einen Glutamatrest 62E ausgetauscht. In rot markiert ist der Valinrest an Position 109, der für die Bindung an Vps35 entscheidend ist.

Die einzige in *Arabidopsis* vorkommende Isoform eines Homologen zu Vps29 (At3g47810) enthält neben dem für die Interaktion mit Vps35 kritischen Valin (109V) auch die Histidinreste an den Positionen 10 und 118, sowie das wasserstoffbrückenbindungsrelevante Asparagin (39N). Diese sind ebenso im humanen, wie auch im Hefe-Vps29 vorhanden und typisch für zweiwertige Metallionen-enthaltende Phosphoesterasen (Collins et al., 2005; Wang et al., 2005). Die Komplexierung des Metallions wird des weiteren von den Histidinresten 86H und 116H, sowie dem Glutamatrest 62E vervollständigt.

Die anschließende genomweite Suche mit den Sequenzen der Retromerproteine in voller Länge führte dann zur Identifikation der anderen in Tabelle 2-1 aufgeführten Pflanzenproteine. Diese ebenso durch den BLAST-Algorithmus erhaltenen Proteine wurden auch durch ein ClustalW-Alignment einander zugeordnet und sind den jeweiligen Hefeproteinen sehr ähnlich. Wie in Tabelle 2-1 zu erkennen, werden die einzelnen Arabidopsisretromerproteine teilweise von mehreren Genen kodiert, liegen also möglicherweise in mehreren Isoformen vor.

Tabelle 2-1: Übersicht der Retromerproteine der Hefe und ihren Homologen aus *Arabidopsis*

	Gen Accession Numbers der einzelnen Isoformen	Anzahl AS	Masse (kDa)	pI
Vps35	scVps35 (NP_012381)	944	109,1	5,87
	At2g17790 (NP_179370)	830	94,5	5,23
	At3g51310 (NP_190699)	789	89,0	5,18
	At1g75850 (NP_177713)	838	94,9	5,49
Vps26	scVps26 (NP_004887)	379	42,5	8,43
	At5g53530 (NP_200165)	302	35,2	7,67
	At4g27690 (NP_194499)	303	35,2	7,02
Vps29	scVps29 (NP_011876)	282	31,0	4,56
	At3g47810 (NP_974400)	190	21,0	6,03
Vps5	scVps5 (NP_014712)	675	76,5	5,09
	At5g06140 (NP_196232)	402	46,5	6,76
	At5g58440 (NP_200652)	587	65,5	5,18
	At5g07120 (NP_196329)	554	62,2	5,66

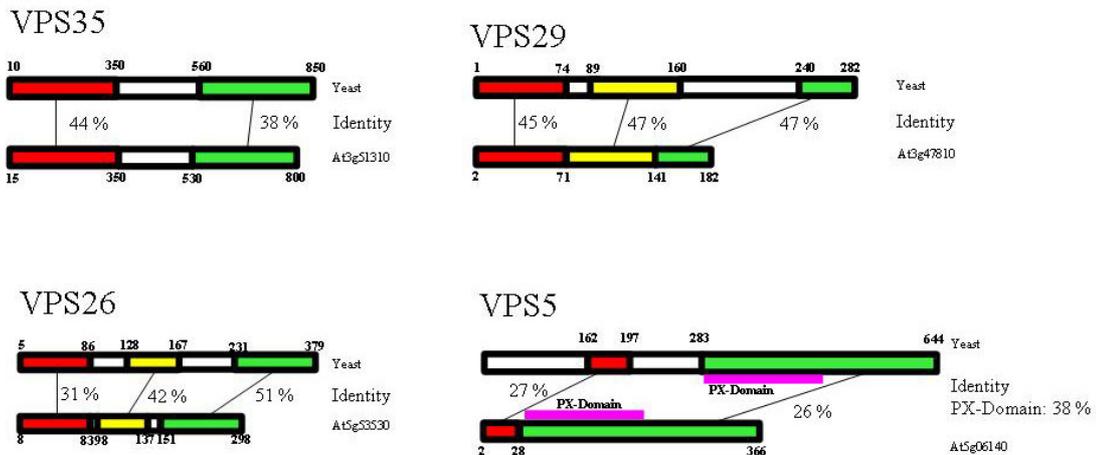


Bild 2-3: Das klonierte Protein aus *Arabidopsis* ist demjenigen aus Hefe zugeordnet und der Grad der Identität jeweils in Prozent angegeben. Die Identitäten liegen bei den einzelnen Domänen zwischen 25% bei Vps5 und maximal 51% bei Vps26. Auffällig ist, dass sämtliche Homologe aus Hefe deutlich länger als ihre jeweiligen Pendanten aus *Arabidopsis* sind. Einzig zu Vps17 lässt sich im Arabidopsisgenom kein Homologes identifizieren.

Es wurden drei Isoformen für Vps35 gefunden, eine für Vps29, zwei für Vps26 und drei für Vps5. Wie in Bild 2-3 dargestellt, besitzen alle in *Arabidopsis* gefundenen Homologe ihren Verwandten aus Hefe gegenüber ein hohes Maß

an Ähnlichkeit. Die Retromerproteine aus Hefe sind allerdings deutlich länger als ihre Homologen aus *Arabidopsis*. Einzig zu Vps17 war kein Homologes im Arabidopsisgenom zu identifizieren.

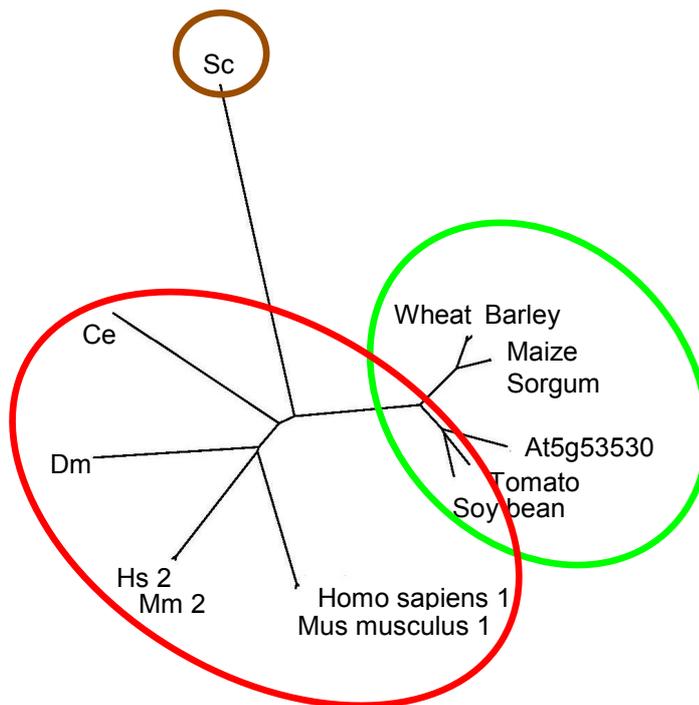


Bild 2-4:

Phylogenetischer Baum einer Vps26 ClustalW-Zuordnung unter Standardbedingungen. Die im Alignment des C-Terminus dargestellten Identitäten spiegeln sich hier im Verhältnis der Gruppen der pflanzlichen bzw. der tierischen Organismen im Vergleich zur Hefe wider.

Wie hoch die Identität bzw. Homologie der Retromerproteine ist, lässt sich bei der beispielhaften Betrachtung eines Alignments des C-Terminus von Vps26 verstehen. Beim C-Terminus von Vps26 handelt es sich um den höchst-konservierten Teil aller Retromerproteine (siehe Bild 2-5). Bei der phylogenetischen Analyse, dargestellt als Baum eines ClustalW-Alignments unter Standardbedingungen, wird aber auch klar, dass sich das aus Hefe stammende Protein sowohl von den pflanzlichen wie auch von den tierischen Proteinen am deutlichsten unterscheidet (siehe Bild 2-4). Diese bilden für sich genommen relativ homologe Äste desselben Baumes. Dies wird wie bereits erwähnt vor allem durch ein im Detail abgebildetes Alignment des C-Terminus von Vps26 verdeutlicht (siehe Bild 2-5). Ähnliche Aussagen lassen sich auch für Vps35 und Vps29 treffen (Haft et al., 2000).

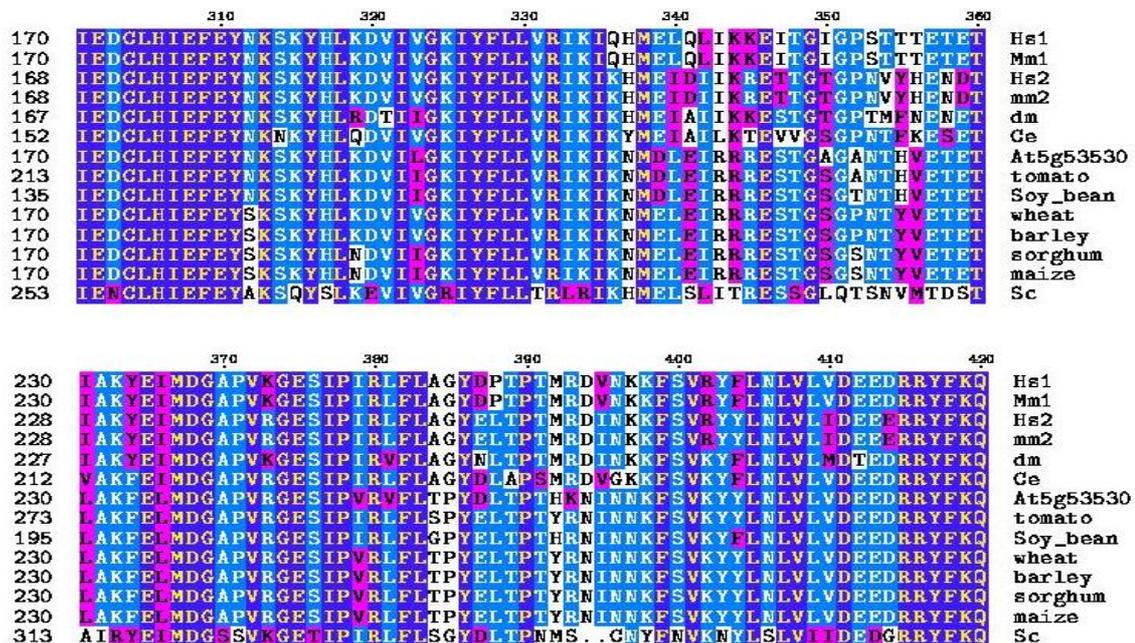


Bild 2-5: Mit 51% Identität ist der C-Terminus von Vps26 der am höchsten konservierte Teil aller Retromerproteine im Alignment von Hefe zu *Arabidopsis*. Hervorzuheben ist, dass sich die Hefesequenz trotzdem am deutlichsten von den pflanzlichen und tierischen Organismen unterscheidet, die ihrerseits jeweils untereinander fast identisch sind. Abgebildet sind sämtliche C-Termini der im Alignment und der phylogenetischen Analyse betrachteten Arten.

Die Erfahrungen bei den Proteinen der COP-Vesikel zeigten, dass diese in Pflanzen nicht nur homolog, sondern auch funktionell konserviert sind (Movafeghi, 1999; Pimpl, 2000; Yang, 2005). Auch bei den identifizierten Homologen der Retromerproteine aus *Arabidopsis* könnte demnach ebenso eine funktionelle Konservierung vorliegen.

Dies legt nahe, dass Untersuchungen zum retromervermittelten Transport neue Einsichten bezogen auf das Recycling vakuolärer Sortierungsrezeptoren in Pflanzen erbringen können.

2.2 Verschiedene Isoformen von Retromerproteinen

Wie im vorigen Abschnitt (siehe Tabelle 2-1) gezeigt, liegen bis auf Vps29 alle Retromerproteine in mehreren Isoformen vor. Welche dieser Isoformen allerdings als RNA transkribiert und als Protein exprimiert werden, blieb zu klären. Daher wurde zuerst aus *Arabidopsis*blättern und -sprossen Gesamt-RNA gewonnen und daraus cDNA hergestellt. Mit dieser cDNA konnte

anschließend für Vps35 nachgewiesen werden, dass alle Isoformen auf RNA-Ebene in diesen Geweben transkribiert werden (siehe Bild 2-6 A). Die Amplifikationsprodukte, die allesamt die erwartete Länge von ca. 2500bp aufwiesen, wurden isoliert und deren Sequenzen durch Sequenzierung bestätigt. Zumindest für Vps35 lässt sich eine gewebsspezifische Kontrolle der Expression der Isoformen damit ausschließen, wobei eventuell unterscheidbare Expressionsniveaus, beispielsweise durch quantitative Echtzeit-PCR-Methoden, genauer untersucht werden müssten. Auch von den anderen Retromerproteinen konnte die jeweils gewünschte Isoform aus der hergestellten cDNA mit den entsprechenden sequenzspezifischen Primern problemlos isoliert werden (siehe Bild 2-6 B – D). Die unterschiedlichen Expressionsniveaus und -orte der verschiedenen Isoformen waren in dieser Arbeit allerdings nicht von weitergehendem Interesse und wurden daher auch nicht eingehender untersucht.

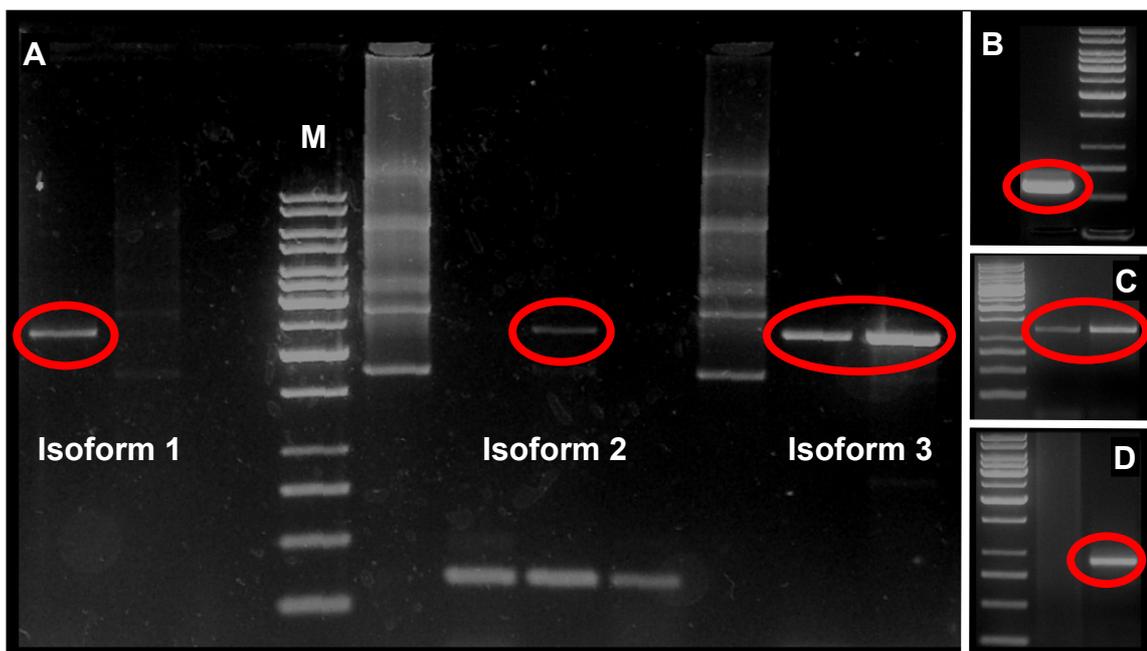


Bild 2-6: **A:** PCR-Produkte der 3 verschiedenen *Arabidopsis* VPS35-Isoformen. Alle drei Isoformen konnten mittels PCR aus verschiedenen cDNA-Pools mit den für die jeweilige Isoform spezifischen Primern amplifiziert werden. In der linken Bahn, jeweils ohne spezifisches Produkt, wurde eine cDNA-Bank (CD4-16) verwendet, in den rechten 3 Bahnen cDNA aus Gesamt-RNA, gewonnen aus ganzen *Arabidopsis*pflanzen. Die letztgenannten PCRs wurden mit unterschiedlichen Temperatur- und Konzentrationsprofilen durchgeführt. Umrandet sind die später durch Sequenzierung bestätigten VPS35-Amplifikationsprodukte. M: DNA-Größenmarker. Auch die anderen Retromerproteine konnten mit ihrer korrekten Größe aus cDNA amplifiziert werden **B:** VPS29 (573 bp), **C:** VPS5 (1209 bp), **D:** VPS26 (918 bp).

2.3 Klonieren und Exprimieren einzelner Retromerproteine

Der Zugang zu größeren Mengen rekombinanter Retromerproteine ist aus zweierlei Gründen interessant. Zum einen sollten die Proteine des großen Retromersubkomplexes (Vps35, Vps26 und Vps29) zur Herstellung von Antikörpern rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Darüber hinaus bestand die Absicht mit rekombinanten Proteinen des Retromerkomplexes Bindungsstudien innerhalb des Komplexes sowie Experimente zur Protein-Proteininteraktion beispielsweise mit Hilfe von Pulldown-Assays durchzuführen. Hierfür war vor allem der Zugang zu Vps35 von Interesse, da es sich bei diesem um den primären Interaktionspartner von Vps10p handelt.

Zur rekombinanten Expression in *E. coli* wurden die Sequenzen mit der höchsten Homologie zum korrespondierenden Hefeprotein ausgewählt (siehe 2.1). Von allen vier in *Arabidopsis* bekannten Retromerproteinen wurden zunächst deren Gene in das pGEM-T-easy System kloniert und ihre Sequenz bestimmt. Anschließend wurden die Gene in Expressionsvektoren mit GST-Tag kloniert und versucht diese unter den üblichen Bedingungen an GSH-Beads aufzureinigen. Es zeigte sich allerdings recht schnell, dass zwar ein erhebliches Expressionsniveau der Fusionsproteine vorhanden war, diese aber unter den Normalbedingungen nicht im Lysispuffer zu lösen waren. Das Problem der Bildung sogenannter Einschlusskörper (inclusion bodies) trat auch bei der rekombinanten Expression der Retromerproteine aus Hefe auf (persönliches Gespräch mit M. Seaman). Verursacht wird dies durch die fehlende Maschinerie der *E. coli*-Bakterien eukaryotische Proteine zu modifizieren und zu falten (Alberts et al., 2003). Deshalb wurde versucht über ein Screening mögliche Bedingungen zur löslichen Expression zu finden.

Die Variablen bei der rekombinanten Expression von Proteinen in *E. coli* beziehen sich dabei vor allem auf drei Parameter: Erstens auf das Expressionsniveau, das beispielsweise durch verschiedene Temperaturen bei der Bakterienkultivierung oder durch Verwendung verschiedener Expressionsvektoren mit unterschiedlich starken Promotoren gesteuert werden kann. Zum zweiten können auch die Fusionsproteine selbst abgewandelt werden, beispielsweise durch die Expression von unterschiedlichen Tags die

nach der Aufreinigung auch wieder entfernt werden können. Schließlich neigen drittens verschiedene Bakterienstämme unterschiedlich stark zur Bildung von Einschlusskörpern. Nach der Induktion der Expression, üblicherweise durch IPTG, können auch die Expressionstemperatur und die Expressionsdauer variiert werden.

Das in dieser Arbeit durchgeführte Screening beruhte vor allem auf der Variation der Lysisbedingungen. Dabei wurden die Bakterien in unterschiedlichen Lysispuffern resuspendiert und lysiert. Neben der Variation der Lysisbedingungen wurden in dem durchgeführten Screening außerdem die Kultivierungstemperatur von 16°C bis 24°C variiert, sowie unterschiedliche Expressionsvektoren in verschiedenen Bakterien verwendet. Das Hauptaugenmerk des Screenings lag auf der Variation der physikochemischen Eigenschaften des Lysispuffers, da diese auch erhebliche Auswirkungen auf die Löslichkeit der Fusionsproteine haben. So können neben der Salzart und -konzentration auch der pH-Wert, die Detergenzienkonzentration, sowie die Verwendung eines Stabilisators oder eines Denaturierungsreagenz variiert werden .

In einem standardisierten Verfahren wurden für Vps35, Vps29 und Vps26 folgende Parameter bei der Lyse verändert und deren Auswirkungen auf die Löslichkeit untersucht:

- pH-Wert: Lysispuffer mit pH 5, 6, 7, 8 und 9
- Salzkonzentration: 0,1M, 0,5M, 1M NaCl, sowie 0,1M und 1M KCl
- Detergenzien: jeweils 0,2% NP40, Triton X-100, Tween-20, NaDOC
- Stabilisator Glycerin: 10% und 50%

Des Weiteren kamen im Screening die folgenden Expressionssysteme zum Einsatz:

His-Tag mit Promotor aus pET30, aus pPROEXTMHT, sowie aus pQE. GST-Tag aus pGEX-T, sowie ein selbst modifizierter pET24-Vektor mit His-, GST-Tag und einer TEV-Schnittstelle (Übersicht, siehe Bild 2-7). Die Expression der pET-Vektoren und des pPROEXTMHT-Vektors erfolgte in zwei Bakterienstämmen,

nämlich Rosetta™ (Novagen), sowie BL21-CodonPlus (Stratagene). Beide besitzen zusätzliche Plasmide zur Herstellung von tRNAs sogenannter seltener Codons.

	amp ^R	kan ^R	Promotor	His-Tag	GST-Tag	Protease
pET-21a-d(+)	●		T7lac	C		
pET21-GSTTEV	●		T7lac	N, C	N	TEV
pET-23a-d(+)	●		T7	C		
pET-24a-d(+)		●	T7lac	C		
pET24-GSTTEV	●		T7lac	N, C	N	TEV
pET-30a-c(+)		●	T7lac	N,C		Thr, EK
pProEXHT	●		trc	N		TEV
pQE	●		T5	N		
pGEX-T	●		tac		N	Thr

Bild 2-7: Übersicht über die verwendeten Vektoren. Die aufgeführten Vektoren unterscheiden sich durch die Stärke ihrer Promotoren, Selektionsmarker, unterschiedliche Affinitätstags und Linker, d.h. den verbindenden Aminosäuresequenzen zwischen dem Tag und dem Protein. Dies sind Faktoren, die einen hohen Einfluss auf das Expressionsniveau und die Tertiärstruktur eines Proteins haben und damit auch auf seine Löslichkeit. Amp^r: Ampicillinresistenz, Kan^r: Kanamycinresistenz, N bzw. C N- oder C-terminale Position des Tags, Proteaseschnittstellen zum Entfernen der Tags vom Protein: Thr: Thrombin, EK: Enterokinase, TEV: TEV-Schnittstelle.

Das gesamte Screening in allen durchgeführten Variationen umfasste damit durch Anwendung von 16 verschiedenen Lysispuffern, 8 unterschiedlichen Vektor- *E. coli*-Kombinationen und 2 Expressionstemperaturen insgesamt pro Protein 256 verschiedene Bedingungen, die auf ihren Einfluss bezüglich der Löslichkeit der zu exprimierenden Proteine untersucht wurden.

Sämtliche Variationen zum Erreichen einer Aufreinigung von löslichen Retromerproteinen unter nativen Bedingungen brachten jedoch keinen Erfolg

(siehe Bild 2-8). Damit teilen die pflanzlichen Retromerproteine diese Eigenschaft mit ihren Homologen aus Hefe, wie Matthew Seaman in einem persönlichen Gespräch bestätigte.

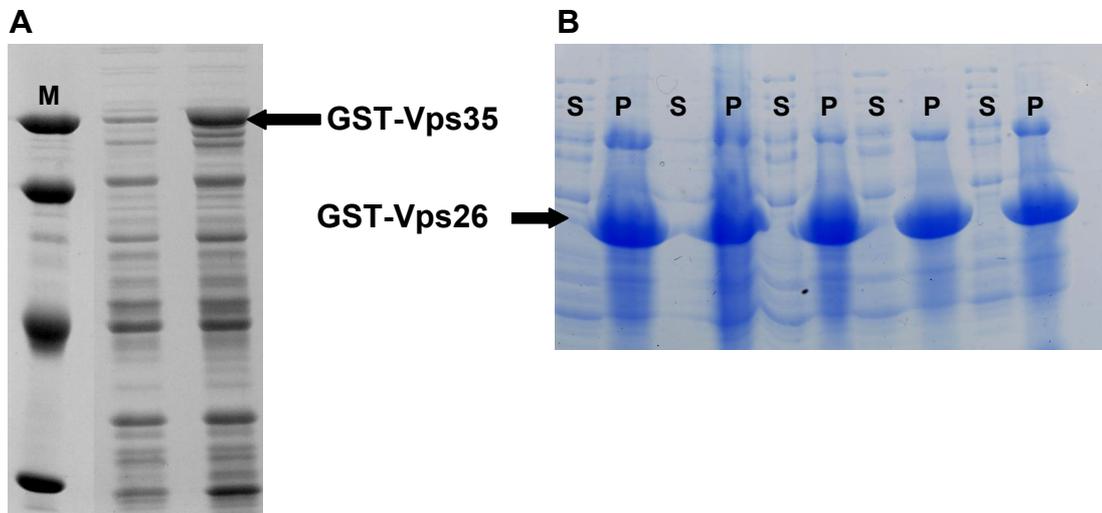


Bild 2-8: Exemplarische Darstellung eines Solubilisierungsexperimentes mit Trennung der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach Bakterienlyse durch Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung. Hier abgebildet ist ein Solubilisierungsversuch an Vps26 (B). Zu erkennen ist die ebenso bei allen anderen Lysierungen festgestellte Tatsache, dass die Proteine zwar überexprimiert wurden, wie in der Abbildung am Beispiel von GST-Vps35 zu sehen (A), allerdings nie in der löslichen Fraktion (S), sondern stets im Sediment (P) zu detektieren waren. Dargestellt am Beispiel des Löslichkeitsscreens von GST-Vps26 (B). Dies war bei allen untersuchten Proteinen unter jeder Lysisbedingung der Fall. M: Protein-Größenmarker.

Aus anderen Arbeiten (Lutzmann et al., 2002) ist bekannt, dass bei der Expression von eukaryotischen Proteinen aus Multiproteinkomplexen die sogenannte multicistronische Expression, die man natürlicherweise aus dem Lac-Operon kennt, auch Abhilfe schaffen kann und so lösliche Proteinkomplexe erhalten werden können. Hierzu wurden erste Versuche durchgeführt, und vor allem die Voraussetzungen geschaffen diese durch einfache, modulartige Klonierung aus den vorhandenen Expressionsvektoren weiterzuführen. Die multicistronischen Klonierungen wurden unter Verwendung der in den verschiedenen benutzten pET-Vektoren angelegten Schnittstellen durchgeführt. Dabei ist es möglich von einem Vektor z.B. mittels XbaI / BamHI – Spaltung das gesamte Gen inklusive seiner Shine-Dalgarno-Sequenz und eventuell vorhandenen Tags in die passenden, mit NheI / BamHI gespaltenen, kohäsiven

Enden des Zielvektors zu klonieren und damit ein entsprechendes multicistronisches Konstrukt zu erhalten. Dadurch wird die NheI-Schnittstelle im Zielvektor inaktiviert und es lässt sich auch am neu entstandenen Vektor die gesamte Prozedur identisch wiederholen, wodurch nach und nach mehrere Gene hintereinander kloniert werden können (siehe Bild 2-9).

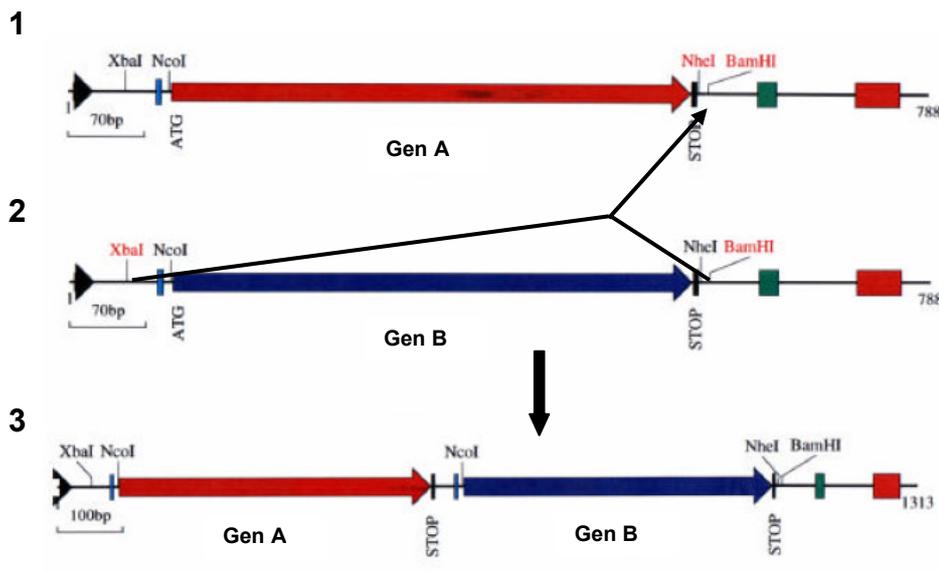
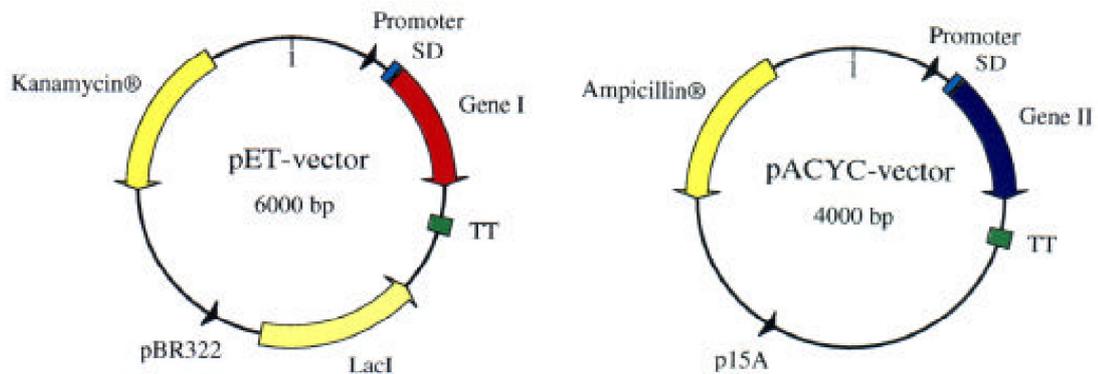


Bild 2-9: Kassettensystem zur modulartigen Klonierung zweier Gene in einen pET-Vektor. Nach erfolgreicher Klonierung beider Gene zwischen die NcoI- und die NheI-Schnittstelle wird der Vektor mit dem Gen A mit NheI und BamHI gespalten (1) und aus dem Vektor mit dem Gen B dieses inklusive seiner Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Tag mit XbaI und BamHI ausgeschnitten (2). Gen B kann anschließend in den mit NheI/BamHI gespaltenen Vektor ligiert werden, da NheI und XbaI sog. kohäsive Enden aufweisen. Nach dieser Ligation ist an Stelle der ehemaligen NheI und XbaI-Schnittstelle deren palindromische Sequenz nicht mehr vorhanden (3), so dass dieser Vorgang mit weiteren Genen theoretisch beliebig oft wiederholt werden kann.

Zur rekombinanten Expression mehrerer Proteine in einem Bakterium stehen grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die auch miteinander kombiniert werden können. Zum einen kann sie durch multicistronische Expression von mehreren Proteinen auf einem Vektor erfolgen oder alternativ durch Kotransformation in zwei voneinander unabhängigen Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern. Bei letztgenannter Möglichkeit müssen erfolgreiche Kotransformanten durch Doppelselektion erhalten werden (siehe Bild 2-10).

A Expression in zwei verschiedenen Vektoren



B Dizistronische Expression in einem Vektor

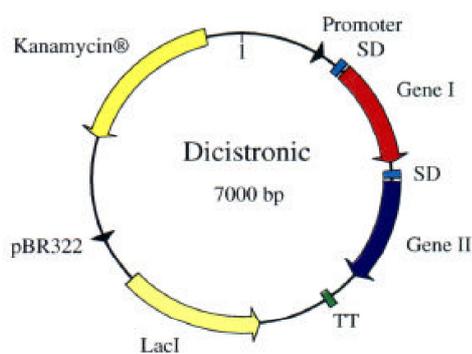


Bild 2-10: Expression mehrerer Proteine in einem Bakterium. Die Expression unterschiedlicher Proteine in einem Bakterium kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Zum einen durch Kotransformation in zwei voneinander unabhängigen Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern zum anderen durch multicistronische Expression von mehreren Proteinen auf einem Vektor. Bild abgewandelt nach: www.embl.de/ExternalInfo/protein_unit/draft_frames/flowchart/exp_e_coli/co-expression.html.

Die Anordnung der Gene und die Entscheidung welche Gene welche Tags tragen kann für die Löslichkeit eine Rolle spielen (www.embl.de/ExternalInfo/protein_unit/draft_frames/index.html). In dieser Arbeit wurde zunächst nur die Möglichkeit der grundsätzlichen Einsetzbarkeit des Verfahrens überprüft. Tatsächlich gelang es, in einen Vektor zwei Gene, nämlich GST-Vps29 und GST-Vps26 zu klonieren und diese gleichzeitig in einem Bakterium zu exprimieren. Ebenso gelang die Expression beider Proteine auf unterschiedlichen Vektoren mit unterschiedlichen Selektionsmarkern (siehe Bild 2-11). Von allen Genen liegen im jetzigen

Stadium Konstrukte vor, die an ihrer 5'-Seite in die NcoI und am 3'-Ende in die NheI-Schnittstelle kloniert wurden. Damit besteht eine einfache Möglichkeit zur künftigen multicistronischen Klonierung der Retromerproteine nach dem oben aufgezeigten Schema (siehe Bild 2-9). Eine testweise durchgeführte Solubilitätsstudie mit den wichtigsten Parametern zeigte keine erhöhten Löslichkeiten zur erleichterten Reinigung auf.

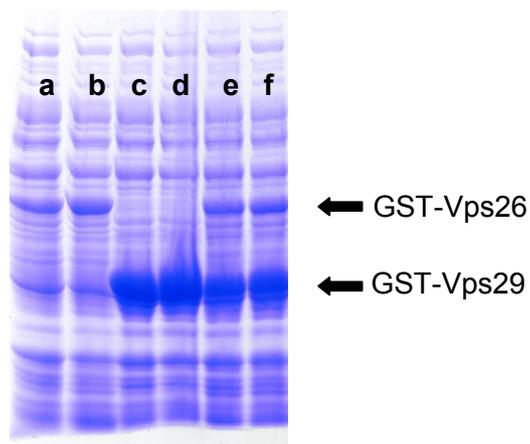


Bild 2-11: Überexpression zweier Proteine in einem Bakterium. Dabei wurden zwei Vektoren mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen in ein Bakterium transformiert. Links die Überexpression von GST-Vps26, in der Mitte von GST-Vps29 jeweils alleine und in den rechten Bahnen (e und f) gemeinsam, wobei in den Bahnen a,c jeweils ein Vektor mit Ampicillinresistenz und in b,d mit Kanamycinresistenz verwendet wurde. Bei der Kotransformation wurden beide Möglichkeiten getestet.

Trotz dieser Löslichkeitsprobleme konnten ausreichend Antigene für eine erfolgreiche Immunisierung von Kaninchen zur Antikörperherstellung gewonnen werden (siehe 2.4).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteinen, die allesamt unlöslich waren, gelang bei Vps5 eine rekombinante Expression, die zu löslichem Protein führte. Bei der Aufreinigung des mit GST markierten Arabidopsishomologen war allerdings festzustellen, dass das Protein zu Abbau neigt (siehe Bild 2-12). Ein sehr ähnliches Verhalten zeigte auch das in der Literatur beschriebene, korrespondierende Protein aus Hefe (Seaman, 1998).

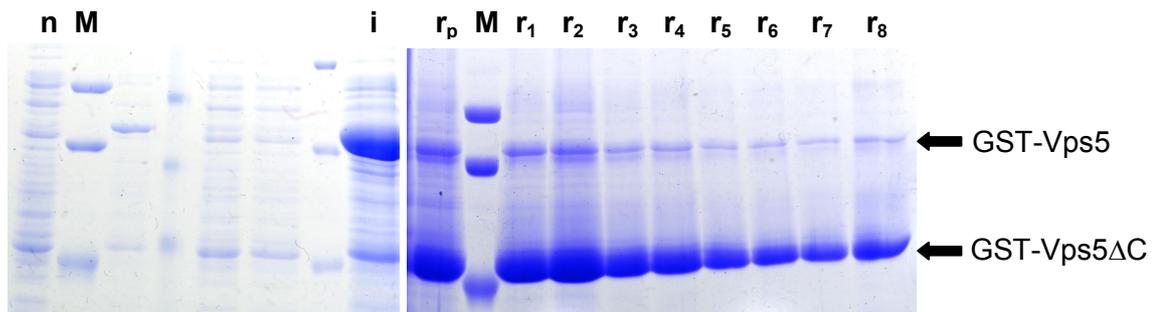


Bild 2-12: Aufreinigung von rekombinantem GST-AtVps5. Nach Induktion wurde das GST-AtVps5 in der erwarteten Größe exprimiert (i). Die lösliche Fraktion der GST-AtVps5 exprimierenden Bakterien wurde nach deren Lyse an GSH-Beads gebunden. Nach der Aufreinigung über GSH-Sepharose-Beads zeigte sich allerdings ein C-terminaler Abbau, da nach fraktionierter Elution ein Protein detektiert wurde, das deutlich kleiner war (r_1 bis r_8). Bei diesem handelte es sich ganz offensichtlich um ein Abbauprodukt des vorher in voller Länge vorliegenden Proteins (i). Ein ähnliches Phänomen ist auch aus Hefe bekannt (Seaman, 1998) M: Protein-Größenmarker; n: nicht induzierte Kontrollkultur; i: induzierte *E. coli*-Kultur; r_p : vereinigte Eluate r_1 bis r_8 .

2.4 Herstellung der Antikörper

Zur weiteren Charakterisierung des Retromerkomplexes war es notwendig gegen die einzelnen Retromerproteine Antikörper herzustellen.

Da wie im vorigen Kapitel dargestellt die Gewinnung von nativen, löslichen Retromerproteinen misslang, mussten diese zur Herstellung von Antikörpern unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden. Zur Gewinnung von aufgereinigten Fusionsproteinen wurde eine sogenannte „on-column-Refolding“-Aufreinigung der His-Tag-tragenden Fusionsproteine versucht. Hierbei werden die Fusionsproteine aus dem unlöslichen Bakteriensediment, das fast ausschließlich aus dem Fusionsprotein bestand, mit einem 8 M Harnstoff enthaltenden Puffer herausgelöst und anschließend an eine Nickel-Säule gebunden. Während des anschließenden Waschvorgangs wurde im Waschpuffer die Harnstoffkonzentration graduell von 8 M auf 0 M Harnstoff gesenkt, so dass sich die Proteine langsam rückfalten konnten. Diese Vorgehensweise ist aus der Literatur bekannt und führt im Einzelfall auch zu aktiven Proteinen mit korrekter Faltung (Glynou, K. et al., 2003). Bei der Aufreinigung der Retromerproteine war diese Methode allerdings nicht von Erfolg gekrönt, da die Ausbeuten extrem niedrig waren und der Hauptteil der Fusionsproteine nicht an die Nickelsäule gebunden hatten. Die abschließende Abspaltung des Tags mit TEV-Protease gelang zwar noch, allerdings fiel bei

diesem Schritt nochmals ein großer Anteil des Fusionsproteins aus, das ohnehin nur in geringen Mengen an der Nickelsäule gebunden hatte. In Bild 2-13 ist zu erkennen, dass die Absorption des TEV-gespaltenen Fusionsproteins im Signalrauschen liegt. Dies machte bei den geringen vorhandenen Mengen eine präparative Aufreinigung des Vps26 mittels Gelfiltration unmöglich.

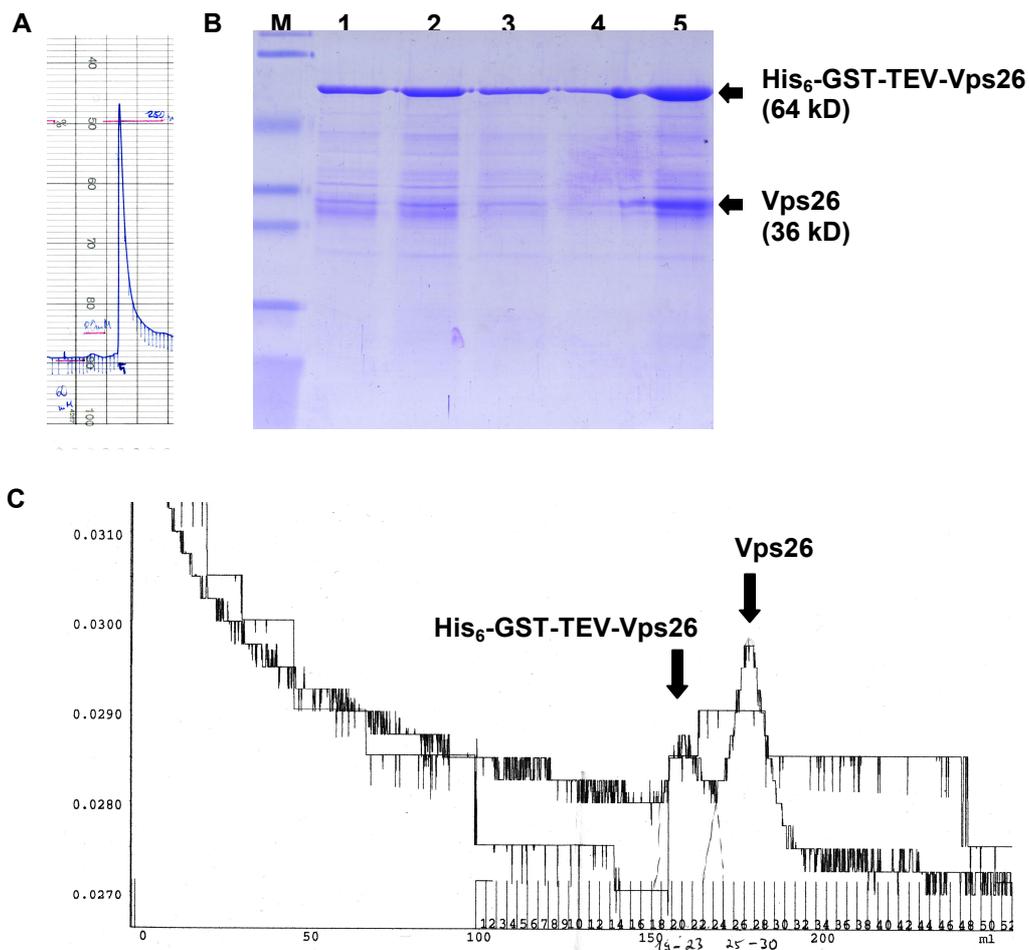


Bild 2-13: Aufreinigung des TEV-gespaltenen Fusionsproteins His₆-GST-TEV-AtVps26. Das Fusionsprotein wurde zunächst unter denaturierenden Bedingungen mit 8M Harnstoff solubilisiert und anschließend an Nickel-NTA gebunden. Nach Elution mit 250mM Imidazol (A) wurde das Eluat über Konzentratoren eingengt und mit TEV-Protease versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Gelfiltration aufgereinigt und fraktioniert (C). Das Signal des aufgereinigten AtVps26-Proteins liegt wie unschwer zu erkennen ist im Signalrauschen. AtVps26 lag nur in kleinen Mengen vor und war ferner unter diesen Bedingungen nicht vom Tag-tragenden Protein zu trennen. Damit ist klar, dass dieses Verfahren zur Herstellung präparativer Mengen der Retromerproteine ungeeignet ist. Die Bahnen im mit Coomassie gefärbten Gel (B) sind wie folgt bezeichnet: M Molekularer Massenstandard, 1 und 2 solubilisierte Einschlusskörper, 3 an Nickelsäule ungebundenes Fusionsprotein, 4 250mM Imidazol-Eluat, 5 TEV-Reaktionsprodukt

Da aber das Sediment nach dem Aufbruch der Zellen fast ausschließlich aus dem gewünschten Fusionsprotein bestand (siehe Bild 2-13 B), wurde es direkt durch präparative SDS-Gelelektrophorese gereinigt. Die Elektrophorese wurde in 1 mm dicken Gelen durchgeführt und die gewünschten Banden anschließend mit KCl-Lösung gefärbt und ausgeschnitten. Die erhaltenen Gelstücke wurden elektroeluiert und das gewonnene Protein konzentriert, um es zur Antikörperherstellung zu verwenden. Das gereinigte Protein wurde zur Herstellung von Antikörpern aus Kaninchen (New Zealand White) verwendet. Polyklonale Antikörper wurden auf diese Weise gegen die rekombinanten GST-Fusionsproteine von Vps35, Vps29 und Vps26 gewonnen und anschließend an Gesamtmembranextrakten aus *Arabidopsis* und Hefe getestet (siehe 2.5 und 2.6).

2.5 Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern aus Hefe und *Arabidopsis*

Es stellte sich die Frage, ob sich die vorhandenen Antikörper gegen *Arabidopsis*retromerproteine auch in Hefe anwenden ließen. Da Antikörper gegen die Proteine des Retromers aus Hefe vorlagen, die freundlicherweise von Matthew Seaman zur Verfügung gestellt wurden, lag es nahe zu testen, ob diese auch die Retromerproteine aus *Arabidopsis* erkennen würden. Diese sogenannte Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen die homologen Proteine anderer Spezies konnte schon erfolgreich in speziesübergreifenden Experimenten genutzt werden (Holstein, 1994).

Wie in Bild 2-14 zu sehen, ist alleine bei Verwendung der Antikörper gegen das *Arabidopsis* Vps26 eine Kreuzreaktivität zum korrespondierenden Hefeprotein zu beobachten. Keiner der zwei Antikörper gegen nichtpflanzliche Retromerproteine (Anti-Hefe ScVps35p und Anti-Maus MmVps26) erkannte ein Pflanzenprotein in den untersuchten Extrakten.

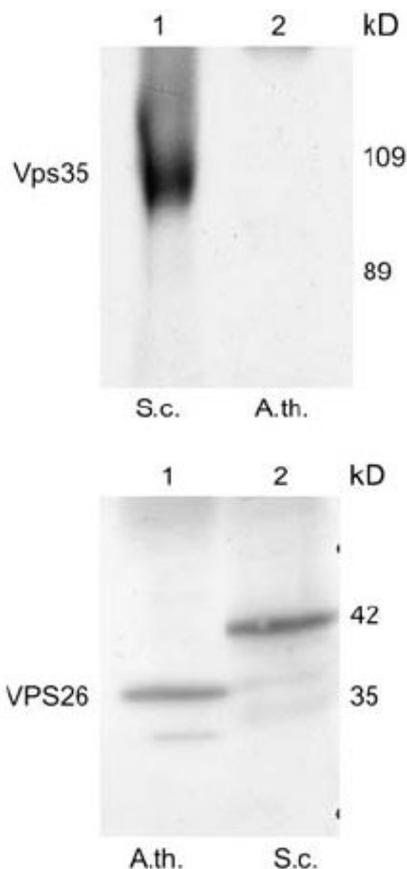


Bild 2-14 Nur mit dem AtVps26 Antiserum konnte eine Kreuzreaktivität mit dem korrespondierenden Protein aus Hefe nachgewiesen werden (B) Antikörper gegen das Hefe Vps35 erkannten hingegen keinerlei Proteine in Pflanzenextrakten (A).

2.6 Verteilung der Retromerproteine in subzellulären Fraktionen

Bei der proteinbiochemischen Charakterisierung von neu zu beschreibenden Proteinen geht es zunächst um die Frage, ob diese Proteine membrangebunden oder cytosolisch in der Zelle vorliegen. Zur Untersuchung der Verteilung zwischen membrangebundenen und cytosolischen Proteinen wurde ein Fraktionierungsschema gewählt, das bereits erfolgreich in Hefen und Pflanzen angewandt wurde: siehe hierzu beispielsweise Rojo et al. (2003), Seaman et al. (1998) und Nothwehr et al. (2000).

Die Homogenate von *Arabidopsis*- und Tabak-BY-2-Zellen wurden filtriert und aufeinanderfolgenden Zentrifugationen bei 13000g und 100000g unterworfen. Die drei erhaltenen Fraktionen P13 und P100 (Sedimente) und S100 (Überstand) unterscheiden sich durch unterschiedlich angereicherte Zellbestandteile. Während Mitochondrien, Chloroplasten und Zellwandbestandteile hauptsächlich im P13-Sediment vorliegen, enthalten die

restlichen bei 100000g sedimentierten Membranen Organellen wie ER, Golgi und andere (P100). Der Überstand (S100) beinhaltet lösliche Proteine. Alle drei Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immunoblot gegen AtVps35, AtVps26 und AtVps29 Antikörper untersucht. Wie in Bild 2-15 zu erkennen, ist Vps35 sowohl in *Arabidopsis* wie auch in Tabak-BY-2 -Zellen hauptsächlich in den beiden Membranfraktionen vorhanden, aber auch mit einem kleinen Anteil in der löslichen S100-Fraktion. Im Gegensatz dazu war wesentlich mehr des Vps26 Proteins in der S100 Fraktion zu finden als in den zwei Membranfraktionen. Bei Vps29 ist die Situation analog zu der von Vps35. Ähnliche Verteilungsunterschiede konnten auch schon in Hefe zwischen den einzelnen Retromerproteinen beobachtet werden (Paravicini et al., 1992; Seaman et al., 1998). Als Erklärung dieser Verteilung wurde von Seaman et al. (1998) vorgeschlagen, dass Vps35p im wesentlichen an das Prävakuläre Kompartiment (PVC) bindet, um den Rezeptor Vps10p zu rekrutieren. Im Gegensatz dazu soll Vps29p vermutlich im Verbund mit Vps26p dann die Bildung von oligomeren Vps35p/Vps10p-Komplexen in Domänen der Membranknospung ermöglichen.

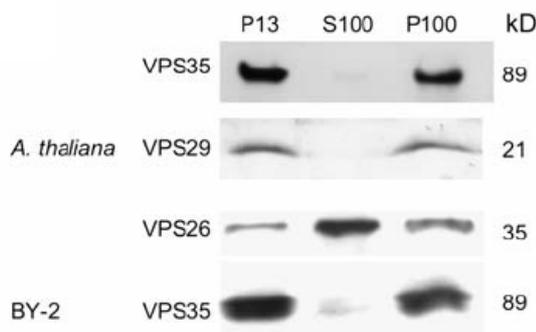


Bild 2-15: Reaktionen der Antikörper gegen *Arabidopsis* Retromerproteine und deren Lokalisation in Subzellulären Fraktionen von *Arabidopsis*- und Tabak-BY-2 -Suspensionszellkulturen. P13 ist das Membransediment nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 13000 g, P100 ist das Sediment aus der nachfolgenden einstündigen Zentrifugation des P13-Überstands bei 100000 g. S100 ist der lösliche Überstand nach dieser letzten 100000 g Zentrifugation. Die Immunoblots wurden mit Vps35-, Vps26- und Vps29-Antikörpern untersucht. Es wurden jeweils 40 µg Protein pro Bahn geladen.

2.7 Abgelöste Vps35, Vps29, Vps26 Proteine verbleiben zusammen als Subkomplex

Nachdem festgestellt wurde, dass Vps35, Vps29 und Vps26 allesamt auch an Membranen binden, sollten zunächst die Eigenschaften der Membranbindung untersucht werden. Um diese Eigenschaften näher zu bestimmen, wurde das P100-Sediment aus *Arabidopsis* Zellkulturen in verschiedenen Lösungen steigender Solubilisierungsstärke resuspendiert, für eine Stunde auf dem Drehrad inkubiert und dann wieder bei 100000 g sedimentiert. Das neu erhaltene Sediment wurde dann mittels Proteinimmunoblot auf die Anwesenheit von Vps35 untersucht. Wie in Bild 2-16 zu erkennen, lässt sich der Hauptteil des Vps35-Antigens dabei schon unter relativ milden Bedingungen von 250 mM NaCl-Lösung von den Membranen abdissoziieren. Ein vollständiges Abdissoziieren gelingt bei höheren Salzkonzentrationen (1 M NaCl), mit 2 M Harnstoff oder durch Detergenzbehandlung. Dies ist eine typische Eigenschaft für membranassoziierte Proteine, wie beispielsweise auch COPI und COPII-Vesikelhüllproteine (Movafeghi et al., 1999) und wird ebenso in Solubilisierungsexperimenten der Retromerproteine aus Hefen beobachtet (Horazdovsky et al., 1997; Seaman et al., 1998).

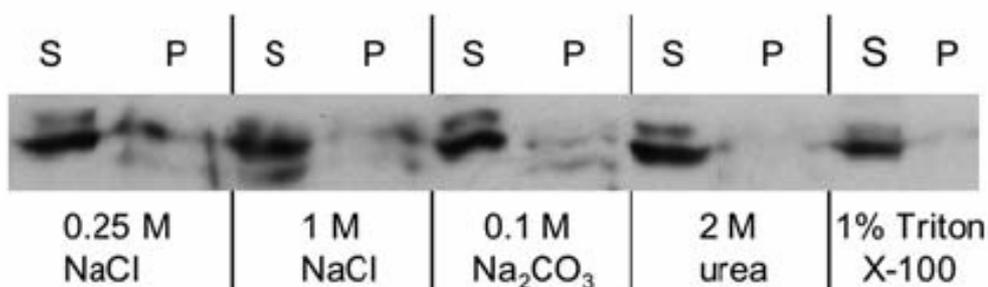


Bild 2-16: Dissoziation des großen Retromersubkomplexes von *Arabidopsis* P100 Membranen. *Arabidopsis* P100 Membranen wurden in Homogenisationspuffer resuspendiert, der mit 0,25 M NaCl, 1 M NaCl, 0,1 M Na₂CO₃, 2 M Harnstoff oder 1 % Triton X-100 versetzt war, und für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Membranen vom Überstand durch abermalige Zentrifugation bei 100000 g für eine Stunde getrennt und von allen Proben jeweils 20 mg Protein gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot mit AtVps35-Antikörpern untersucht. Schon geringe Mengen Salz (250 mM) genügen um dabei das nachgewiesene Vps35 von den es enthaltenden Membranen weitestgehend abzulösen. Schon mit den geringfügig stärkeren Solubilisierungsmitteln gelingt dies vollständig. S: Solubilisat, P: Sediment.

Um die membrangebundenen Retromerproteine untereinander auf Wechselwirkungen zu prüfen, wurde auf einer Superdex200-Säule eine Gelfiltration mit dem Überstand der 250 mM NaCl-behandelten Membranen durchgeführt. Falls die Proteine miteinander interagieren, könnten sie sich auch nach ihrer Abdissoziation von den Membranen als Komplex im Überstand befinden und sich durch Gelfiltration in komplexgebundener Form auftrennen lassen.

Unter den Bedingungen der durchgeführten Gelfiltration erfolgte zuvor eine Kalibration mit einem speziell für Gelfiltrationen vorgesehenen Molekularen Massenstandard-Eichsystem von Sigma-Aldrich (MW-GF-1000), so dass auch eine Größenbestimmung des eluierten Komplexes möglich war. Dabei wurden die Massen der Alkoholdehydrogenase (145kDa), BSA (66kDa) und β -Amylase (200kDa) in den gekennzeichneten Fraktionen detektiert. Im Anschluss an die Gelfiltration wurden die eluierten Fraktionen mittels Immunoblot auf Vps35, Vps26 und Vps29 untersucht (siehe Bild 2-17). Alle drei Retromerproteine wurden dabei in einer Fraktion nachgewiesen, die durch die vorangegangene Kalibration als 145 kDa-Bereich identifiziert wurde.

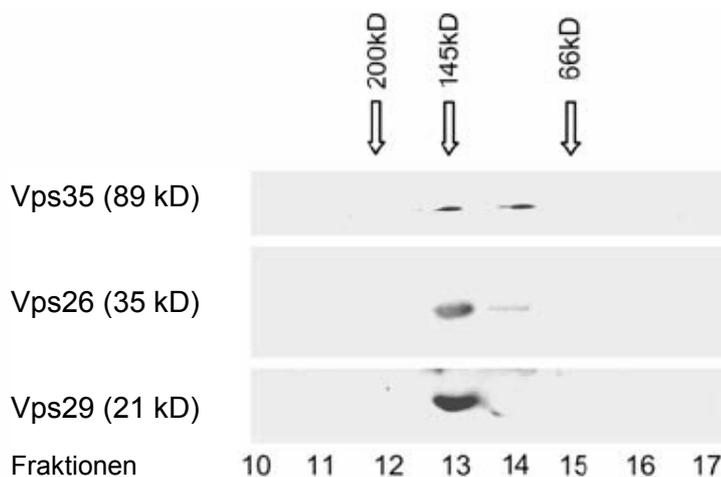


Bild 2-17: Gelfiltration der mit 0,25 M NaCl-Lösung behandelten P100-*Arabidopsis*-Membranen. Nach Behandlung der *Arabidopsis* P100-Membranen mit 0,25 M NaCl-Lösung wurden die solubilisierten Proteine auf einer zuvor durch Massenstandards kalibrierten Superdex 200-Säule einer Gelfiltration unterzogen. Die 0,5 ml Fraktionen wurden anschließend präzipitiert und daraufhin jeweils 20 mg Protein gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot mit AtVps35-, AtVps26-, sowie AtVps29-Antikörpern untersucht. Alle drei Retromerproteine koeluierten in einer Fraktion, die als 145 kDa-Bereich identifiziert wurde.

Die Masse von 145 kDa stimmt genau mit der Summe der Einzelmassen dieser drei Retromerproteine überein und deutet darauf hin, dass sie nach salzinduzierter Dissoziation gemeinsam von der Membranoberfläche abgetrennt werden und dabei verbunden bleiben. Des Weiteren sind diese Ergebnisse annähernd in Übereinstimmung mit denen aus Hefe (Seaman et al., 1998).

2.8 Retromer bindet an PVC Membranen und Mikrovesikel

Die unterschiedlichen Organellen des Endomembransystems unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften, beispielsweise ihrer Dichte. Durch isopyknische Zentrifugation lassen sich Membranen nach ihrer Dichte trennen und über spezifische Marker charakterisieren. Auch für unbekannte, membrangebundene Proteine lassen sich so Hinweise zu ihrer Lokalisierung erhalten.

Um Anhaltspunkte zu finden welche Membranen Retromerkomplexe binden können, wurden nun zunächst P100-Membranen isoliert und diese anschließend einer isopyknischen Zentrifugation unterworfen. Dabei wurden sowohl P100-Membranen von *Arabidopsis*, als auch von BY-2 Zellkulturen auf linearen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und die daraus erhaltenen Fraktionen mit Antikörpern gegen AtVps35 und RGP (Marker des Golgi-Apparat), Calnexin (ER), PM-ATPase (Plasmamembran), Pep12 (prävakuoaläres Kompartiment) sowie VSR (prävakuoaläres Kompartiment) im Immunoblot untersucht (siehe Bild 2-18 A und B). Abermals ist auch hier wie in den vorher beschriebenen Experimenten eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Gleichgewichtsverteilungen von Vps35 in Pflanzen- (besonders im Falle von *Arabidopsis* P100 Membranen) und Hefegradienten zu beobachten (siehe hierzu Abb. 5 in Seaman et al., 1998).

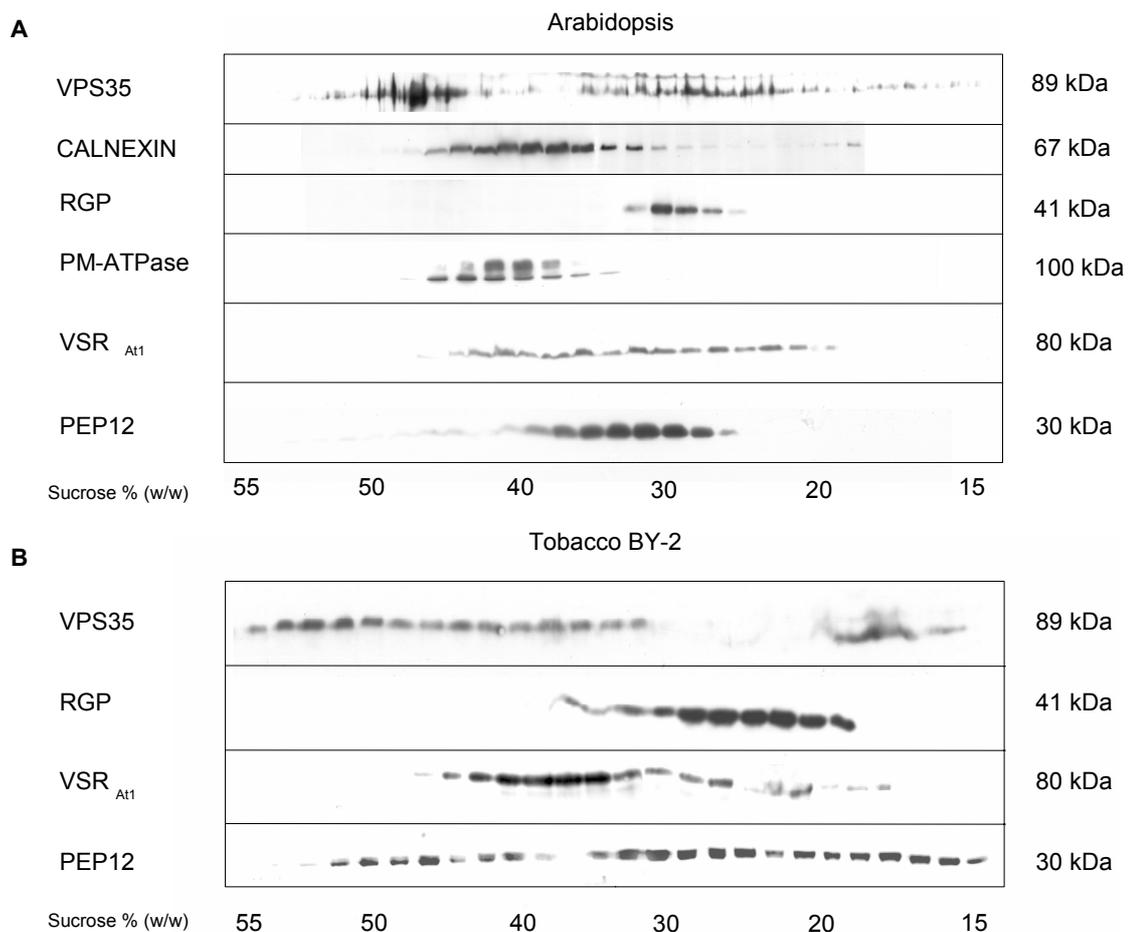


Bild 2-18: Sedimentationseigenschaften von retromerbindenden Membranen in Saccharosegradienten. (A) *Arabidopsis* P100 Membranen wurden auf einem isopyknischen 15-55% (w/w) linearen Saccharosegradienten getrennt und die Fraktionen mit folgenden Markern analysiert: dem ER-Membranmarker Calnexin, dem Golgimarker RGP (Reverse Glycosylated Protein), dem Plasmamembranmarker PM-ATPase, den PVC-Markern VSR_{At1} und PEP12 (SYP21), sowie mit Vps35 Antikörpern. (B) Wie (A), allerdings mit BY-2 P100 Membranen. Es lässt sich erkennen, dass Vps35 zwar vor allem mit den Markern des prävakuolären Kompartiments und teilweise auch mit dem Golgimarker (zumindest bei *Arabidopsis*) überlappt, nicht hingegen mit den Markern des ERs und der Plasmamembran.

Vps35 ist im Wesentlichen in zwei Bereichen des Gradienten angereichert: Der Hauptanteil befindet sich bei ca. 47 % Saccharosekonzentration und entsprechend hoher Dichte. Er enthält Membranbestandteile mit einem entsprechend hohen Protein/Lipid-Verhältnis wie es auch proteinbeschichtete Vesikel aufweisen. Dies ist beispielsweise auch bei COP-Vesikeln der Fall (Pimpl et al., 2000). In diesen Fraktionen waren keine PM-, Golgi-, ER- oder PVC-Marker detektierbar. Ein breiterer Bereich zwischen 30 und 42% Saccharosekonzentration enthält ebenfalls Vps35, wenn auch in niedrigerer

Konzentration. Bei diesen Dichten werden auch Membranen detektiert, die VSR_{At-1} und Pep12 (Syp21) enthalten, und deshalb dem prävakuoären Kompartiment zugeordnet werden. Mit den Markerproteinen aus der Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum gibt es hingegen keine oder nur geringe Überlappungen. Die Vps35-Profile in BY-2 Zellen grenzen sich weniger deutlich in zwei getrennten Bereiche voneinander ab als in *Arabidopsis*, decken aber den gleichen Konzentrationsbereich des Gradienten ab. Auch die Pep12 und VSR_{At-1} Gleichgewichtsverteilungen sind stark verbreitert, stimmen aber nach wie vor mit der weniger dichten Vps35 Fraktion überein.

Um zu überprüfen, ob zwischen den retromerhaltigen Membranen, dem PVC und dem Golgi-Apparat auch ein funktioneller Zusammenhang besteht, sind weitere Untersuchungen der mit Retromer angereicherten Membranfraktionen nötig (siehe 2.9 und 2.13.1) und darüber hinaus in situ-Lokalisationen mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Verfahren (siehe 2.10 und 2.11).

2.9 Elektronenmikroskopischer Nachweis von retromerbeschichteten Vesikeln

In den hochdichten Fraktionen von Saccharosedichtegradienten wurden in Arbeiten sowohl an Säugerzellen (Malhotra et al., 1989) wie auch an Pflanzenzellen (Pimpl et al., 2000) schon erfolgreich COP-Vesikel nachgewiesen. Da im zuvor beschriebenen Saccharosedichtegradienten (siehe 2.8) genau in diesen hochdichten Fraktionen keine detektierbaren Mengen an PM-, Golgi-, ER- oder PVC-Markern vorhanden waren, wurde deren Zusammensetzung weitergehend untersucht. Es sollte vor allem durch Negativkontrastierung wie auch mittels Immunogoldmarkierung festgestellt werden, ob Vesikel, insbesondere retromerbeschichtete Vesikel nachzuweisen waren.

In der Übersichtsaufnahme (siehe Bild 2-19 A) lassen sich neben unspezifischen Membranfragmenten in diesen Fraktionen eindeutig Clathrinbeschichtete Vesikel (CCVs) erkennen (Pfeile), aber auch eine Population weiterer, von einer diffusen Hülle umgebener Vesikel (Pfeilköpfe). Diese Vesikel sind im Vergleich zu CCVs mit einem Durchmesser von

ca. 90 nm etwas größer als letztere, besitzen allerdings keine symmetrische Struktur (Bild 2-19 B).

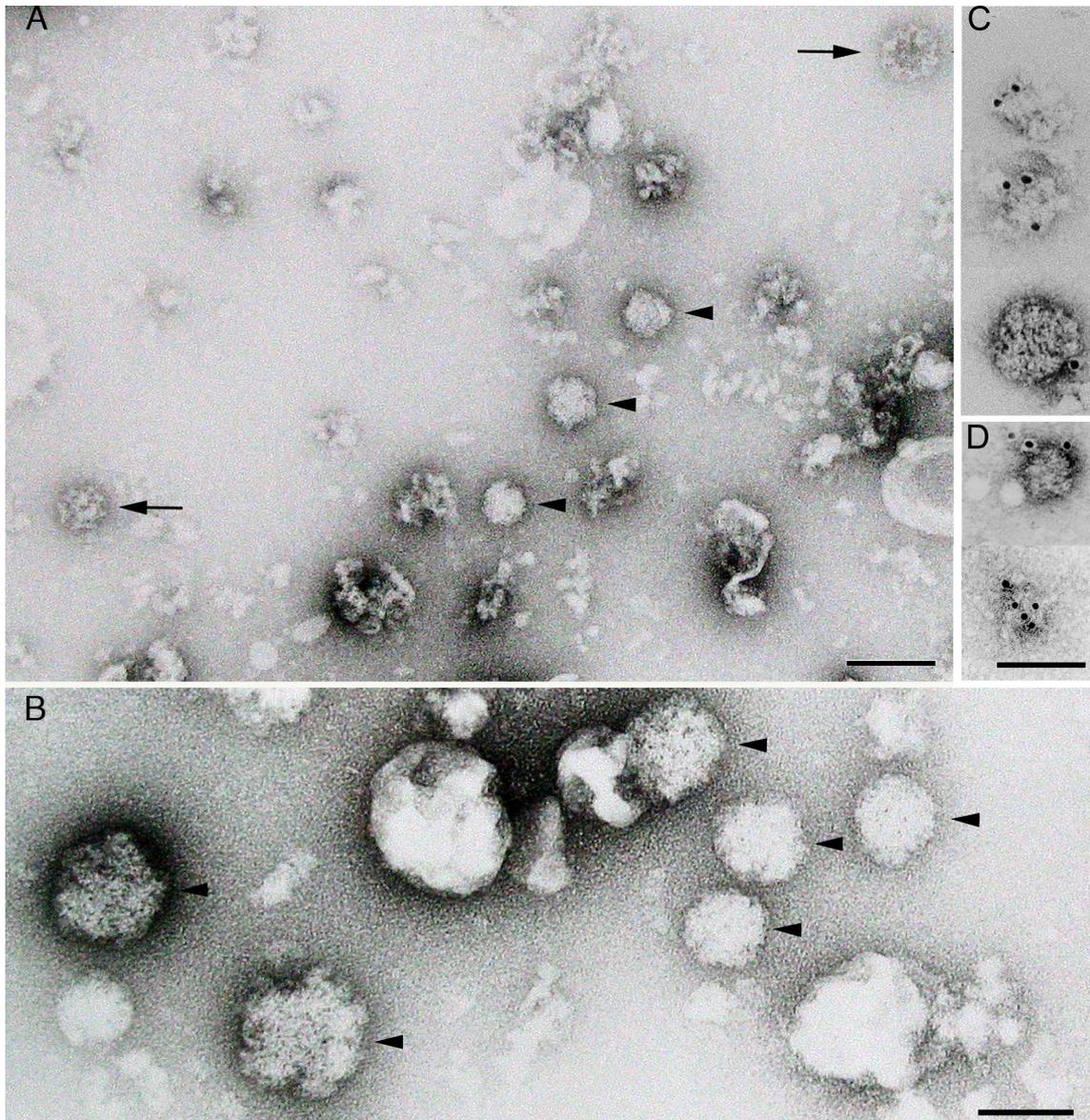


Bild 2-19: *Arabidopsis* P100 Membranen nach isopyknischer Zentrifugation auf einem 14 – 55% (w/w) linearen Saccharosegradienten enthielten hochdichte Fraktionen, die mit einem starken Vps35-Signal korrespondierten. Diese wurden negativkontrastiert und im Elektronenmikroskop untersucht. In A ist eine Übersichtsaufnahme aus diesen Fraktionen abgebildet, in B ein stärker vergrößerter Ausschnitt. C und D zeigen mögliche retromerbeschichtete Vesikel, die positiv mit Vps35- und Vps26-Antikörpern immunogoldmarkiert wurden. Pfeile weisen auf clathrinbeschichtete Vesikel, Pfeilspitzen auf mögliche retromerbeschichtete Vesikel. Der Messbalken hat eine Länge von 100 nm.

Zur Identifizierung möglicher retromerbeschichteter Vesikel wurden die in der Übersichtsaufnahme betrachteten Fraktionen auch mittels Immunogoldnegativkontrastierung untersucht. Hierzu wurden AtVps35- und AtVps26-Antikörper eingesetzt. In Bild 2-19 C und D ist zu erkennen, dass diese Vesikel mit den Antikörpern reagierten, womit es sehr wahrscheinlich ist, dass es sich bei diesen um retromerbeschichtete Vesikel handelt.

2.10 Retromer ist in situ am PVC lokalisiert (CLSM)

Mit dem Vorliegen der Antikörper gegen die Proteine des großen Retromersubkomplexes ist es möglich Lokalisierungsexperimente durchzuführen. Um einen ersten Überblick ihrer Lokalisation in der Zelle zu erhalten, eignet sich besonders die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM). Bei dieser Technik erscheinen die meisten Strukturen als punktförmige Fluoreszenzsignale, wobei es die Auflösungsgrenze der Mikroskope nicht erlaubt, Strukturen, die näher als 300 nm aneinander liegen, deutlich voneinander zu unterscheiden. Vor allem der Einsatz von transformierten Zelllinien und Antikörpern bekannter Marker erlaubt es das Verhältnis eines unbekanntes Proteins zu den in Frage kommenden Organellen zu klären. Um die punktförmigen Signale allerdings weiter zu differenzieren und die entsprechenden Strukturen oder Organellen zu erkennen, ist der Einsatz eines Elektronenmikroskops mit seinem höheren Auflösungsvermögen notwendig (siehe 2.11).

Die Experimente zur in-situ-Lokalisation wurden in Kooperation mit Liwen Jiang (Chinese University of Hong Kong) an den stabil transformierten Tabak-BY-2 - Zelllinien, die entweder den gelbfluoreszierenden Golgimarker GONST1-YFP oder den grünfluoreszierenden PVC-Marker VSR-GFP exprimierten, durchgeführt. Dabei kamen sämtliche gegen die Proteine Vps35, Vps26, sowie Vps29 hergestellten Antikörper nach einer ProteinG-Sepharose-Aufreinigung zum Einsatz. Wie in Bild 2-20 A zu erkennen, gibt es kaum eine Kollokalisation zwischen Vps35 und dem Golgimarker, während eine beträchtliche Kollokalisation zwischen Vps35 und der Markierung des PVC-SNARES Pep12 zu beobachten ist.

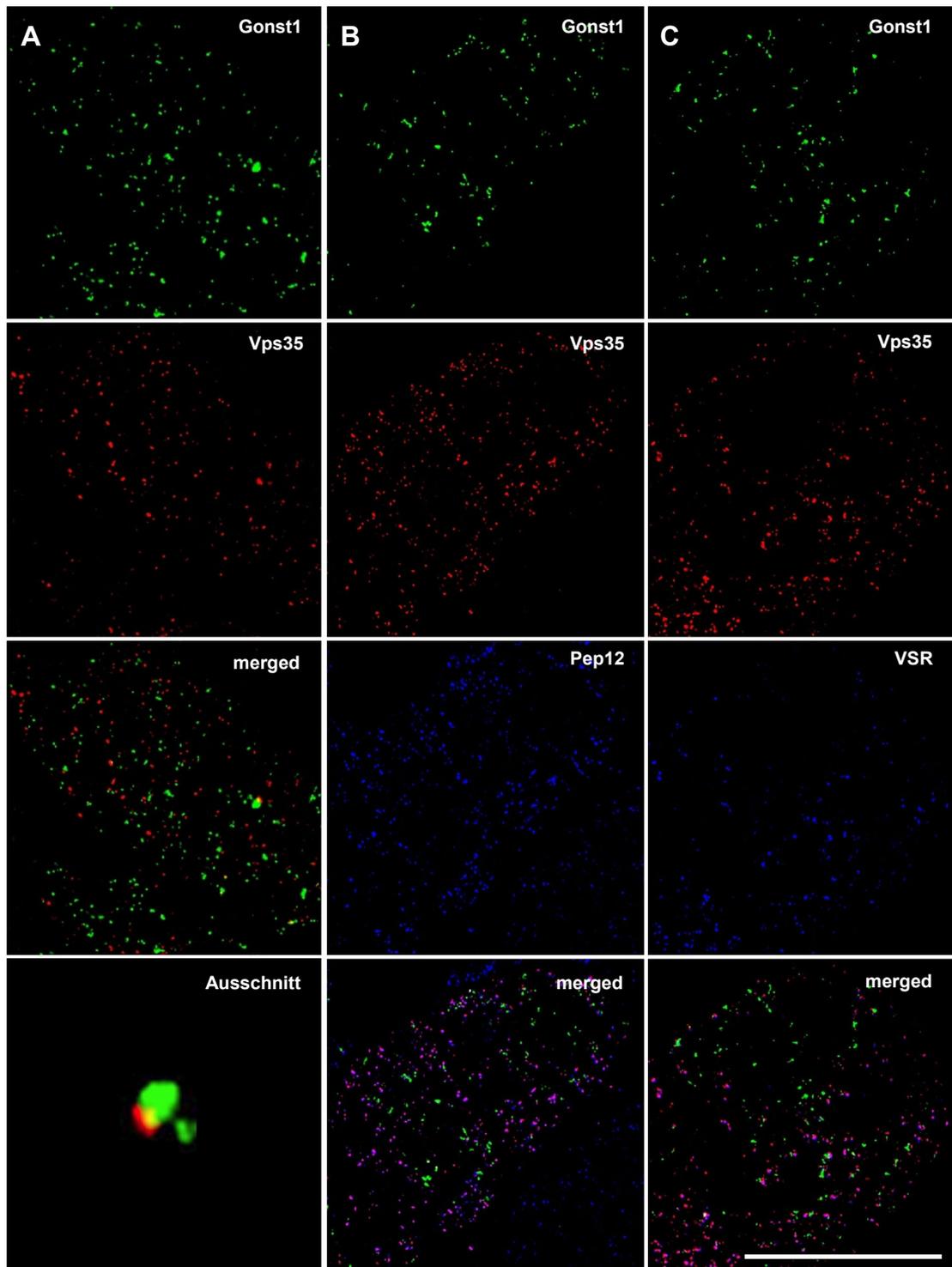


Bild 2-20: Lokalisierung von Retromer in Tabak BY-2 Zellen **A:** Markierung einer Gonst1-YFP überexprimierenden Zelle mit Vps35 Antikörpern **B:** Doppelmarkierung mit Vps35- und Pep12-Antikörpern in einer Gonst1-YFP überexprimierenden Zelle **C:** Wie B, allerdings wurden statt Pep12- VSR_{At-1}-Antikörper verwendet. In beiden Fällen war ein hohes Maß an Kolokalisation zwischen Vps35 und Pep12 bzw. VSR_{At-1} festzustellen und nahezu keine Kolokalisation mit dem Golgimarker. Messbalken = 10µm.

Ebensowenig war eine Kolokalisation beim Vergleich der Vps35- zur VSR-Antikörpermarkierung in derselben Zelllinie festzustellen (Bild 2-20 B und C). Die Spezifität der Vps35-Markierung wurde durch Kontrollexperimente mit Präimmunserum und durch den Ersatz des Anti-Kaninchen Sekundärantikörperkonjugats durch fluoreszierende Antiziegen-IgGs gestützt (Bild nicht gezeigt).

Des weiteren wurde eine gute Kolokalisation von Vps26 mit VSR in den transformierten VSR-GFP überexprimierenden Zellen beobachtet (Bild 2-21 A). Durch Antikörpermarkierung mit Fab-Fragmenten konnte außerdem ein hohes Maß an Kolokalisation bei den Doppelmarkierungen mit Vps26 und Vps29 (Bild 2-21 B), sowie Vps29 und Vps35 (Bild 2-21 C) festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die drei verschiedenen Retromerantikörper die selbe Struktur markieren, wobei es sich bei dieser Struktur wahrscheinlich um das prävakuoläre Kompartiment handelt. Durch eine statistische Auswertung der Markierung bestätigte sich, dass nur ca. 2% der Retromermarkierung mit dem Golgi-Apparat hingegen über 80% mit den PVC-Markern kolokalisieren (siehe Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Anteil der Kolokalisation der Retromerantikörpermarkierung im Vergleich zur Markierung mit PVC- und Golgi-Markern bzw. untereinander.

Kombination	Anteil Kolokalisation	Anzahl Zellen
Vps35 / Pep12	82,2 ± 1,5 %	6
Vps35 / VSR	82,5% ± 3,8%	5
VPS35 / GONST1	2,3% ± 1,7%	6
Vps26 / VSR	83,1% ± 4,0%	7
Vps26 / Gonst1-YFP	8,4 ± 2 %	5
Vps26 / Vps29	80,9% ± 4,8 %	5
Vps35 / Vps29	81,9% ± 5,9%	6

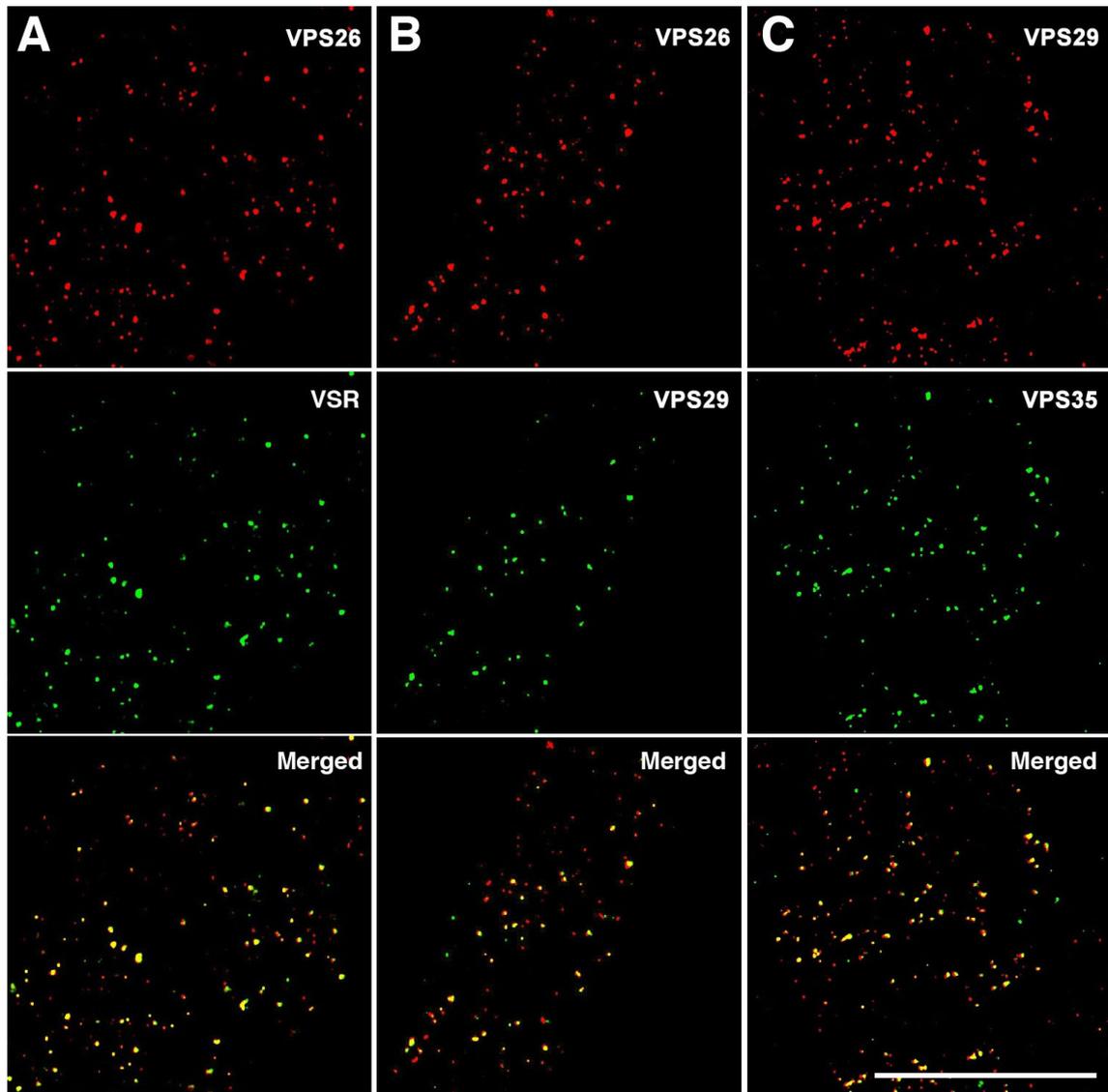


Bild 2-21: Lokalisierung von Retromer in Tabak BY-2 Zellen **A:** Markierung einer VSR-YFP überexprimierenden Zelle mit Vps26 Antikörpern **B:** Doppelmarkierung mit Vps26- und Vps29-Antikörpern in einer VSR-YFP überexprimierenden Zelle **C:** Wie B, allerdings Vps29- und Vps35-Antikörper verwendet. In allen Fällen war ein hohes Maß an Kolokalisation zwischen den betrachteten Proteinen festzustellen. Messbalken = 10µm.

2.11 Retromer lokalisiert in situ am PVC (EM)

Wie bereits erwähnt, ist es mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich, hochauflösende ultrastrukturelle Informationen der Zelle zu erhalten (siehe Bild 2-21). Daher wurden zur weiteren Aufklärung der ultrastrukturellen Verhältnisse bzw. der markierten Organellen Immunogoldmarkierungen unter Einsatz der Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Bereits vor einiger Zeit wurde nachgewiesen, dass die Multivesikulären Körper durch VSR und Pep12 Antikörper markiert werden und eindeutig als PVC identifizierbar waren (Tse et al., 2004). Beim von den Retromerantikörpern markierten Organell handelt es sich ebenfalls um diese multivesikulären Strukturen (siehe Bild 2-22).

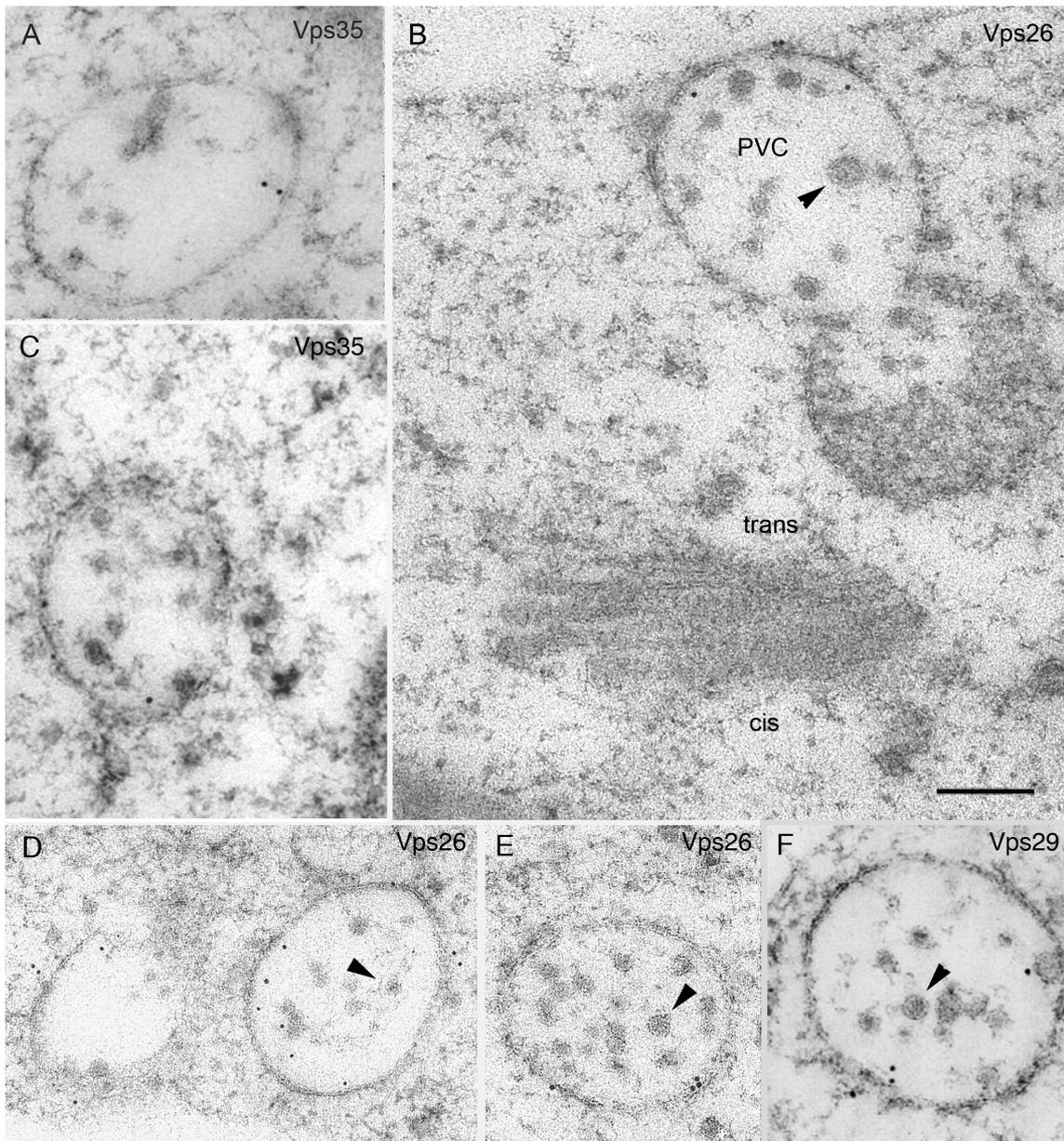


Bild 2-22: Immunogold-Lokalisation von Retromer an MVBs in BY-2 Zellen. Die Antikörper gegen die Retromerproteine Vps35, Vps29 und Vps26 markieren die Oberfläche der Multivesikulären Körper (MVBs). Die Pfeile weisen auf interne Vesikel derselben. Der Messbalken hat eine Länge von 200nm.

Die Markierung der Multivesikulären Körper durch die verwendeten Vps35-, Vps26- und Vps29-Antikörper war auf oder nahe der begrenzenden Membran der MVBs zu finden, wobei ein kleiner Teil auch die internen Vesikel markierte. Ein ebenfalls kleiner Anteil der Retromerantikörpermarkierung befand sich auch an Golgi-Stapeln oder in deren Umgebung (siehe Bild 2-22 B). Diese Verteilung ähnelt insgesamt sehr der mit VSR-Antikörpern erhaltenen Markierung der MVBs in BY-2 -Zellen.

Immunogoldmarkierung auf Schnitten aus hochdruckgefrorenen, gefriersubstituierten BY-2 -Zellen bestätigen somit die Daten aus der Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Bild 2-21).

2.12 Wortmanninbehandlung trennt Vps35 und VSR_{At-1}

Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-kinase (Vanhaesebroek et al., 1997), beeinflusst nicht nur die Assoziation von Vps5p und Vps26p mit der endosomalen Membran (Cozier et al., 2002; Arighi et al. 2004), sondern verursacht auch ein Anschwellen der MVBs (Tse et al., 2004), einhergehend mit dem Verlust der osmiophilen Plaques und einer Reduktion der internen Vesikel dieses Organells. Vor allem ist Wortmannin aber gemäß einer neueren Arbeit in der Lage den BP80-Transport zur lytischen Vakuole in Pflanzen zu stören und sorgt darüber hinaus dafür, dass der BP80-Rezeptor selbst zur Vakuole transportiert wird (daSilva et al., 2005). Es besteht somit eine gewisse Ähnlichkeit zwischen den durch dominant-negative Mutationen der Retromerproteine erzeugten Hefemutanten (Reddy und Seaman, 2001) und dem durch Wortmannin verursachten Phänotyp. Es liegt also nahe, auch hier den Effekt von Wortmannin zu untersuchen. Dies geschah mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie, die wie zuvor auch an BY-2 Zellen durchgeführt wurde, allerdings unter Zugabe von Wortmannin in einer Konzentration von 16 µmol. Es stellte sich die Frage, ob die Signale der VSR_{At-1}- und Vps35-Markierung bei Wortmanninzugabe nach wie vor kolokalisierten.

Nach Zusatz von Wortmannin trennten sich die Signale von Vps35 und VSR und es war keine Kolokalisation mehr festzustellen, wie es zuvor ohne die Einwirkung von Wortmannin der Fall war (siehe Bild 2-23). Darüber hinaus kam

es zu morphologischen Veränderungen in den behandelten Zellen. Wie in der Literatur beschrieben ändert das PVC unter diesen Bedingungen sowohl seine Größe als auch sein Erscheinungsbild (Tse et al., 2004). Das VSR_{At-1}-Signal nimmt statt des gewohnten punktierten Aussehens meist eine stark vergrößerte Gestalt u.a. in Form eines aufgeweiteten Rings an.

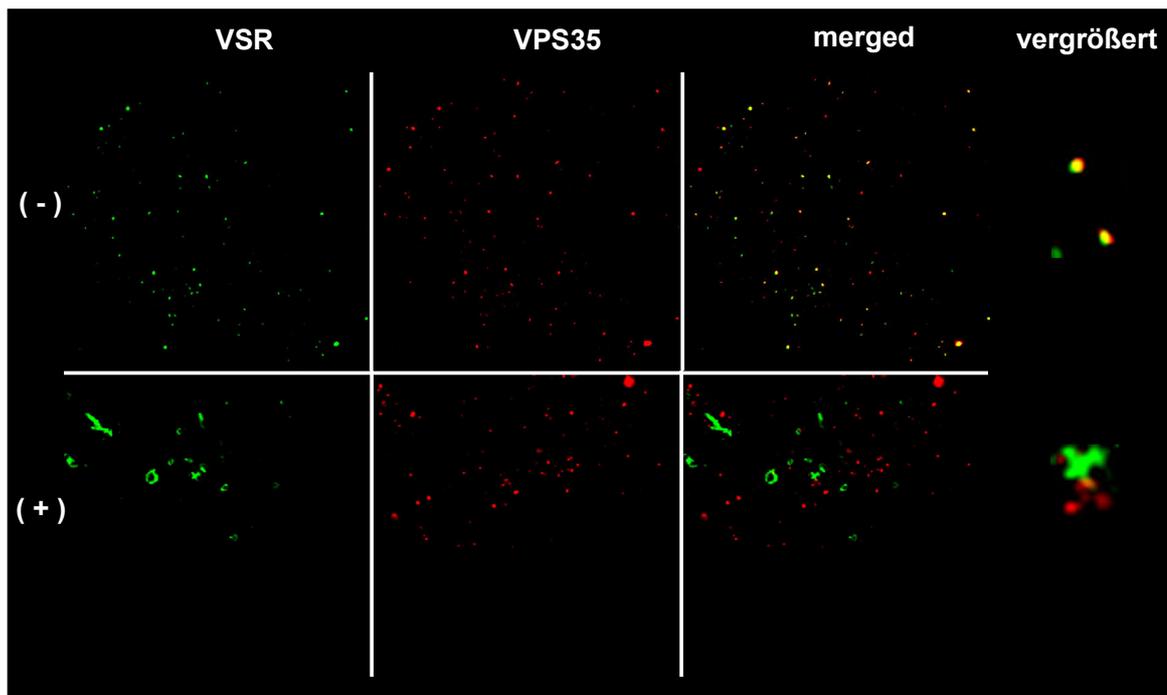


Bild 2-23: Wortmannin verändert die Verteilung von Retromer in Tabak BY-2-Zellen. BY-2-Zellen, die den fluoreszierenden PVC-Marker VSR-GFP exprimierten, wurden 45 Minuten mit 16 μmol Wortmannin behandelt und anschließend mit Vps35-Antikörpern markiert. Wortmannin führte zur Trennung des PVC- und des Retromer-Signals und darüber hinaus zum Anschwellen des PVC wie in der Literatur beschrieben (Tse et al., 2004).

Diese Beobachtung ließ es möglich erscheinen, dass Wortmannin den großen, Vps35- enthaltenden Subkomplex des Retromerkomplexes von der Oberfläche des PVCs entfernte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden sowohl *Arabidopsis*- wie auch BY-2 -Suspensionszellkulturen für unterschiedliche Zeiträume von bis zu sechs Stunden mit 16 μmol Wortmannin versetzt und aus diesen Zellen S100 und P100-Fractionen gewonnen. Diese Fraktionen wurden wie zuvor beschrieben (siehe 2.6) mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot auf das Vorhandensein von Vps35 untersucht. Die Westernblots wurden ebenso mit den vorhandenen Antikörpern gegen

Vps29 und Vps26 untersucht, mit jeweils identischen Ergebnissen. Die Blots zeigten, dass die Proteine noch in der Membranfraktion sind, nicht aber, an welchen Membranen. Für eine Abtrennung des großen Subkomplexes von endosomalen Membranen ins Cytosol fand sich somit selbst nach sechsständiger Inkubation mit Wortmannin kein Anhaltspunkt (siehe Bild 2-24).

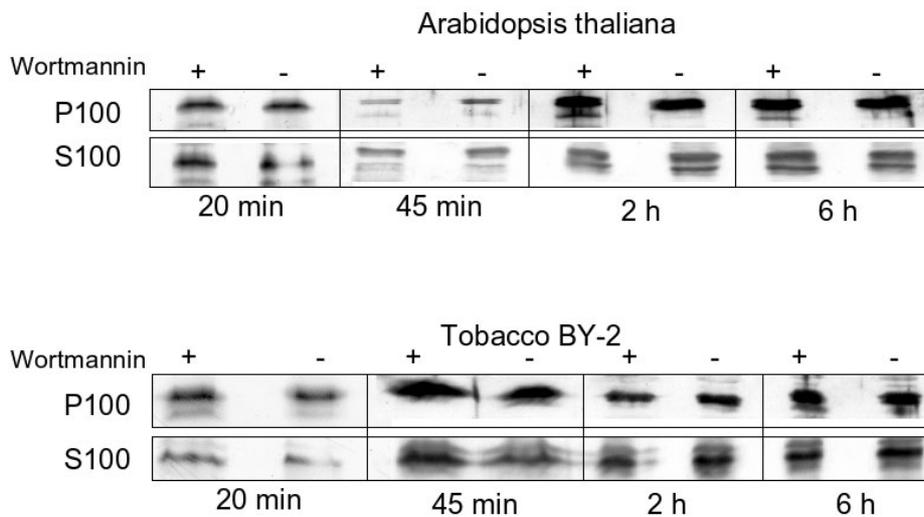


Bild 2-24: *Arabidopsis* (A) und BY-2-Zellen (B) wurden mit 16µm Wortmannin für Zeiträume von 20 Minuten bis zu sechs Stunden behandelt und anschließend S100 und P100 Fraktionen aus diesen Zellen hergestellt. Jeweils 20mg Protein von behandelten (+) und Kontrollzellen (-) wurde durch SDS-Gelelektrophorese getrennt und im Immunoblot gegen AtVps35-Antikörper untersucht. Es ist unschwer zu erkennen, dass Wortmannin nicht zur Abtrennung des großen Retromersubkomplexes von endosomalen Membranen ins Cytosol führt.

Die Messung des durchschnittlichen Abstands der VSR_{At-1}- und Vsp35-Signale zeigt, dass dieser mit 1 µm innerhalb des Durchmessers liegt, den das PVC nach seinem Anschwellen durch die Wortmanninbehandlung erreicht (siehe Tabelle 2-3). Der Literaturwert des Durchmessers des PVCs in unbehandelten Zellen liegt bei ca. 0,5 µm (Tse et al., 2004). Möglicherweise liegt also die Trennung der beiden Signale in einer räumlichen Neuverteilung zu unterschiedlichen Domänen des PVCs begründet. Interessanterweise ist der Abstand zwischen PVC und Golgi-Apparat mit durchschnittlich 0,6 µm um einiges geringer.

Tabelle 2-3: Messung des durchschnittlichen Abstands des Vps35 und des VSR-Signals in Wortmannin-behandelten BY-2 Zellen (16 μm , 45 min)

Anzahl gemessener Zellen	Anzahl vergrößerter PVCs	Anzahl Vps35-markierter Organellen	Durchschnittlicher Abstand (μm)
5	48 ^a	53 ^b	1,0 \pm 0,6 ^c
<p>a Anzahl vergrößerter YFP-BP80-markierter PVCs</p> <p>b Anzahl Vps35-markierter, an das vergrößerte PVC angrenzender Organellen</p> <p>c Durchschnittlicher Abstand zwischen dem vergrößerten YFP-BP80-markierten PVC und dem nächsten Vps35-markierten Organell</p>			

2.13 Funktionelle Eigenschaften des Retromer

Im ersten Teil der Arbeit gelang es einen Überblick zu erhalten über die Eigenschaften der Retromerproteine, also ihr Verhalten im Dichtegradienten, ihre Membranassoziation und auch ihre Lokalisation. Nun sollten in ersten Experimenten Erkenntnisse gewonnen werden über ihre funktionellen Eigenschaften, insbesondere mit welchen Proteinen in Pflanzen Retromer in Wechselwirkung tritt oder wie sich möglicherweise eine Störung des retromervermittelten Transports auswirkt.

2.13.1 VSR_{At-1} lässt sich mit Vps35-Antikörpern immunpräzipitieren

Wie in der Einleitung beschrieben sorgt Retromer in Hefen für den Rücktransport des Vps10-Rezeptors zum TGN. In der Literatur zum humanen und Heferetromersystem wird jeweils das Protein Vps35 als primärer Interaktionspartner angesehen. Da BP-80 das funktionelle Homolog des Vps10p aus Hefe ist (Humair et al., 2001), ist es somit wahrscheinlich, dass auch BP80 via retromervermitteltem Transport vom PVC zum Trans-Golgi gelangt. Zum Nachweis solcher Protein-Protein-Wechselwirkungen gibt es verschiedene Methoden (Phizicky und Fields, 1995; Drewes und Bouwmeester, 2003). Da Antikörper gegen das *Arabidopsis*-Vps35 zur Verfügung standen, liegt es nahe mit Hilfe von Immunpräzipitationen solche Wechselwirkungspartner zu identifizieren.

Unter Verwendung der Vps35-Antikörper, die kovalent an ProteinG-Sepharose gekoppelt wurden, gelang es Vps35 zu präzipitieren und mit ihm ein Antigen,

das mit den VSR_{At-1} -Antikörpern reagierte (siehe Bild 2-25). Bei den untersuchten Proben handelte es sich um die aus *Arabidopsis* P100-Membranen mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation angereicherte Vesikelpopulation. In diesen Fraktionen wurden zunächst die Membranen mit CHAPS solubilisiert und die detergenzunlösliche Phase durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Der erhaltene Überstand fand dann Verwendung in der eigentlichen Immunpräzipitation. Als Positivkontrolle diente ein *Arabidopsis* gesamtmembransediment.

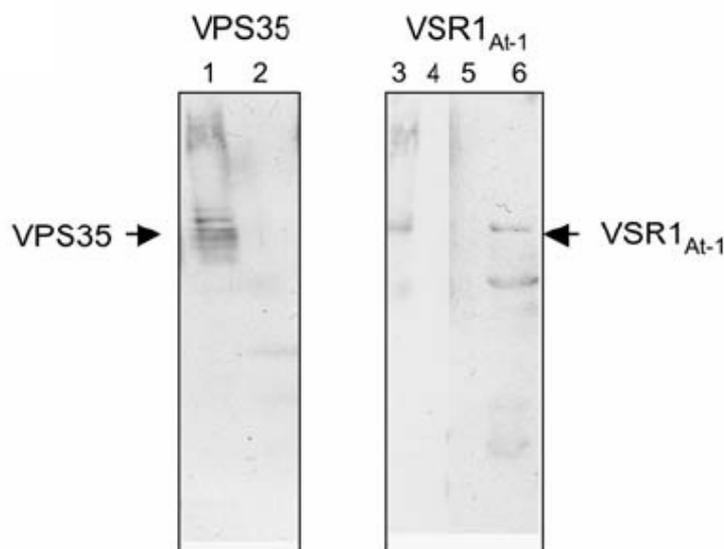


Bild 2-25: VSR_{At-1} koimmunpräzipitiert mit Vps35-Antikörpern. Die vereinigten Fraktionen der Dichten von 47 bis 50% (w/w) Saccharose eines linearen Saccharosedichtegradienten aus *Arabidopsis* P100-Membranen wurden mit CHAPS behandelt und anschließend eine Stunde bei 100000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit Vps35- oder VSR_{At-1} -Antikörpern, die kovalent an Sepharose CL-6B-Beads gebunden waren, immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden anschließend von den Beads mit Glycin bei einem pH-Wert von 2,5 eluiert, neutralisiert und gefällt. Im linken Blot in Bahn 1 ist die Positivkontrolle zu sehen, die die Präzipitation von Vps35 mit Vps35-Antikörpern zeigt, in Bahn 2 die entsprechende Negativkontrolle mit Beads an die Kontrollantikörper gebunden waren. Bahn 3 enthielt Marker, Bahn 4 eine Negativkontrolle analog zu Bahn 2, Bahn 5 eine Negativkontrolle mit unbeladenen Beads und Bahn 6 die von Anti-Vps35-Beads eluierten Proteine. Die Immunoblots wurden mit Vps35- (Bahn 1) oder VSR_{At-1} -Antikörpern untersucht. Aufgetragen wurden jeweils 20 mg Protein.

Zusätzlich wurden die Eluate der Immunpräzipitationsexperimente einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Nach deren Transfer auf

Nitrocellulosemembranen durch Western-Blot wurden diese mit dem Vps35-Antikörper untersucht. Im Anschluss an einen Waschschrift (ohne Entfernung der Primärantikörper) wurde die Blotmembran mit Anti-VSR_{At-1}-Antikörpern inkubiert (siehe Bild 2-26). Es konnte für beide Proteine ein Signal mit dem jeweils zu erwartenden Molekulargewicht sowie dem vorausberechneten isoelektrischen Punkt (pI) detektiert werden.

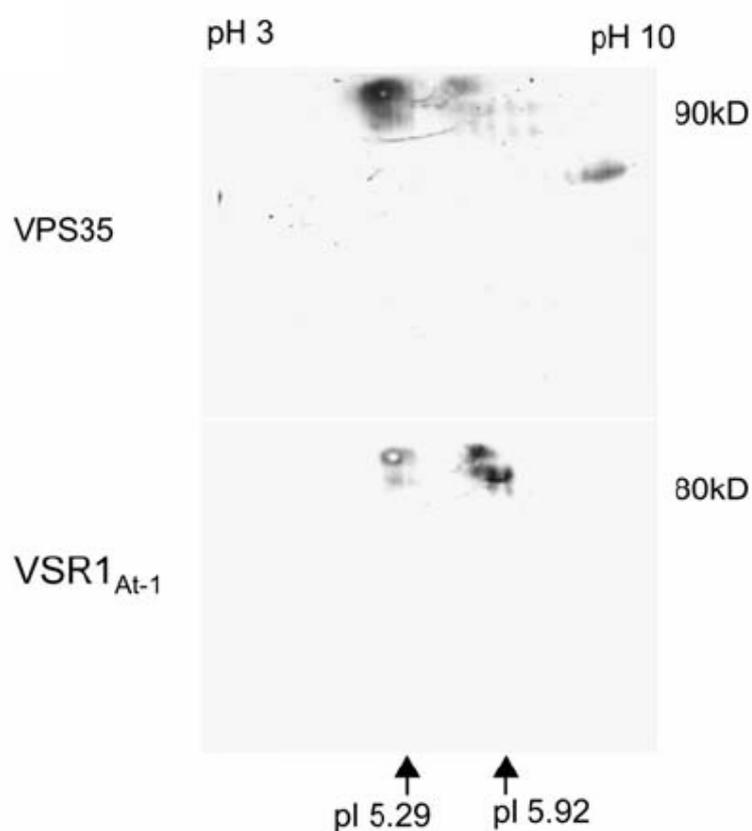


Bild 2-26: 2D-Gelelektrophorese immunpräzipitierter Proteine. Zuerst wurden die Präzipitate einer isoelektrischen Fokussierung, danach einer klassischen SDS-PAGE-Gelelektrophorese unterzogen. Der anschließend durchgeführte Immunoblot wurde mit Vps35-Antikörpern untersucht und nach dem Entfernen derselben („Strippen“) ebenso mit VSR_{At-1}-Antikörpern. Für Vps35 wurde ein Signal mit einer Masse von ca. 90 kD und einem pI von ca. 5,3 gefunden. Für VSR_{At-1} bei ca. 80 kD und einem pI von ca. 5,9. Da beide Antiseren aus Kaninchen stammen, ist im unteren Blot ein Restsignal von Vps35 zu erkennen.

2.13.2 Inhibition des retromervermittelten Transports

Die Ergebnisse aus dem vorigen Abschnitt (2.13.1) legen eine Wechselwirkung zwischen Retromer und VSR nahe. Eine Beteiligung der Retromerproteine am

retrograden Transport zum TGN ist dadurch jedoch noch nicht bewiesen. Der funktionelle Beweis sollte mit Hilfe dominant-negativer Mutationen am *AtVPS26* mit dem in der Gruppe von J. Denecke (University of Leeds) entwickelten Amylase-Assay (daSilva et al., 2005) erbracht werden.

Wie aus der Arbeit von Reddy und Seaman (2001) bekannt, konnten in Hefen verschiedene dominant-negative Mutanten (dn-Mutanten) hergestellt werden. Die genetisch eindeutig beschriebenen Mutanten sind dabei die des *VPS26*. Im Falle der I172A und S173P-Mutationen handelt es sich um dominant-negative Mutationen, d.h. die Mutante exprimiert ein inaktives Vps26-Protein und es wird eine unprozessierte Form der Hydrolase CpY sekretiert. Ähnlich dem Phänotyp der *Vps26*-Knockout-Mutante ($\Delta Vps26$) wird auch in diesen Fällen die Retromerfunktion gehemmt und der Vps10-Rezeptor nicht mehr zum TGN rezykliert, sondern in der Vakuole proteolytisch gespalten. Falls die Hemmung des retrograden Transports der vakuolären Sortierungsrezeptoren auch in Pflanzen die korrekte Rückführung derselben verhindert, sollten sich diese im PVC anreichern und zur Vakuole transportiert werden. Letztenendes sollte also einen Phänotyp zu beobachten sein, wie er auch nach Wortmanninbehandlung vorliegt. Dies macht einen korrekten Transport der Frachtmoleküle zur Vakuole unmöglich, da der Rezeptor nicht mehr für die Sortierung am TGN zur Verfügung steht. Folglich käme es zu einer Sekretion vakuolärer Proteine.

Die Auswirkung der Wortmanninbehandlung im Amylase-Assay an Tabakprotoplasten ist in Bild 2-27 schematisch dargestellt. Das künstlich erzeugte Frachtmolekül α -Amylase-spo, ein Fusionsprotein aus α -Amylase und der vakuolären Sortiersequenz des Sporamins, wird nicht mehr zur Vakuole transportiert, sondern sekretiert. Diese Änderung seines Sekretionsverhaltens ist messbar und findet seinen Ausdruck in einem veränderten Sekretionsindex. Der Sekretionsindex ist definiert als der Quotient aus der Gesamtaktivität der sekretierten α -Amylase und der in der Zelle verbliebenen α -Amylase. Die Amylase bietet, da ihre Aktivität proportional zu ihrer Konzentration ist, einen direkten, messbaren Zugang zum Sekretionsindex (siehe Pimpl und Denecke, 2002).

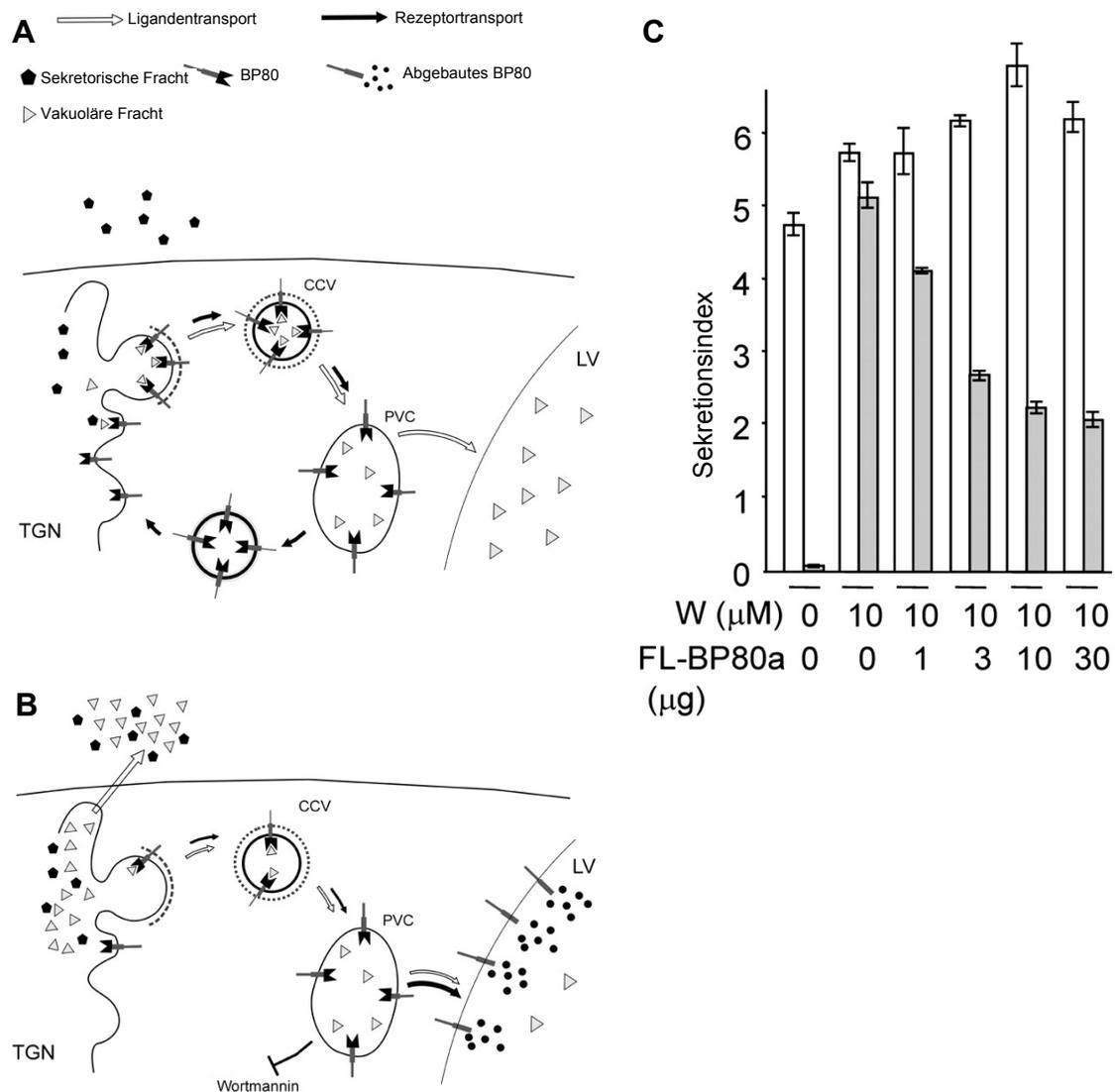


Bild 2-27: Schematische Darstellung des BP80-Zyklus und Modell der Wirkung von Wortmannin im Amylase-Assay. **A:** Unter physiologischen Bedingungen zyklisiert BP80 zwischen Golgi-Apparat und PVC. Nach dem anterograden Transport der Fracht zum PVC wird der Rezeptor wieder zum Golgi-Apparat rezykliert (schwarze Pfeile: Rezeptoren, weiße Pfeile: Liganden). **B:** Wortmannin verhindert das Recycling des Rezeptors. Stattdessen wird BP80 in der Vakuole abgebaut und seine Liganden sekretiert. **C:** Bei Protoplasten, die mit Wortmannin behandelt wurden, zeigt sich dieser Effekt im ansteigenden Sekretionsindex des Amylase-Sporamins. Dies kann jedoch durch die Kotransformation von Wildtyp-BP80 partiell kompensiert werden. Abgebildet ist der Sekretionsindex, jeweils für Amylase (weiß) und Amylase-Sporamin (grau). Abbildung modifiziert nach daSilva et al., 2005.

Analog zu den Experimenten in Hefen sollte auch in Pflanzen durch Überexpression von dn-Vps26-Mutanten eine entsprechende Störung des

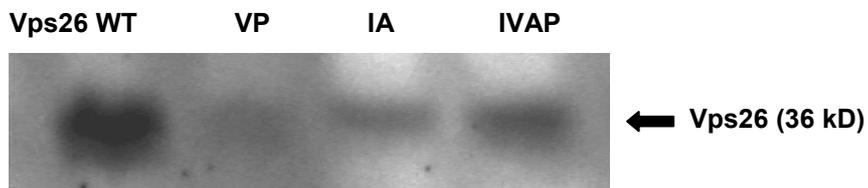
Transports zur Vakuole erreicht werden. In der Hoffnung einen solchen dominant-negativen Effekt zu erzielen, wurden hierzu wie in Bild 2-28 zu sehen, drei verschiedene Mutanten von *VPS26* hergestellt, die jeweils an der 143- oder 144-V-Position variiert wurden. Bei diesen beiden Positionen handelt es sich um die in einem Alignment identifizierte, dem Hefeprotein entsprechenden Positionen, die Reddy und Seaman (2001) in ihrer Arbeit entsprechend mutierten. Bei den drei Mutanten handelte es sich um I143A, V144P und IV143,144AP. Für die genauen Sequenzen der transformierten Plasmide sei auf die Abschnitte 4.6.11 und 6.2 verwiesen.

	190	200	210	220	230	240		
105	RSYD	FEFMQVEKPYESYIGANVRLRYFLKVTIVRRLT	DLVKEYDLIVHQLATYPDVNN				Hs1	
105	RSYD	FEFMQVEKPYESYIGANVRLRYFLKVTIVRRLT	DLVKEYDLIVHQLATYPDVNN				Mm1	
103	QAFD	FEFTHVEKPYESYTGQNVKLRVFLRATISRRLN	DVVKEMDIVVHTLSTYPELNS				Hs2	
103	QAFD	FEFTHVEKPYESYTGQNVKLRVFLRATISRRLN	DVVKEMDIVVHTLSTYPELNS				mm2	
102	NSYP	DFPKVEKQFEVYAGSNVRLRYFLRATIVRRLS	DITKEVDIAVHTLCSYPEMNN				dm	
87	AQFP	FEFNNVEKPFETYMGTVKLRVFLRVTVIRRLT	DFLDLVVHALSYPDNDK				Ce	
104	KTYP	FEFSSVEMPYETYNGVNVRLRYVLKVTITRNGY	GSIVEYDFVVRNYVPLPPINN				At5g53530	
147	KTYP	FEFSTVEMPYETYNGVNVRLRYILKVTITRNGY	AGSIVEYDFVVRNYVPLPPINN				tomato	
69	KTYA	FEFSTVEMPYETYNGVNVRLRYVLKVTITRNGY	AGSIVEYDFVVRNYVPLPPINN				Soy_bean	
104	KTYP	FEFSTVEMPYESYNGTNVRLRYILKVTITRNGY	VGNIVEYDFVVRNYVPLPPINN				wheat	
104	KTYP	FEFSTVEMPYESYNGTNVRLRYILKVTITRNGY	VGNIVEYDFVVRNYVPLPPINN				barley	
104	KTFP	FEFSTVEMPYESYNGTNVRLRYILKVTITRNGY	VGNIVEYDFVVRNYVPLPPINN				sorghum	
104	KTFP	FEFSTVEMPYESYNGTNVRLRYILKVTITRNGY	VGNIVEYDFVVRNYVPLPPINN				maize	
134	QSF	PFLFRDL	SKRVE	SYKGV	VDVA	YYYKVTVMRKST	DISKIDRFWVYLYNSVTTAPNT	Sc

Bild 2-28: Konstruktion von dominant-negativen *VPS26*-Mutanten. In der unteren Zeile des Alignments sind die von Seaman et al. (2001) mutierten Positionen markiert. In Hefe zeigten die I172A und S173P-Mutationen einen dominant-negativen Effekt durch Expression inaktiver Vps26-Proteine. Diese inhibierten den retrograden Vps10p-Transport und sekretierten CpY. Beim Protein aus *Arabidopsis* sind die entsprechenden, homologen Positionen markiert. Um im Amylase-Assay einen ähnlichen Effekt zu erzielen, wurden drei Mutanten hergestellt, bei denen es sich um I143A, V144P und IV143,144AP handelte.

Diese Mutanten wurden mit einer konstanten Menge α Amylase-Sporamin kotransformiert. Die Expression der transformierten Vps26-Proteine wurde zunächst im Immunoblot geprüft (siehe Bild 2-29 A) und anschließend der Sekretionsindex bestimmt und gegen die elektroporierte Menge an DNA der verschiedenen Vps26-Varietäten aufgetragen. Es wurde schnell deutlich, dass sämtliche Mutanten nur schwach exprimiert wurden. Allerdings können auch geringe Mengen dieser mutierten Proteine durch irreversible Bindung zu einer Inhibition des retromerermittelten Transports führen, das Gesamtsystem nachhaltig aus dem Gleichgewichtszustand bringen und für einen messbaren Effekt sorgen.

A



B

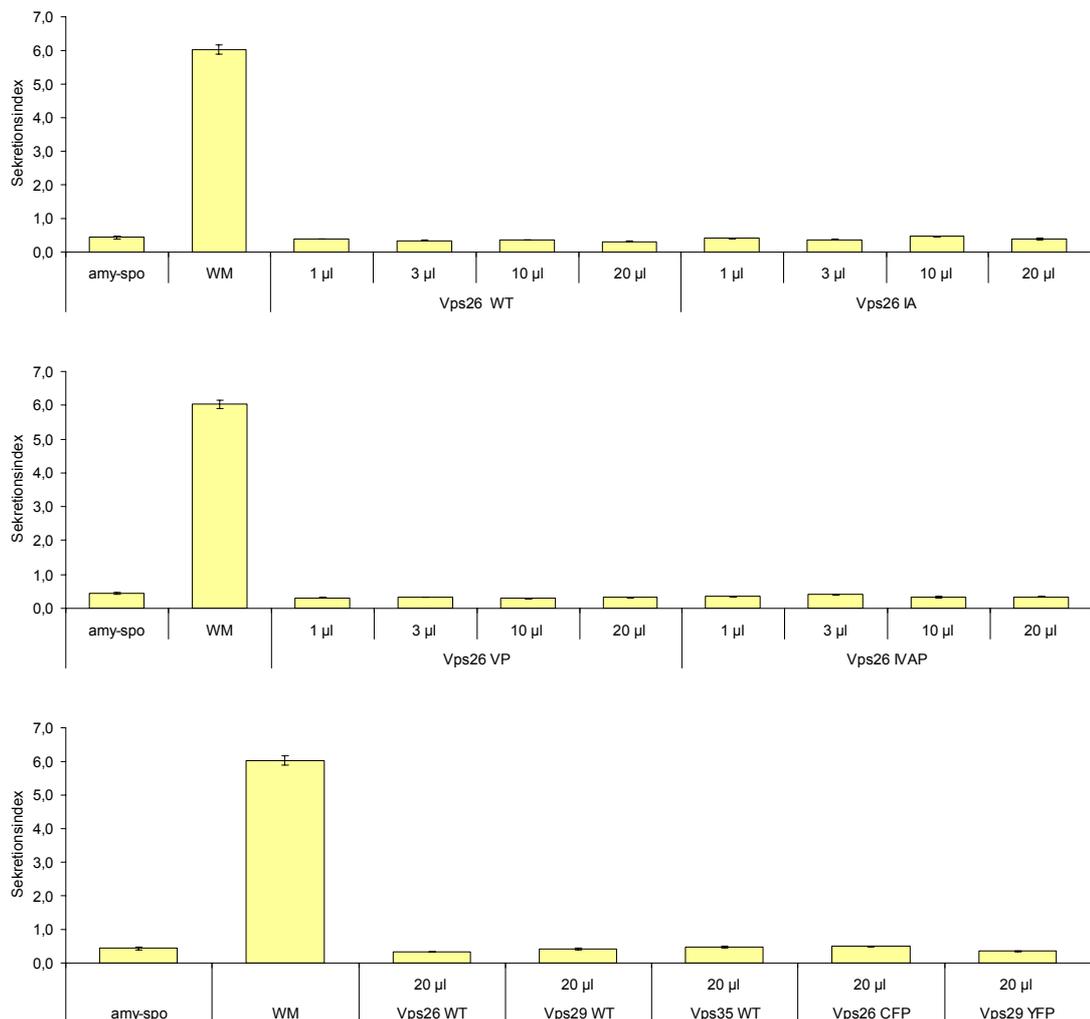


Bild 2-29: Expression von Vps26-Mutanten und deren Einfluss auf die Sekretion. **A:** Im Gegensatz zum Wildtypprotein werden die Vps26-Mutanten bei gleicher Transformationsmenge wesentlich schwächer exprimiert. **B:** Weder beim Wildtyp-Vps26 noch bei sämtlichen Mutanten des Vps26 konnte ein veränderter Sekretionsindex gemessen werden. Als Positivkontrolle dienten mit 10 µmol Wortmannin versetzte Protoplasten. Auch die Überexpression von Vps35 und Vps29-Wildtypproteinen sowie den an Fluoreszenzmarker fusionierten Vps26 und Vps29 bewirkte keine Erhöhung des Sekretionsindex.

Daher wurden neben den Mutanten auch alle anderen Wildtyp-Proteine transformiert, da dies ebenso einen Einfluss auf die Sekretion haben könnte, beispielsweise durch eine Art „Titrationseffekt“ gegenüber dem Rezeptor oder anderen Bestandteilen des Retromerkomplexes (siehe 3.6.1). Selbst mit hohen Transformationsmengen konnte allerdings weder bei den Mutanten noch bei allen sonst getesteten Wildtyp-Retromerproteinen eine Sekretion von vakuolären Frachtmolekülen gemessen werden (siehe Bild 2-29 B). Dies war auch bei den Fusionsproteinen mit Fluoreszenzmarkern der Fall.

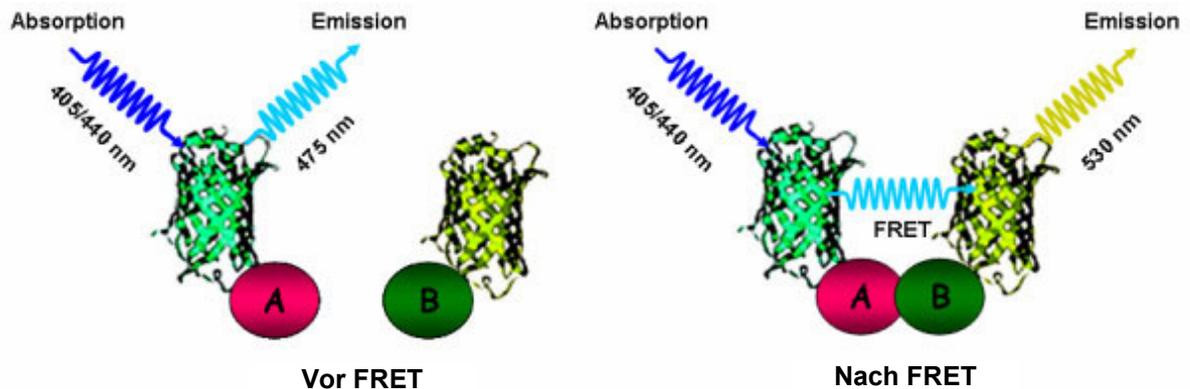
2.13.3 Expression von fluoreszenzmarkierten Retromerproteinen in Tabakprotoplasten

Bei gleichzeitiger Transformation von YFP- und CFP-Fusionsproteinen kann manchmal eine Protein-Proteininteraktion mit Hilfe des sogenannten FRET-Effekts⁶ nachgewiesen werden (Bhat et al, 2006). Dabei wird das eine Chromophor auf seiner Absorptionswellenlänge angeregt und überträgt in einem strahlungslosen Transfer die Anregungsenergie auf das Chromophor des Wechselwirkungspartners, der diese dann auf seiner charakteristischen Emissionswellenlänge wieder abgibt (siehe Bild 2-30). Zwar kann ein Energietransfer eine Wechselwirkung nachweisen, sein Ausbleiben schließt das Vorhandensein einer Wechselwirkung allerdings nicht aus. Mit Hilfe des FRET-Effekts sollte versucht werden, Wechselwirkungen zwischen Retromerproteinen und dem vakuolären Sortierungsrezeptor nachzuweisen.

Statt den zuvor verwendeten Vps26-Transformanten wurden daher die entsprechenden XFP-Fusionsproteinkonstrukte transformiert. Diese trugen jeweils C-terminal die Sequenz für das gelb oder blau fluoreszierende Protein (YFP oder CFP). Ebenso wurden die korrespondierenden Vps29-Konstrukte transformiert. Vom möglichen Wechselwirkungspartner der Retromerproteine, dem VSR, lagen Fluoreszenzkonstrukte vor, u.a. ein cGFP-markiertes BP80.

⁶ FRET von Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

A



B

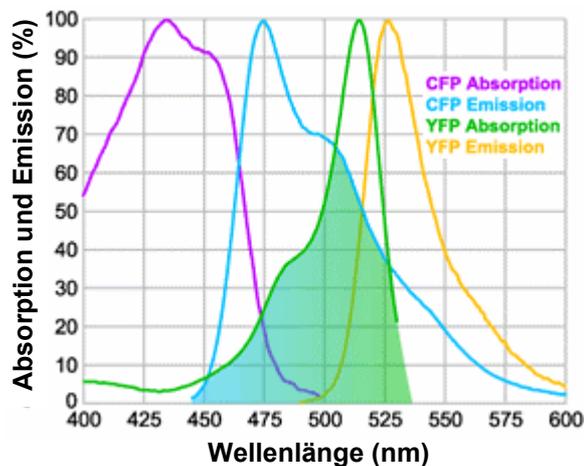
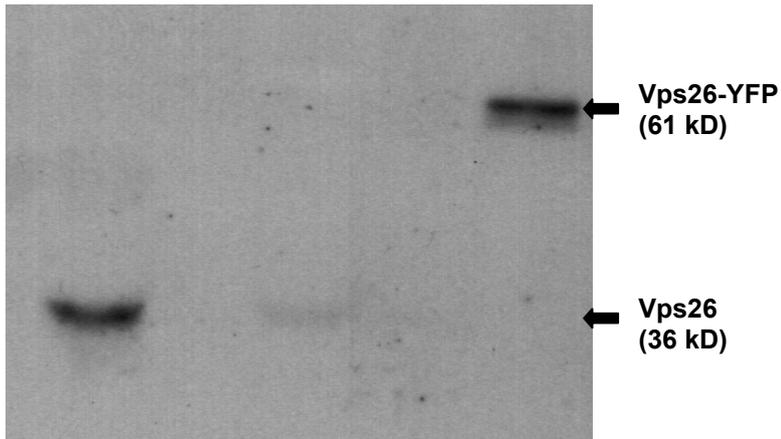


Bild 2-30:

Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) ist ein bereits 1948 entdecktes Phänomen. Seine Erscheinung beruht auf einem strahlungslosen Energietransfer von einem angeregten Chromophor auf ein als Akzeptor agierendes anderes Chromophor. In biologischen Systemen können beispielsweise CFP und YFP als ein FRET-Paar auftreten. In B ist das Absorptions- und Emissionsspektrum beider Fluoreszenzproteine abgebildet. Der Überlapp zwischen CFP-Emission und YFP-Absorption (schattiert) ist dabei eine notwendige Bedingung für das Auftreten des FRET. Die Stärke des Effekts hängt u.a. auch vom Abstand der beiden Transferpartner, sowie vom sog. Förster-Radius r_0 , einer Konstante für jedes FRET-Paar, ab. Bei einem Abstand von r_0 beträgt die Intensität des FRET-Effekts genau die Hälfte des Maximums. Bei CFP/YFP beträgt $r_0=5\text{nm}$. Somit kann ein gemessener FRET auf die Wechselwirkung zweier an Chromophore fusionierter Proteine hinweisen (A).

Quelle Abbildung: (A) Bhat et al, 2006
(B) www.semrock.com

**Bild 2-31:**

Immunoblot mit Anti-Vps26-Antikörpern. Links das Wildtyp Vps26, dann die drei Punktmutationen mit jeweils kaum nachzuweisenden Expressionraten, rechts das deutlich größere Vps26-YFP

Nachdem in den transformierten Protoplasten die Expression der Fusionsproteine durch Immunoblot nachgewiesen war (siehe Bild 2-31), wurden sie mittels Fluoreszenzmikroskopie im CLSM untersucht. In den transformierten Protoplasten konnte zwar eine

Fluoreszenz des Fusionsproteins beobachtet werden, allerdings nicht in distinkten Organellen, sondern nur im Zellkern und geringfügig im Cytosol (siehe Bild 2-32). Zur Kontrolle wurden ein Golgimarker und das in der Arbeit von daSilva et al. (2005) beschriebene cGFP-BP80 kotransformiert. Die fluoreszenzmarkierten Vps29-Fusionsproteine lokalisierten identisch zu den Vps26-Fusionsproteinen.

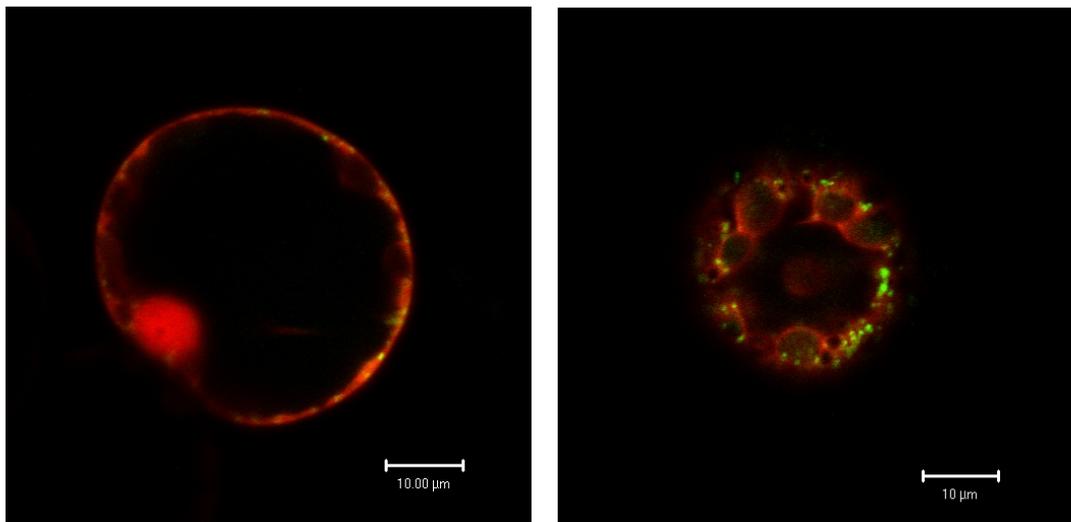


Bild 2-32: Mit Vps26-YFP transformierter Tabakmesophyllprotoplast. Die Markierung befindet sich im Zellkern und in geringem Ausmaß im Cytosol. Die punktierten grünen Strukturen im rechten Teil der Abbildung stammen von cGFP-markiertem BP80.

Aufgrund ihrer Lokalisation im Cytosol und im Zellkern war es jedoch nicht sinnvoll die XFP-Retromerproteine in FRET-Experimenten mit dem cGFP-fusionierten BP80 zu verwenden.

3 DISKUSSION und AUSBLICK

3.1 Identifikation, Klonierung und Expression von pflanzlichen Retromerhomologen

Der Retromerkomplex in Hefe wird aus zwei Subkomplexen gebildet, einem größeren aus Vps35, Vps29 und Vps26 sowie einem kleineren aus Vps17 und Vps5. Alle 5 Proteine sind in Hefe essentiell zur korrekten Funktion des Proteinrecyclings vom Endosom zum trans-Golgi (Seaman, 2005). Zu jedem der Retromerproteine mit Ausnahme des Vps17 wurden in dieser Arbeit ein oder mehrere Homologe in *Arabidopsis* identifiziert. Aufgrund der hier durchgeführten Sequenzalignments (siehe 2.1) sowie Arbeiten anderer Gruppen (Haft et al., 2000) erscheinen die identifizierten Proteine des Retromerkomplexes auch in *Arabidopsis* evolutionär konserviert und könnten auch in Pflanzen eine entsprechende Rolle als Hüllproteinkomplex beim Rezeptorrecycling spielen. Das Fehlen von Vps17 spiegelt möglicherweise die Situation in Säugerzellen wider, in denen neuere Untersuchungen in Zweifel ziehen, ob es sich beim Sorting Nexin 2 (SNX2), dem möglichen Homologen zu Vps17p, um einen Bestandteil des Retromerkomplexes handelt (Gullapalli et al., 2004; Seaman, 2005).

Die in dieser Arbeit gefundene Metallo-Phosphoesterasedomäne des AtVps29 (siehe 2.1) wurde so auch im Vps29 des Menschen und der Hefe beschrieben. Das Hefehomologe wurde darüber hinaus durch Analyse seiner Kristallstruktur charakterisiert (Wang et al., 2005; Collins et al., 2005). Eine erst vor kurzem erschienene Arbeit von Damen et al. (2006) setzt die Metallo-Phosphoesterasedomäne des hVps29 in eine enge Beziehung zur Funktionsweise des Retromers. Die Phosphataseaktivität von Vps29 gegenüber dem serinphosphorylierten sauren Dileucinclustermotiv des Rezeptors wird durch die Anwesenheit von Vps26 und Vps35 stark erhöht. Daher postulieren die Autoren ein Modell bei dem nach der Bindung des hVps35 an den Mannose-6-Phosphatrezeptor, dieser durch hVps29 dephosphoryliert wird und dadurch den retromervermittelten Transport des Rezeptors zum TGN initiiert.

Außer Vps29 kommen alle Retromerproteine aus *Arabidopsis* in mehreren unterschiedlichen Isoformen vor. Auch die Komponenten der COP-Vesikel existieren in verschiedenen Isoformen, ebenso die BP80-Homologen aus *Arabidopsis*. Der Grund für das Vorhandensein verschiedener Isoformen ist zur Zeit unklar. Möglicherweise dienen die verschiedenen Isoformen zur Herausbildung unterschiedlicher Retromerassemblierungen, die wiederum verschiedene Rezeptoren rezyklieren. Die zuvor erwähnten BP80-Homologen werden beispielsweise in *Arabidopsis* in 6 verschiedenen Isoformen kodiert (Hadlington und Denecke, 2000). Auch eine gewebsspezifische Expression ist nicht ausgeschlossen, wozu erste, einfache Tests mit Hilfe der Datenbank des Genevestigator möglich wären (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>).

Bei der klonierten Isoform von Vps26 wurde neben der in den Datenbanken dokumentierten Sequenz eine weitere Sequenz mit einem alternativen Splicing identifiziert. Bei dieser Variante wird ein komplettes Exon nicht transkribiert. Die dadurch entstandene mRNA ist 75bp kürzer (siehe 6.2.3). Im menschlichen Organismus tritt dieses Phänomen hauptsächlich bei Proteinen in Erscheinung, die mit der Signal- und Genregulation in Verbindung stehen, wie beispielsweise Rezeptoren, Signaltransduktions- und transkriptionsfaktoren (Modrek und Lee, 2002). Kazan (2003) nimmt an, dass alternatives Splicing in Pflanzen von Vorteil sein könnte beim Erwerb von überlebenswichtigen Eigenschaften unter Stress, da es für verstärkte evolutionäre Anpassungen sorgt.

Die rekombinante Expression von AtVps5 in *E. coli* gelang in löslicher Form, im Gegensatz zu den Proteinen des größeren Retromersubkomplexes (Vps35, Vps29, Vps26), die nur in unlöslichen Einschlusskörpern (inclusion bodies) exprimiert wurden. Bei der Reinigung des Vps5 kam es zu spezifischem, C-terminalen Abbau, wie er auch beim Homologen aus Hefe von Seaman et al. (1998) beschrieben wurde.

3.2 Retromerproteine und ihre Bindung an Membranen

Viele cytosolische Proteine, die im Vesikeltransport eine Rolle spielen assoziieren sich mit Membranen um ihre Funktion ausüben zu können. Deshalb

wurde durch differentielle Zentrifugationen (siehe 2.6) untersucht, ob die Proteine des Retromerkomplexes membrangebunden oder löslich vorliegen. Die Verteilung auf die P13-, S100- und P100-Fractionen zeigte, dass in Pflanzen Vps35 und Vps29 nur zu geringen Teilen in der cytosolischen Fraktion und hauptsächlich membrangebunden auftreten und bestätigten so die Erkenntnisse aus Hefe. Vps26 hingegen war vor allem im Cytosol zu finden und in wesentlich geringerem Ausmaß in den Membranfraktionen. Als Erklärung dieser Verteilung wurde von Seaman et al. (1998) vorgeschlagen, dass Vps35p im Verbund mit Vps29 im wesentlichen an das Prävakuo-läre Kompartiment (PVC) bindet, um den Rezeptor Vps10p zu rekrutieren. Im Gegensatz dazu soll Vps26p dann die Bindung von oligomeren Vps35p/Vps29p/Vps10p-Komplexen an assemblierte Vps5p/Vps17p-Komplexe in Zonen der Membranknospung ermöglichen und schließlich zur Vesikelbildung führen. Das gegenwärtige Modell des retromervermittelten Transport sieht vor allem die Auftrennung des Retromerkomplexes in zwei Subkomplexe vor, einen größeren zur Erkennung und Rekrutierung des Rezeptors (Vps35, Vps29, Vps26) während der kleinere Subkomplex (Vps5, Vps17) für die Bildung der Transportvesikel sorgt. Für eine genauere Beschreibung dieses Modells sei auf die Einleitung (siehe 1.5) verwiesen.

Welcher Art und wie stark die Bindung an die Membranen ist, sollte durch das Solubilisierungsexperiment mit den P100-Membranen analysiert werden. Durch unterschiedliche Solubilisierungsagentien wurde gezeigt, dass sich Vps35 schon unter relativ milden Bedingungen (250 mM NaCl) von den mikrosomalen Membranen dissoziieren lässt. Da darüberhinaus auch bei der Domänensuche (siehe 2.1) keine Transmembrandomänen erkennbar waren, handelt es sich bei Vps35 aller Wahrscheinlichkeit nach um ein peripher assoziiertes Membranprotein. Diese extrinsische Membranbindung könnte beispielsweise über zum Golgi zurückzutransportierende Rezeptoren erfolgen. Integrale Membranproteine, wie beispielsweise Pep12 werden hingegen erst durch Detergenzbehandlung solubilisiert (Rojo et al, 2003).

Die im Anschluss an die Dissoziation durchgeführte Gelfiltration zeigte, dass auch der Retromerkomplex aus *Arabidopsis* vermutlich aus 2 Subkomplexen

aufgebaut ist. Die einzelnen Komponenten des heterotrimeren großen Subkomplexes des Retromers koeluiieren in derselben Fraktion. Diese Fraktion stimmt zudem genau mit der erwarteten Masse aus der Summe der drei Einzelproteine Vps35, Vps26 und Vps29 überein.

Damit wurden die Ergebnisse aus Hefe bestätigt und darüber hinaus die Hypothese gestützt, dass sich die beiden Subkomplexe funktionell in eine Frachterkennungseinheit und eine Vesikulierungseinheit differenzieren (Seaman et al., 1998; Seaman, 2005).

3.3 Retromer bindet an PVC Membranen und retromerbeschichtete Mikrovesikel

In den Arbeiten mit Hefe und Säugerzellen wird stets die Existenz von aus den fünf retromerbildenden Proteinen aufgebauten retromerbeschichteten Vesikeln postuliert. Solche Vesikel wurden allerdings in diesen Arbeiten nie isoliert oder in situ identifiziert. Bisher gab es auch nur indirekte Hinweise, die für die Existenz solcher Vesikel sprechen. Diese wurden durch Immunoblots nach vorangegangener Gelfiltration von P100-Membranen gewonnen (Seaman et al., 1998). Wie schon unter 2.8 erwähnt, sind die Profile in der Verteilung von Vps35 aus P100-Membranen auf linearen Saccharosedichtegradienten in Hefen sehr ähnlich zu den analog aus *Arabidopsis* erhaltenen Ergebnissen (Seaman et al., 1997, 1998). In beiden Fällen ist Vps35 in einem Bereich niedriger Dichte gemeinsam mit endosomalen und PVC-Markern und darüberhinaus verstärkt in den hochdichten Fraktionen zu finden. Seaman et al. (1998) vermuteten, dass diese hochdichten Fraktionen Teil einer Population von beschichteten Vesikeln oder Tubuli sein könnten. Durch die Negativkontrastierung dieser Fraktionen konnte nun in Pflanzen gezeigt werden, dass dies tatsächlich der Fall ist. Beschichtete Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 90nm waren deutlich unterscheidbar von clathrinbeschichteten Vesikeln und konnten mit Vps35- und Vps26-Antikörpern markiert werden.

3.4 Retromer ist an MVBs/PVC in situ lokalisiert

Fast alle der hauptsächlich auf genetischen Experimenten basierenden Arbeiten zu Retromer kommen zum Schluss, dass die Retromerproteine am PVC lokalisiert sind. Allerdings wurde bis jetzt nur eine Arbeit aus Hefe mit in situ Daten zur Lokalisation veröffentlicht (Seaman et al. 1998). Doch auch in den dort beschriebenen Experimenten wurden die Immunogoldmarkierungen an Kryoschnitten einer Mutante mit einem strukturell stark veränderten PVC durchgeführt.

Bis heute fehlt eine Lokalisation von Retromerproteinen durch Immunfluoreszenz in Wildtyp-Hefezellen. In Säugerzellen wurden allerdings schon einzelne Retromerproteine sowohl durch Immunogoldmarkierungen als auch durch Immunfluoreszenz erfolgreich lokalisiert. Dabei wurden Snx1 und mVps26 mittels Immunogoldelektronenmikroskopie an tubulären Auswüchsen von Endosomen nachgewiesen (Zhong et al., 2002; Arighi et al., 2004). Auch diese Endosomen wiesen des weiteren multivesikuläre Strukturen auf (Seaman, 2004). Immunfluoreszenzmarkierungen an HeLa-Zellen zeigten eine beträchtliche Kolokalisation des mVps26 mit dem Transferrinrezeptor, einem Marker für Frühe Endosomen, allerdings nicht mit dem TGN-Marker TGN46 (Arighi et al., 2004). In der letzteren Arbeit wurde auch eine partielle Kolokalisation von mVps26 mit einem Mannose-6-Phosphatrezeptor beschrieben, der vermutlich von Retromer zum TGN rezykliert wird (siehe auch Einleitung 1.5).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsexperimenten an BY-2 - Zellen kolokalisierten Vps35, Vps29 und Vps26 im CLSM sowohl mit Standard-PVC-Markern wie auch mit VSR_{At-1}. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass auch bei Immunogoldmarkierungen alle drei Antikörper gegen Retromerproteine spezifisch an den MVBs von BY-2 -Zellen lokalisierten. MVBs werden ebenfalls mit VSR_{At-1}-Antikörpern markiert (Li et al., 2002; Tse et al., 2004). Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Lokalisation einzelner Retromerbestandteile in Pflanzenzellen (siehe 2.10 und 2.11) gehen über die bisherigen Ergebnisse der an Hefe und Säugerzellen durchgeführten Untersuchungen hinaus. Da die Markierungen durch Retromerantikörper stets

an der Außenseite der MVBs zu finden waren liegt es nahe, den Ort der Retromerfunktion an der Oberfläche der MVBs zu vermuten.

In Säugerzellen erscheint im Vergleich die mVps26-Immunogoldmarkierung nur zu 25% am eigentlichen Körper der multivesikulären Endosomen, der Hauptteil der Markierung ist an tubulären Ausstülpungen derselben zu detektieren (Arighi et al., 2004). Die Autoren erklären diese Verteilung mit der Anwesenheit der BAR-Domänen von SNX1 und SNX2, den Homologen von Vps5p und Vps17p. Diese haben die Eigenschaft miteinander zu assemblieren (Seaman et al., 1998; Kurten et al., 2001; Seaman, 2005) und sind daher möglicherweise der Grund für diese Ausstülpungen und die daran zu erkennende Markierung. Zum gegenwärtigen Stand der Forschung ist es allerdings nicht möglich zu entscheiden, ob es sich bei dem multivesikulären PVC um das frühe oder das späte Endosom handelt. An der Oberfläche des markierten Organells ist eindeutig eine elektronendichte Struktur zu erkennen wie sie typischerweise an frühen Endosomen aus Säugerzellen vorkommt (Raposo et al., 2001; Raiborg et al., 2003; Sachse et al., 2002) und bei der es sich möglicherweise um Clathrin Lattices handelt. Allerdings fehlen die beschriebenen tubulären Ausstülpungen am pflanzlichen Endosom, was unter Umständen am Fehlen eines Vps17-Homologen in Pflanzen liegen könnte.

3.5 Wortmanninbehandlung trennt Vps35 und VSR_{At-1}

BP80-artige vakuoläre Sortierungsrezeptoren spielen beim Transport zur lytischen Vakuole in Pflanzenzellen eine entscheidende Rolle (Paris und Neuhaus, 2002; Jiang und Rogers., 2003; Robinson et al., 2005). BP-80 ist ein Typ I Membranprotein, das ein funktionelles Analogon zu Vps10p darstellt (Paris und Neuhaus, 2002) und ein Tyrosinmotiv in seinem cytoplasmatischen Schwanz besitzt, das mit dem μ -Adaptin des AP1-Adapterkomplex interagiert (Happel et al., 2004).

VSR_{At-1}, die *Arabidopsis* Isoform von BP80 aus Erbsen, lokalisiert in Tabak BY-2 Zellen hauptsächlich am MVB (Li et al., 2002; Tse et al., 2004). In der Arbeit von Watanabe et al. (2004) aus *Arabidopsis* in der ein VSR-HDEL-Konstrukt exprimiert wurde, führte dies zur Retention desselben im

endoplasmatischen Retikulum. Beim MVB an dem VSR_{At-1} hauptsächlich lokalisiert, handelt es sich um jenes Organell, dessen morphologisches Erscheinungsbild durch Wortmannin sowohl in Pflanzenzellen (Kim et al., 2001, Pimpl et al., 2003) wie auch in Säugerzellen (Bright et al., 2001; Sachse et al., 2002) massiv beeinflusst wird. Wortmannin ist dafür bekannt den vakuolären Proteintransport differentiell zu blockieren (Matsuoka et al., 1995). Bei Wortmannin handelt es sich um einen Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase dessen Wirkung sowohl in Hefe (Stack und Emr, 1994), in Säugern (Vanhaesebroeck et al., 1997), als auch in Pflanzen beschrieben wurde (Park et al., 2003). Es verursacht die Mislokalisierung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR) und seinen Liganden in Säugerzellen (Davidson, 1995; Reaves et al., 1996). Phosphoinositol-3-Phosphat, das Substrat der PI3-Kinasen, lokalisiert sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen in den multivesikulären Endosomen (Gillooly et al., 2000). Vps34p aus Hefe wurde als PI3-Kinase identifiziert (Stack und Emr, 1994) und ist ebenso notwendig zum Recycling des Vps10p vom PVC (Burda et al., 2002). Von Vps34p ist des weiteren bekannt, dass es durch die Bindung an den Vps30p/Vps38p-Komplex die Syntheserate des PI3-Phosphats und damit einhergehend die PI3-Kinaseaktivität erhöht. Ferner wird es auch zur effizienten Membranbindung des aus Vps5p und Vps17p bestehenden kleinen Retromersubkomplexes über deren PX-Domänen (Yu und Lemmon, 2001) benötigt, wobei gezeigt wurde, dass diese Wechselwirkung durch Wortmannin inhibiert wird (Cozier et al., 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch Zusatz von Wortmannin die Intensität der Fluoreszenzmarkierung von Snx1 und Snx2 (den Homologen zu Vps5p und Vps17p aus Säugern) in HeLa-Zellen stark reduziert wurde (Arighi et al., 2004). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für Snx1 in COS7-Zellen nach der Behandlung mit dem verwandten PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 erhalten. Das resultierende Bild einer diffusen Immunfluoreszenz wies darauf hin, dass der kleine Retromersubkomplex ins Cytosol freigesetzt wurde (Zhong et al., 2002).

In Tabakprotoplasten wurde erst kürzlich gezeigt, dass Wortmannin den anterograden BP80-vermittelten Transport zur lytischen Vakuole stört, so dass

die BP80-Liganden sekretiert werden (daSilva et al., 2005). Wortmannin scheint die Verfügbarkeit des Rezeptors im Golgi-Apparat zu reduzieren, da sein Effekt durch die Überexpression von BP80 zum Teil kompensiert werden kann. Hingegen erfolgt keine direkte Beeinflussung der Rezeptor-Ligandenbindung (daSilva et al., 2005). Vor allem aber führt die Störung durch Wortmannin zu einem Transport von BP80 in die Vakuole. Diese Resultate der Wortmanninexperimente ähneln in ihren Aussagen den in Hefe beobachteten Ergebnissen bei Expression von Retromermutanten oder -deletionen (siehe 2.13.2).

Die Behandlung von BY-2 -Zellen mit Wortmannin führt zu einer Trennung der Signale des großen Retromersubkomplexes von denen des PVCs und einer Ausdehnung des PVCs (siehe 2.12). Somit spricht einiges dafür, dass Wortmannin die Funktion des Retromer beeinflusst. Dennoch bleibt die genaue Folge der Wortmannineinwirkung auf den großen Retromersubkomplex (Vps35, Vps29, Vps26) unklar. Während die Ergebnisse von Arighi et al. (2004) den Schluss nahelegen, dass Wortmannin die Ablösung dieser Einheit ins Cytosol hervorruft, konnte dies durch andere Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (M. Seaman, unpublizierte Arbeiten, persönliches Gespräch). Auch deuten die Ergebnisse dieser Arbeit nicht darauf hin, dass der große Retromersubkomplex durch Wortmanninbehandlung ins Cytosol freigesetzt wurde, was neben den mikroskopischen Ergebnissen auch durch die biochemischen Untersuchungen gestützt wurde. Durch das Fehlen von Antikörpern gegen das pflanzliche Vps5 war es allerdings nicht möglich festzustellen, ob der kleine Retromersubkomplex freigesetzt wurde, so wie dies in Säugerzellen der Fall war.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Wortmannin die Signale von Vps35 und VSR_{At-1} trennt. Demnach können die beiden Proteine nicht mehr in Wechselwirkung miteinander stehen und ein funktionierender, retromervermittelter Transport von VSR_{At-1} vom PVC zum TGN kann unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden. Dieses Resultat könnte die von daSilva et al. (2005) beobachtete, durch Wortmannin hervorgerufene Inhibition des retrograden Transports von BP-80 erklären. Welche zellulären

Kompartimente allerdings genau die Orte der neuverteilten Retromeruntereinheiten sind, oder ob es sich dabei um unterschiedliche Domänen ein und desselben Organells handelt, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

3.6 Wechselwirkung von Retromer und VSR

Zur Aufklärung von Protein-Protein-Wechselwirkungen stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Verfügung (Drewes und Bouwmeester, 2003; Phizicky und Fields, 1995). Neben den klassischen Methoden wie Immunpräzipitationen oder Affinitätschromatographie kommen dabei auch proteomweite Screeningmethoden, beispielsweise das Yeast-Two-Hybrid-Screening oder auch neuere Entwicklungen wie Proteinchips zur Anwendung. Daher lag es nahe, mit Hilfe der vorhandenen Antikörper Immunpräzipitationen durchzuführen und so einen Einblick in Wechselwirkungen der Retromerproteine zu erhalten, die wiederum Rückschlüsse auf die Funktionsweise des retromervermittelten Proteintransports zuließen.

3.6.1 Amylase-Assay mit Vps26-Retromermutanten

Zur Charakterisierung des retromervermittelten Transports in Hefe wurden in Hefe oft Mutationsstudien durchgeführt. Durch die einfache und schnelle Generierung von Mutanten in Hefe gelingt es relativ leicht und vor allem schnell Daten über die Funktion der mutierten Proteine zu erhalten. Reddy und Seaman (2001) untersuchten eine Vielzahl von Mutanten der einzelnen Retromerproteine auf mögliche Bindungsmotive und fanden die unter 2.13.2 beschriebenen dominant-negativen Vps26p-Mutanten.

Zur Herstellung von Deletionsmutanten in Pflanzen werden sogenannte T-DNA-Stücke in das Genom via agrobakterieller Transformation eingebaut, die anschließend durch Auskreuzen in stabile Transformanten überführt werden müssen. Anschließend können aus diesen Pflanzen dann auch Suspensionskulturen hergestellt werden. Zwar ist es durch das Vorliegen einer beträchtlichen Zahl sequenzierter Knock-Out-Mutanten, die frei zugänglich sind (beispielsweise im GABI-KAT-Programm des MPI für Züchtungsforschung, Köln, www.gabi-kat.de), relativ leicht möglich diese zu charakterisieren, doch ist

es oft schwierig diesen Deletionsmutanten klar definierte Phänotypen zuzuordnen. Vor allem bei Proteinen, die essentiell im Sekretorischen Weg sind, kommt es zu Letalität oder „kümmerlichen“ Phänotypen. So beschreiben beispielsweise Shimada et al. (2006) den Phänotyp der AtVps29-Deletionsmutante. Diese ist zwar in ihrem Wachstum gestört und sekretiert auch Speicherproteine, doch ließen sich darüber hinaus keine weiteren konkreten Angaben zum Wirkmechanismus oder der Rolle des AtVps29 und der anderen Retromerproteine machen.

Die Erzeugung von Punktmutationen und deren Charakterisierung ist in Pflanzen recht schwierig und technisch aufwendig. Neben dem Nachteil der langen Generationsdauer lässt sich in Pflanzen darüber hinaus weder die Anzahl noch der genaue Ort des Einbaus der mutierten Konstrukte in die Chromosomen vorher festlegen. Die auf diese Weise erhöhte Anzahl variabler Parameter erschwert die Interpretation möglicher Phänotypen in transformierten Pflanzen zusätzlich.

Eine Alternative ist der Übergang zur transienten Expression von dominant-negativen Mutanten in Tabakmesophyllprotoplasten, wie sie schon oft erfolgreich im Zusammenspiel mit dem Amylase-Expressionsassay in der Arbeitsgruppe von Jürgen Denecke (University of Leeds) angewandt wurde (Pimpl et al., 2003; Phillipson et al., 2001; daSilva et al., 2005). Dieses Amylase-Assay bietet neben der leichten Erhältlichkeit von Konstrukten und der Anwendbarkeit in Pflanzen den Vorteil der Quantifizierbarkeit der erhaltenen Daten. Wie in 2.13.2 beschrieben, liegt mit dem Sekretionsindex ein mess- und störbarer, normierter Parameter vor, der die sekretorischen Vorgänge im Inneren der Zelle mathematisch abbildet. Zur Störung des sekretorischen Weges eignet sich neben dem Zusatz verschiedener Reagenzien (z.B. Wortmannin, siehe auch daSilva et al., 2005) auch die Koexpression von mutierten Proteinen. Haben diese einen inhibitorischen Effekt, schlägt sich dieser im Sekretionsindex direkt nieder. Diese Methode sollte bei AtVps26-Mutanten angewandt werden. In der Arbeit von daSilva et al. (2005) wurde der durch Wortmanninzugabe erhaltene Anstieg der Sekretion von Amylase-Sporamin durch Koexpression von Wildtyp-BP80 suprimiert. Daneben wurden

GFP-BP80-Konstrukte unter den Bedingungen der Wortmanninzugabe zur Vakuole transportiert und dort spezifisch abgebaut. Die Hemmung des retromervermittelten Transports sollte ein vergleichbares Resultat liefern.

Allerdings ließ in dieser Arbeit bei keiner der untersuchten *VPS26*-Mutanten ein messbarer Effekt auf den Sekretionsindex feststellen. Dies lag möglicherweise in der niedrigen Expressionsrate der mutierten Proteine (siehe 2.13.2) begründet. Eventuell führten die gewählten Variationen zu einer Missfaltung der Proteine und deren dadurch bedingten Abbau. Da es bei der Expression von Wildtyp-SNARE-Proteinen gelang, Wechselwirkungspartner quantitativ zu titrieren und dadurch den Sekretorischen Weg zu inhibieren (unveröffentlichte Ergebnisse, persönliche Kommunikation J. Bubeck), wurde dieser Ansatz auch mit den Wildtyp-Retromerproteinen versucht. Allerdings war hierbei kein Effekt nachweisbar, obwohl das überexprimierte Protein deutlich nachweisbar war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression von einem Retromer-Coat-Bestandteil keine kompetitive Hemmung der Vesikulierung bedingt. Inzwischen liegen jedoch mit der Beschreibung der Kristallstruktur des humanen Vps29 (Wang et al., 2005) weitere Ansatzpunkte für gezielte Punktmutationen vor, ebenso aus Untersuchungen zu den Bindemotiven in Vps35 (Arighi et al., 2004). In künftigen Experimenten könnten diese Erkenntnisse Eingang finden um den Zusammenhang zwischen Rezeptorrecycling und Retromer direkt messbar nachzuweisen. Des weiteren wäre es möglich durch Transformation von siRNA-kodierenden Plasmiden einzelne Retromerproteine zu depletieren und die Auswirkungen dieser Depletionen zu messen.

3.6.2 Expression fluoreszenzmarkierter Retromerproteine

Die wie unter 2.13.3 durchgeführten Transformationen von Tabakprotoplasten mit fluoreszenzmarkierten Retromerproteinen sollten in FRET-Experimenten Hinweise auf Wechselwirkungen innerhalb des Retromerkomplexes und zwischen Rezeptor und Retromerproteinen liefern. Zunächst gelang es im Immunoblot ein ausreichendes Expressionsniveau der fluoreszenzmarkierten Retromerproteine nachzuweisen. In einem nächsten Schritt wurden Vps29 und Vps26 zunächst alleine, danach mit einem GFP-BP80-Konstrukt als

Modellrezeptor transformiert. Im Fluoreszenzmikroskop war eine Fluoreszenz durch Expression der chromophoren Tags YFP und CFP zu beobachten, allerdings lokalisierten die markierten Vps26- und Vps29-Proteine jeweils cytosolisch und im Nucleoplasma. Das verwendete GFP-BP80-Konstrukt markierte in einem punktierten Muster wie bei daSilva et al. (2006) beschrieben das PVC. Die nicht an Membranen lokalisierten Retromerproteine ließen die Durchführung von FRET-Experimenten nicht sinnvoll erscheinen. Möglicherweise ist durch die Fusion an den C-Terminus der Retromerproteine eine Signalsequenz geschützt und dadurch inaktiviert, was zur Veränderung der Lokalisationseigenschaften geführt haben könnte. Erwähnenswert ist auch, dass es sich bei AtVps26 um ein nur 35-kDa großes Protein handelt, das nur geringfügig größer ist als der Fluoreszenzmarker (26 kDa). Neben der Größe des Tags und dessen Positionierung zum Protein haben aber auch die Länge des Linkers sowie das Expressionsniveau im Transformanten einen Einfluss auf die Funktionalität der transformierten Konstrukte.

Die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide zur Expression der verschiedenen Fusionsproteine lassen sich durch Austausch der unterschiedlichen DNA-„Kassetten“ relativ einfach modifizieren, so dass weitere Konstrukte mit fluoreszierenden Fusionsproteinen des Retromers auch am N-Terminus beispielsweise von Vps35 und Vps5 hergestellt werden können. Dies erscheint sinnvoll, da bereits von Arighi et al. (2004) berichtet wurde, dass das N-terminal modifizierte YFP-Vps35 sowohl fluoresziert als auch funktionell ist.

3.6.3 Identifikation der Vps35-VSR-Interaktion durch Immunpräzipitation

Die Hinweise auf eine Wechselwirkung von Vps35p und dem Carboxypeptidase Y-Rezeptor (CpY) in Hefe beruhen hauptsächlich auf genetischen Untersuchungen (Seaman et al., 1997; 1998; Nothwehr et al., 1999). Zusätzlich war es durch allelspezifische Suppression möglich die für die Vps35-Rezeptor-Interaktion entscheidenden Aminosäuren zu identifizieren. Die für den Rücktransport notwendigen Aminosäurereste unterscheiden sich dabei von den für den anterograden Transport des Rezeptor-Fracht-Komplexes benötigten Resten (Nothwehr et al., 1993; 2000).

Während es allerdings möglich war einen chemisch vernetzten Komplex aus Vps35p mit dem als Modellrecyclingrezeptor verwendeten Membranprotein A-ALP⁷ mit Vps35p-Antikörpern zu präzipitieren, gelang dies nicht mit Vps35p und Vps10p (Nothwehr et al., 2000). Die Autoren spekulierten ob dies möglicherweise aufgrund konformativer Begebenheiten der entsprechenden Aminogruppen im Bindungsmotiv des Vps35p-Vps10p-Komplexes der Fall war. Auch in dieser Arbeit gelang es nicht chemische Vernetzer zur kovalenten Bindung von Rezeptoren und Vps35 einzusetzen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies kann zum einen an der großen Distanz zu reaktiven nukleophilen Aminosäuren (Lysin oder Cystein) im cytoplasmatischen Schwanz des Rezeptors liegen (für Sequenzen siehe Hadlington und Denecke, 2000), aber auch am niedrigen pH-Wert im PVC (ca. 5,5 - 6) bei dem die meisten Vernetzer mit Lysin nicht reagieren. Eventuell könnte hier der Einsatz von membranpermeablen Vernetzern mit längerem Linkerabstand zwischen den zu vernetzenden Gruppen Abhilfe schaffen und es ermöglichen einen kompletten, chemisch vernetzten Retromer-VSR-Komplex zu isolieren.

Durch Co-Immunpräzipitationsexperimente mit immobilisierten Vps35-Antikörpern konnte allerdings eine Interaktion des Retromers mit einem vakuolären Sortierungsrezeptor nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass in Pflanzen Retromer mit vakuolären Sortierungsrezeptoren interagiert. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass das Rezeptorrecycling durch retromervermittelten Transport bewerkstelligt wird.

3.7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Identifizierung der pflanzlichen Retromerproteine, sowie deren Lokalisation und ersten Einblicken in ihre Funktion die Grundlage für weiterführende Studien des retromervermittelten Transports in Pflanzen geschaffen.

Vor allem im Nachweis von Interaktionen einzelner Retromerproteine bieten die beschriebenen und vorhandenen Methoden zahlreiche Möglichkeiten diese

⁷ A-ALP: Chimäres Protein aus der cytosolischen Domäne von DPAP A und der Transmembran- und luminalen Domäne von Alkaliner Phosphatase (Nothwehr et al., 2000)

weiter zu untersuchen. So könnte, analog zu Arbeiten in Hefe mit Hilfe des vorhandenen AtVps5-Fusionskonstrukts sogenannte Pulldown-Assays durchgeführt werden. Diese erlauben zumindest in Hefe den Nachweis von Interaktionen innerhalb des Retromerkomplexes. Auch besteht die Möglichkeit zusätzlich zu den vorhandenen Antikörpern auch gegen AtVps5 Antikörper herzustellen um seine Lokalisation, Interaktion und Funktion zu untersuchen. Im Umfeld dieser Affinitätsverfahren sei auch auf die im Rahmen ihrer Diplomarbeit von Frau Oneke (Universität Heidelberg, Fakultät für Biowissenschaften, 2003) generierten Konstrukte hingewiesen, durch die jeweils N-terminal ProteinA-markierte oder C-terminal TAP-markierte Retromerproteine exprimiert werden. Diese im nativen System exprimierten Proteine könnten eventuell einen unmittelbaren und damit einfacheren Zugang zu assemblierten Retromerkomplexen, möglicherweise inklusive unbekanntem Interaktionspartnern bieten.

Weitere Proteinwechselwirkungen könnten durch Yeast-Two-Hybrid-Screenings und das Overlay-Assays (auch bekannt als Far-Western-Analyse) identifiziert werden. Diese können helfen aufzuklären welches Protein die Rolle von Vps17 einnimmt, das in *Arabidopsis* keine Sequenzhomologen besitzt. Zur Identifizierung von unbekanntem Bindungspartnern ließe sich eine Peptid-massenspektroskopie anschließen, die es erlaubt unbekannte Proteine schnell und einfach zu identifizieren (Peptid-Mass-fingerprinting).

Auch die in Tabakprotoplasten mit Vps26 vorgenommenen *in vivo*-Untersuchungen bieten Ansätze für weiterführende Experimente: So gibt es inzwischen durch die Kristallisation von Vps29p und durch Bindungsstudien an Vps35p weitere Erkenntnisse zu konservierten Motiven und damit Möglichkeiten zu deren Mutation (siehe auch 1.5). Des Weiteren könnten auch mit RNAi-Konstrukten die verschiedenen Retromerproteine transient depletiert werden. Auf diese Weise könnten in Pflanzenzellen ähnliche Phänotypen und Effekte der Sekretion wie in den Hefedeletionsmutanten erhalten werden und so weitere Einblicke in den retromervermittelten Transport bieten.

Daneben ließen sich als weiterer, sehr einfach durchzuführender Ansatz in einem *in vivo*-System auch heterologe Wettbewerbsassays mit den pflanzlichen

Retromeragenen in den entsprechenden Hefedeletionsmutanten durchführen und damit die Frage beantworten, ob es möglich ist mit den pflanzlichen Homologen des Retromerkomplexes die Funktion der deletierten Heferetromergene zu komplementieren.

Die Identifikation von retromerbeschichteten Vesikeln gibt zur Hoffnung Anlass, dass trotz der stets vorhandenen Instabilität von Hüllprotein-Membran-Interaktionen (vor der Fusion mit der Zielmembran müssen die Hüllproteine aller Klassen beschichteter Transportvesikel von der Membran abdissoziieren) die Isolation von retromerbeschichteten Vesikeln grundsätzlich möglich sei und damit ein weiterer Zugang zur genaueren Analyse derselben. Eine solche Analyse könnte dann nicht nur die mit der Immunpräzipitation begonnene Untersuchung von primären Interaktionspartnern umfassen, sondern auch eine genauere Analyse der spezifischen Zusammensetzung der Retromervesikel sowie ihrer Fracht. Auch ist nicht bekannt, wie die Energie für die Vesikulierung aufgebracht wird. Im Falle der COP- und Clathrin-Vesikel sind GTPasen beteiligt. Eine solche ist bis heute in der Literatur im Zusammenhang mit Retromer noch nicht beschrieben.

Mit dieser Arbeit sind die Grundlagen zur weiteren Untersuchung des retromervermittelten Transports in Pflanzen gelegt. Die aufgezeigten Möglichkeiten zur weiteren Erforschung werden in ihrer Kombination neue Einblicke in die Retentionsmechanismen von PVC-Proteinen und deren Recycling durch Retromer in Pflanzenzellen bieten.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Materialien und Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden ausschließlich Chemikalien der Reinheit pro analysis (p.a.) der Firmen Amersham Bioscience (Freiburg), Applichem (Heidelberg), Fluka, Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen, Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Salz- und Substanzmischungen zur Herstellung von Medien waren, soweit nicht anderweitig angegeben, von Difco Lab (Detroit, USA), GibcoBRL (Paesley, UK), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen). Lieferanten für Enzyme (Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerasen, reverse Transkriptase, DNase, RNase), sowie Größenmarker von DNA und Proteinen waren Amersham Bioscience (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Roche (Mannheim), Serva und Stratagene (Heidelberg). Nitrocellulosemembranen wurden von Pall (Dreieich), ECL-Filme von Amersham Bioscience (Freiburg) bezogen.

4.2 Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 Bakterienstämme

Die Kultivierung der verwendeten Bakterien erfolgte bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm (Innova 4230, Brunswick Scientific). Die Zelldichten wurden photometrisch mit Hilfe eines Spektralphotometer (DU 640B Spectrophotometer, Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

Die zur Klonierungen verwendeten *E. coli* – Stämme waren:

DH5 α (F⁻(Φ 80d Δ (*lacZ*)M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17* (r_k⁻m_k⁺) *supE44 relA1 deoR* Δ (*lacZYA-argF*) U169)

NovaBlue: *endA1 hsdR17*($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF'*[*proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ *M15::Tn10* (Tc^R)]

Die Expression von Proteinen erfolgte in folgenden Stämmen:

BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: B F⁻ *ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA Hte* [*argU ileYleuW Cam*^r] (Stratagene)

RosettaTM(DE3): F⁻ *ompT hsdS_B*($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3) pRARE² (Cam^R) (Novagen)

4.2.2 Verwendete Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende kommerziell erhältlichen Vektoren zur bakteriellen Expression von Proteinen verwendet, die zum Teil den individuellen Bedürfnissen dieser Arbeit angepasst wurden (siehe 4.6.11): *pET-30a-c*, *pET-21d*, *pET-24d* und *pET-23d* (Novagen), pQE30-32 (Qiagen), pGEX-4T-2 (Amersham Biosciences) sowie *pPROEXTMHTb* (Invitrogen).

- pGEX-4T-2:
pBR322*ori*, *tac*-Promotor, *lacI*^q, Glutathion-S-Transferase-ORF, *amp*^r
- *pET-21d*:
f1ori, T7/*lac*-Promotor, *lacI*^q, pBR322*ori*, *amp*^r
- *pET-24d*:
f1ori, T7/*lac*-Promotor, *lacI*^q, pBR322*ori*, *kan*^r
- *pET-23d*:
f1ori, T7-Promotor („plain“), pBR322*ori*, *amp*^r
- *pET-30a-c*:
f1ori, T7/*lac*-Promotor, His-ORF, *lacI*^q, pBR322*ori*, *kan*^r

- pQE30-32:
ColE1*ori*, T5/lac-Promotor, His-ORF, amp^r
- pPROEXTMHTa-c:
f1ori, TRC-Promotor, His-ORF, *lacI*^q, pBR322*ori*, TEV-Cleavagesite, amp^r

Zur transienten Expression in Tabak-Protoplasten wurden modifizierte Vektoren des pGreen-Systems (<http://www.pgreen.ac.uk>), sowie modifizierte pUC18-Vektoren (von Dr. J. Denecke, University of Leeds, zur Verfügung gestellt) verwendet.

- pGreen-35S-Kassette:
35S-Promotor, CaMV-Terminator, amp^r
- modifizierter pUC18-Vektor:
35S-Promotor, nos-Terminator, amp^r

Zur Klonierung der durch PCR-Amplifikation gewonnenen Gene wurde der Vektor des pGEMTeasy-Systems (Promega, Mannheim) eingesetzt:

- pGEMTeasy:
f1ori, *lacZ* α , T7-Promotor, amp^r

Des weiteren wurde der in dieser Arbeit verwendete Pep12 (Syp21)-Antikörper mit Hilfe eines von Dr. N. Raikhel zur Verfügung gestellten Plasmids zur Expression des GST-markierten Proteins hergestellt (da Silva Conceicao et al., 1997).

- pGEX-5X-3::Pep12:
ORF von Pep12 mit N-terminalem GST-Tag

4.3 Desoxyoligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Desoxyoligonukleotide wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen. Die unten aufgeführten Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die für die Mutationen von *VPS26* in der ersten Spalte angegebenen Zahlen geben die Position des Desoxyoligonukleotids innerhalb der entsprechenden Sequenz an (siehe Anhang 6.2.2). Alle anderen Oligonukleotide wurden zur vollständigen Amplifikation des jeweiligen ORFs erstellt. Unterstrichenen Nukleotide zeigen die Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym, fettgedruckte die mutierten Codons.

VPS35-spezifische Oligonukleotide

<i>VPS35</i> for (5'-UTR, 1-15)	ACA TAG AAT GAT CGC CGA CGA C
<i>VPS35</i> rev (3'-UTR, 2370-2349)	TTC ATT CAA ACC ATT CCA TTT TG
<i>VPS35</i> BamHI for (1-24)	<u>GGA TCC</u> GCG CTA TGA TCG CCG ACG ACG ATG AGA AG
<i>VPS35</i> Sall rev (2370-2349)	GAC <u>GTC GAC</u> GCG TTC ATT CAA ACC ATT CCA TTT TG
<i>VPS35</i> <i>NcoI</i> for (1-24)	<u>CCA TGG</u> GTA TGA TCG CCG ACG ACG ATG AGA AG
<i>VPS35</i> <i>NheI</i> rev (2370-2349)	<u>GGC TAG CCT</u> CAT TCA AAC CAT TCC ATT TTG
<i>VPS35</i> <i>Clal</i> for (1-24)	<u>CGA TCG ATG</u> ATC GCC GAC GAC GAT GAG AAG
<i>VPS35</i> <i>BamHI</i> rev (2370-2349)	<u>GGG ATC CCT</u> CAT TCA AAC CAT TCC ATT TTG
<i>VPS35</i> <i>At3g51310</i> for (1-20)	ATG ATC GCA GAC GGA TCA GA
<i>VPS35</i> <i>At3g51310</i> rev (2370-2345)	CTA TAC TTT GAT CGC CTG GTA TCT CT
<i>VPS35</i> <i>At1g75850</i> for (1-18)	ATG ATC GCC GAC GAC GAT
<i>VPS35</i> <i>At1g75850</i> rev (2517-2495)	TCA TTC AAA CCA TTC CAT TTT GA
<i>VPS35</i> <i>At2g17790</i> for (1-18)	ATG AGA ACG CTC GCC GGA
<i>VPS35</i> <i>At2g17790</i> rev (2493-2471)	TCA CAG CTT GAT AGG GTC ATA TTT CT

VPS26-spezifische Oligonukleotide

VPS26 <i>Bam</i> HI for (1-24)	<u>GGA TCC</u> GCG CTA TGA ATT ATC TTC TTG GAG CTT TC
VPS26 <i>Sac</i> I rev (909-885)	CCG <u>AGC TCC</u> ATC AAG ATG TCT CTT CCT TGA GCC TG
VPS26 <i>Nco</i> I for (1-24)	<u>CCA TGG</u> TCA TGA ATT ATC TTC TTG GAG CTT TC
VPS26 <i>Nhe</i> I rev (909-885)	<u>GGC TAG CCT</u> CAA GAT GTC TCT TCC TTG AGC CTG
VPS26 Δ stop <i>Nco</i> I rev (904-885)	CAT <u>CCC ATG GCT</u> AAT GTC TCT TCC TTG AGC CTG
VPS26 IA for (412-444)	GGT TAT GCT GGA AGC GCC GTG GAA TAC CAG GAC
VPS26 IA rev (444-412)	GTC CTG GTA TTC CAC GGC GCT TCC AGC ATA ACC
VPS26 VP for (415-447)	TAT GCT GGA AGC ATC CCG GAA TAC CAG GAC TTT
VPS26 VP rev (447-415)	AAA GTC CTG GTA TTC CGG GAT GCT TCC AGC ATA
VPS26 IVAP for (412-447)	GGT TAT GCT GGA AGC GCC CCG GAA TAC CAG GAC TTT
VPS26 IVAP rev (447-412)	AAA GTC CTG GTA TTC CGG GGC GCT TCC AGC ATA ACC

VPS29-spezifische Oligonukleotide

VPS29 <i>Bam</i> HI for (1-22)	<u>GGA TCC</u> GCG CTA TGG TGC TGG TAT TGG CAT TGG
VPS29 <i>Sac</i> I rev (573-551)	CCG <u>AGC TCG</u> GAA CTA CGG ACC AGA GCT GGT AGT AG
VPS29 <i>Rca</i> I for (1-22)	<u>TCA TGA</u> CAA TGG TGC TGG TAT TGG CAT TGG
VPS29 <i>Nhe</i> I rev (573-551) (inkl. BamHI)	<u>GGA TCC CGG CTA GCT</u> AGC TAC GGA CCA GAG CTG GTA GTA G
VPS29 Δ stop <i>Rca</i> I rev (567-538)	<u>TCA TGA</u> CAC CAG AGC TGG TAG TAG GGG GCT TCT TGA A

VPS5-spezifische Oligonukleotide

VPS5 <i>Nco</i> I for (1-30)	CAT <u>GCC ATG GAG</u> AGC ACG GAG CAG CCG AGG AAC ATC
VPS5 <i>Nhe</i> I rev (1210-1181)	GCT <u>AGC TAG CTT</u> AGA CAG AAT AAG AAG CTT CAA GTT TGG

sonstige Oligonukleotide

Sequenzierprimer 1 (Vps35)	CTC TTC GGT GTT GCT GAT G
Sequenzierprimer 2 (Vps35)	GTC CAG ACG ATC GGA ATA G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
Sp6	CGA TTT AGG TGA CAC TAT AG
pGex for	ATA GCA TGG CCT TTG CAG G
pGex rev	GAG CTG CAT GTG TCA GAG G
T7 term	CTA GTT ATT GCT CAG CGG T
35S for	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC C
dT	TTT TTT TTT TTT

4.4 Antikörper

4.4.1 Primäre Antikörper

Im Folgenden eine Übersicht über die benutzten Primärantikörper einschließlich der zu ihrer Herstellung benutzten Antigene, sowie die im Western-Blot verwendeten Verdünnungen oder Konzentrationen und zugehörige Verweise.

- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Calnexin aus *Ricinus communis*; Verdünnung: 1:10.000 (Pimpl et al., 2000)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein reversibel glykosiliertes Polypeptid (RGP1) des Trans-Golgi-Apparats aus *Pisum sativum*, Verdünnung: 1:20000 (Dhugga et al., 1997)
- monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die 100kDa Untereinheit der E1/E2-Typ H⁺-ATPase aus Maiskoleoptilen, Verdünnung: 1:500 (Fichmann et al., 1989)

- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen den vakuolären Sortierungsrezeptor VSR_{At-1} aus *Arabidopsis thaliana*, Verdünnung 1:2500 (Tse et al., 2004)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen PEP12 (SYP21) aus *Arabidopsis thaliana*, Verdünnung 1:2500 (da Silva Conceicao et al., 1997)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vps35 aus *Arabidopsis thaliana*, Verdünnung: 1:5000
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vps26 aus *Arabidopsis thaliana*, Verdünnung: 1:2500
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vps29 aus *Arabidopsis thaliana*, Verdünnung: 1:2500
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vps26p aus *Saccharomyces cerevisiae*, Verdünnung: 1:200 (Reddy und Seaman, 2001)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vps35p aus *Saccharomyces cerevisiae*, Verdünnung: 1:200 (Seaman et al., 1998)
- polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen Vps26p und Vps35p aus *Mus musculus*, Verdünnung: 1:200; (Seaman, 2004)

4.4.2 Sekundäre Antikörper

- polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:20000; Sigma (Deisenhofen)
- polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:10000; Sigma (Deisenhofen)

4.5 DNA und Proteinsequenz Computeranalyse

Nach Erhalt der DNA- und Proteinsequenzen der Retromerkomponenten aus Hefe unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> wurden die entsprechenden Arabidopsissequenzen ebenfalls im Internet auf der Homepage des MIPS (Munich Information Centre for Protein Sequences) <http://mips.gsf.de/projects/plants> unter Verwendung des Programms BLAST (Altschul et al., 1990), sowie die verschiedenen „Gene Accession Numbers“ unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ermittelt.

Die DNA- und Proteinsequenzanalyse, sowie das Alignment der Sequenzen wurde mit folgenden Programmen durchgeführt: BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), Biology Workbench (Web-basierte Arbeitsumgebung: <http://workbench.sdsc.edu>), sowie BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>, Smith et al., 1996). Hierbei kam es bei multiplen Sequenzalignments (multiple sequence alignments) zur Anwendung des ClustalW-Algorithmus (Thompson et al., 1994). Die phylogenetischen Bäume wurden mit Hilfe des Drawgram-Algorithmus (Felsenstein, 1988) erstellt, die prozentualen Identitäten im Vergleich zum jeweiligen *Arabidopsis*-Protein mit dem Align-Algorithmus (Myers und Miller, 1988).

4.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis* wurde das RNeasy Plant RNA-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierzu wurden ca. 100 mg Arabidopsisblätter und -sprosse in flüssigem Stickstoff gemörsert und in RLT-Puffer suspendiert. Das weitere Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers. Sämtliche zur RNA-Gewinnung eingesetzten Gerätschaften wurden zuvor bei 250°C über Nacht erhitzt. Die isolierte RNA wurde in DMPC-behandeltem Wasser bei -78°C aufbewahrt. Ca. 2 µg RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1% Agarose in TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,5; 0,5 µg/ml EtBr) und auf das Vorhandensein der großen

ribosomalen RNA-Untereinheiten überprüft. Die gewonnene RNA wurde zur cDNA-Synthese weiterverwendet, wenn beide Banden vorhanden waren.

4.6.2 Reverse Transkription (RT)

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA wurde aus zuvor gewonnener Gesamt-RNA mithilfe der Reversen Transkriptase aus dem *avian myoblastosis virus* (AMV) der Firma Roche (Mannheim) hergestellt. Die RT-Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurde der gesamte Ansatz für 5 min bei 70°C hitzedeaktiviert und die gewonnene cDNA konnte direkt als Templat in PCRs eingesetzt werden. Zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

4.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 4 pmol spezifischen Primern, 40 ng cDNA oder 50 pg Plasmid-DNA als Templat, 200 µM je Nukleotid, 0,5 U *Taq*-, 1 U *Pfu*- oder 0,5 U-1 U *DeepVent*-DNA-Polymerase und dem entsprechendem 1*PCR-Puffer hergestellt. Die anschließende Reaktion wurde in der PCR-Maschine PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Firma Biozym (Hess. Oldendorf) durchgeführt. Dazu wurden Temperatur-Programme wie z.B. 95°C / 2 min; [95°C / 30 s; 55°C - 65°C / 1 min; 72°C / 1,5 min] x 25 – 35; 72°C / 10 min gewählt.

4.6.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese mit 1% Agarose in TAE bei einer Feldstärke von 10 V/cm angewandt. Die Färbung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), die Geldokumentation mit dem Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290.

Zur Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

4.6.5 Spektrophotometrische Bestimmung der Reinheit und Konzentration von RNA und DNA

Die Bestimmung der Nukleotidkonzentration erfolgte photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometer (DU 640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter) in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) bei einer Wellenlänge von 260 nm und der Berechnung mittels des entsprechenden Absorptionskoeffizienten (1 OD doppelsträngiger DNA = 50 mg/ml; 1 OD einzelsträngiger RNA = 40 mg/ml). Wie in "Molecular Cloning" (Sambrook et al., 1989) beschrieben, ist es möglich, die Qualität von Nukleinsäuren durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm einzuschätzen. Bei reiner DNA befindet sich der Quotient bei 1,8-2,0. Bei der Maxipräparation von Plasmid-DNA wurde, falls der OD_{260}/OD_{280} Quotient unter 1,6 lag, eine weitere Aufreinigung mit Phenol und Chloroform durchgeführt.

4.6.6 Ligation

Durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) in ihre Zielvektoren kloniert. Ein typischer 10 µl Ligationsansatz wurde 1-2 h bei RT inkubiert und anschließend transformiert. PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des *pGEMTeasy Vector Systems* der Firma Promega (Mannheim) gemäß den Herstellerangaben ungerichtet kloniert.

4.6.7 Transformation von Bakterien

4.6.7.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden mit der Calciumchlorid-Methode hergestellt. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert bis eine OD_{595} von 0,6 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur auf 4°C abgekühlt und bei 2000 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml 100 mM $MgCl_2$ gewaschen, nochmals zentrifugiert und analog mit 20 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und abermals zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Sediment in 10 ml kalter Gefrierlösung (85 mM $CaCl_2$ in 13 Vol% Glycerinlösung) resuspendiert

und in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -78°C gelagert. Sämtliche Lösungen wurden auf Eis gekühlt, ebenso wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Die Zentrifugationen erfolgten jeweils ungebremst.

Zur Transformationen von 1 ng Plasmid-DNA oder 10-20 µl Ligationsansätzen wurde die Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1983) angewandt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, mit dem Transformationsansatz versetzt und 10 min inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 40 s bei DH5α- oder NovaBlue-Zellen und für 20 s bei BL21- oder Rosetta-Zellen. Nach erfolgtem Hitzeschock wurden die Zellen auf Eis gekühlt und nach maximal 1 min 0,5 ml SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2,0 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben, vorsichtig gemischt und bei 100 rpm für 30 min – 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar-Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.7.2 Anlegen von Langzeitkulturen

Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 500 µl von 5 ml Übernachtskulturen mit 500 µl Glycerinlösung (65 % (v/v) Glycerin; 0,1 M MgSO₄; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) gemischt und bei -78°C gelagert.

4.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA

4.6.8.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA für weiterführende Klonierungen und Sequenzierungen wurde von der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989) Gebrauch gemacht. Zur Erhöhung der DNA-Qualität wurden Sedimente von 1,5 ml Übernachtskulturen in einem Waschschrift zuerst in 1 ml PBS oder STE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut bei 2000 g (Eppendorf Centrifuge 5417R) für 2 min zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 100 µl Lösung I (25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA) aufgenommen, mit 200 µl Lösung II (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS) versetzt.

Nach 5 minütiger Inkubation wurde das Lysat mit 150 µl Lösung III (5 M K-Acetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure) neutralisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer anschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei 14000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt, durchmischt und erneut bei 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Präzipitat in 70% Ethanol gewaschen, abermals abzentrifugiert und nach Entfernung der Waschlösung bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst, mit 0,5 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

4.6.8.2 Midipräparation von Plasmid-DNA

Mittlere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 100 ml Übernachtskultur mit dem *NucleoBond-Kit PC100* der Firma Macherey-Nagel (Düren) isoliert. Das Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers.

4.6.8.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden Sedimente von 800 ml 24-Stundenkulturen in 8 ml TE resuspendiert und für 5 min mit 25 mg Lysozym auf Eis behandelt und anschließend mit 2 ml EDTA (0,5 M, pH 8) versetzt und für weitere 5 min inkubiert. 1 mg RNase und 150 µl 10 % Triton X-100-Lösung wurden in 1 ml TE zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer einstündigen Zentrifugation in einem Sorvall SS34-Rotor wurde der Überstand abgenommen und mit 20 ml äquilibriertem Phenol (pH 8,0; 0,1% Hydroxychinolin) versetzt und gut durchmischt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch bei 4000 rpm in einem Swing Out-Rotor (Megafuge 1.0R, Heraeus) zentrifugiert und anschließend der Überstand auf gleiche Weise mit 20 ml Chloroform extrahiert. Der wässrige Überstand wurde mit TE auf 15 ml aufgefüllt und mit 1,5 ml 5 M NaClO₄ und 8 ml Isopropanol versetzt, anschließend gut gemischt und 15 min bei 10000 rpm in einem HB6-Swing Out-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das anschließend getrocknete Präzipitat in 500 µl TE resuspendiert. Die Konzentration und

Reinheit der DNA wurde wie beschrieben bestimmt. Die so gewonnene, sehr hoch konzentrierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

4.6.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA wurde grundsätzlich in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gespalten. Die Enzyme wurden entsprechend der Angaben der Hersteller zusammen mit den zugehörigen Puffern und der empfohlenen Temperatur verwendet. Zur Dephosphorylierung wurde 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP) für 1 h bei 37°C zugesetzt. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden entweder durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion oder direkt mit dem NucleoSpin Extract Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) gereinigt.

4.6.10 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden 2 µg Plasmid-DNA mittels NaOAc/Ethanol-Fällung gefällt und getrocknet. Alle für diese Arbeit benötigten Sequenzierungen wurden von der Firma MWG (Ebersberg) ausgeführt.

4.6.11 Plasmidkonstruktionen

Zur Herstellung der Plasmide zur Transformation von Protoplasten oder zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde wie folgt vorgegangen. Die jeweiligen Gene wurden durch PCR amplifiziert und in pGEMTeasy ligiert. Nach Restriktionsendonukleasespaltung wurden die jeweiligen Gene in die entsprechenden Zielvektoren subkloniert. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert (4.6.10).

- pET-HTGSTTEV-21d/24d

Der modifizierte pET-21d-Vektor wurde wie folgt erhalten: Aus pET-M30 (EMBL, Heidelberg) wurde durch XbaI/NcoI-Spaltung die (His₆-Tag)-(GST-Tag)-(TEV-Schnittstelle)-Sequenz erhalten und in den ebenso gespaltenen pET-21d-Vektor ligiert. Bei pET-24d wurde analog vorgegangen.

- **pGEX-GST::*AtVPS35***
AtVPS35 (At3g51310, Gene Acc. Number: NP_190699) wurde aus cDNA unter Verwendung von *VPS35* for und *VPS35* rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch NotI-Spaltung aus pGEMT-easy in pGEX-4-T2 (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) kloniert.
- **pPROEXTMHT::*AtVPS35***
AtVPS35 (At3g51310, Gene Acc. Number: NP_190699) wurde von pGEX-GST::*AtVPS35* unter Verwendung von *VPS35* BamHI for und *VPS35* Sall rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch BamHI/PstI-Spaltung aus pGEMT-easy in pPROEXTMHT (Invitrogen Life Technologies) kloniert.
- **pET-HTGSTTEV-21d/24d::*AtVPS35***
AtVPS35 (At3g51310, Gene Acc. Number: NP_190699) wurde von pGEX-GST::*AtVps35* unter Verwendung von *VPS35* NcoI for und *VPS35* NheI rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch NcoI/NheI-Spaltung aus pGEMT-easy in den ebenso gespaltenen pET-HTGSTTEV-21d/24d::*AtVPS26* kloniert.
- **pET-30a::*AtVPS35***
AtVPS35 (At3g51310, Gene Acc. Number: NP_190699) wurde aus pPROEXTMHT::*AtVPS35* durch BamHI/XhoI-Spaltung erhalten und in den ebenso gespaltenen pET-30a kloniert.
- **pQE32::*AtVPS35***
AtVPS35 (At3g51310, Gene Acc. Number: NP_190699) wurde aus pPROEXTMHT::*AtVPS35* durch BamHI/PstI-Spaltung erhalten und in den ebenso gespaltenen pQE32 kloniert.

- **pET-HTGSTTEV-21d/24d::*AtVPS26***
Aus pET-M30 (EMBL, Heidelberg) wurde durch XbaI/NcoI-Spaltung die (His₆-Tag)-(GST-Tag)-(TEV-Schnittstelle)-Sequenz erhalten und in den ebenso gespaltenen pET-21d/24d::*AtVPS26*-Vektor ligiert.
- **pET-21d/24d::*AtVPS26***
Um *AtVPS26* (At5g53530, Gene Acc. Number: NP_200165) in die einander überlappende NcoI/NheI multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) zu ligieren, wurde zuerst ein ca. 300bp langes Hilfsfragment nur mit NcoI aus pGEMTeasy::*AtVPS29* erhalten und ungerichtet in den nur mit NcoI gespaltenen pET-21d-Vektor ligiert. Dieser Vektor wurde zunächst mit NheI, dann mit NcoI gespalten und das Hilfsfragment entfernt. Das aus cDNA unter Verwendung von *VPS26* NcoI for und *VPS26* NheI rev Primern (siehe 4.3) amplifizierte *AtVPS26* konnte nach NcoI/NheI-Spaltung aus pGEMT-easy in diesen Vektor ligiert werden. Bei pET-24d wurde analog vorgegangen.
- **pET-30a::*AtVPS26***
Aus pET-21d/24d::*AtVPS26* wurde durch NcoI/XhoI-Spaltung die *AtVPS26*-Sequenz erhalten und in den ebenso gespaltenen pET-30a-Vektor ligiert.
- **pPROEXTMHT::*AtVPS26***
AtVPS26 (At5g53530, Gene Acc. Number: NP_200165) wurde aus cDNA unter Verwendung von *VPS26* BamHI for und *VPS26* SacI rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch BamHI/PstI-Spaltung aus pGEMT-easy in pPROEXTMHT (Invitrogen Life Technologies) kloniert.
- **pQE32::*AtVPS26***
Das Vorgehen bei diesen Konstruktion entsprach demjenigen bei *AtVPS35*.

- pET-HTGSTTEV-21d/24d::*AtVPS29*
AtVPS29 (At3g47810, Gene Acc. Number: NP_974400) wurde aus cDNA unter Verwendung von VPS29 RcaI for und VPS29 NheI rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch RcaI/NheI-Spaltung aus pGEMT-easy in den mit NcoI/NheI gespaltenen pET-HTGSTTEV-21d/24d::*AtVPS26*-Vektor ligiert. RcaI und NcoI bilden kohäsive Enden. Die Verwendung von NcoI ist bei Vps29 nicht möglich, da das Gen selbst eine NcoI-Schnittstelle enthält.
- pET-21d/24d::*AtVPS29*
- pET-30a::*AtVPS29*
Wie im zuvor beschriebenen Fall wurde *AtVPS29* durch RcaI/NheI-Spaltung aus pGEMT-easy in den entsprechenden mit NcoI/NheI gespaltenen Zielvektor ligiert.
- pPROEXTMHT::*AtVPS29*
- pQE32::*AtVPS29*
Das Vorgehen bei diesen Konstruktion entsprach demjenigen bei *AtVps26*.
- pET-HTGSTTEV-21d/24d::*AtVPS5*
- pET -21d/24d::*AtVPS5*
Das Vorgehen bei diesen Konstruktion entsprach demjenigen bei *AtVPS35*.
- pET-21d/24d::HTGSTTEV-*AtVPS26*::*AtVPS29*
- pET-21d/24d::HTGSTTEV-*AtVPS29*::*AtVPS26*
- pET-21d/24d::HTGSTTEV-*AtVPS26*::HTGSTTEV-*AtVPS29*
- pET-21d/24d::*AtVPS26*::*AtVPS29*
- pET-21d/24d::*AtVPS29*::*AtVPS26*
Der ORF des jeweils hinteren Gens wurde aus dem entsprechenden Vektor mit XbaI/XhoI erhalten und anschließend in den mit NheI/XhoI gespaltenen Vektor des vorderen ORFs ligiert. Das Vorgehen entspricht dem in 2.3 (Bild 2-9) beschriebenen Prinzip. Bei *AtVPS29* kann es trotz einer im Gen

liegenden XbaI-Schnittstelle angewandt werden, da diese durch Methylierung geschützt ist.

- 35S::*AtVPS29*::YFP/CFP

Zunächst wurde mittels XbaI/NotI-Spaltung aus pECFP/YFP (Clontech) die DNA-Sequenz des Chromophors erhalten und in *pPROEXTMHTb* (Invitrogen) kloniert. Aus diesem Vektor wurde es anschließend mit XbaI/EcoRI in einen ebenso gespaltenen pET21-Vektor kloniert („pET-YFP/CFP“). *AtVPS26* (At5g53530, Gene Acc. Number: NP_200165) wurde aus cDNA unter Verwendung von VPS26 BamHI for und VPS26 Δ stop NcoI rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch BamHI/NcoI-Spaltung aus pGEMT-easy in diesen, entsprechend gespaltenen pET-YFP/CFP-Vektor ligiert. Aus diesem wurde das *AtVPS26*::YFP-Konstrukt anschließend mittels XbaI/SacI-Spaltung und Ligation in den 35S-Vektor des pGreen-Systems kloniert.

- 35S::*AtVPS29*::YFP/CFP

AtVPS29 (At3g47810, Gene Acc. Number: NP_974400) wurde aus cDNA unter Verwendung von VPS29 BamHI for und VPS29 Δ stop RcaI rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch BamHI/RcaI-Spaltung aus pGEMT-easy in den mit BamHI/NcoI gespaltenen 35S::Vps26::YFP/CFP ligiert.

- 35S::*AtVPS26WT*::pDE4

AtVPS26 (At5g53530, Gene Acc. Number: NP_200165) wurde mit NcoI/BamHI aus pET-21d::*AtVPS26* gespalten und in den ebenso gespaltenen, von Jürgen Denecke zur Verfügung gestellten Vektor pDE4 (siehe Leborgne-Castel et al., 1999) ligiert. Das Gen befindet sich zwischen dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S-Promotor und dem NOS-Terminator des pUC-basierten pDE4-Vektors. Mit der aus dem pET21-Vektor stammenden NheI-Schnittstelle war es möglich die anderen Wildtyp-Gene mit NcoI/NheI subzuklonieren.

- 35S::AtVPS29WT::pDE4
AtVPS29 (At3g47810, Gene Acc. Number: NP_974400) wurde nach *RcaI/NheI*-Spaltung aus pGEMT-easy in den mit *NcoI/NheI* gespaltenen 35S::AtVPS26WT::pDE4-Vektor ligiert.
- 35S::AtVPS35WT::pLL4
AtVPS35 (At3g51310, Gene Acc. Number: NP_190699) wurde vom oben beschriebenen pGEX-GST:: *AtVPS35* unter Verwendung von *VPS35* *Clal* for und *VPS35* *BamHI* rev Primern (siehe 4.3) amplifiziert und durch *Clal/BamHI*-Spaltung aus pGEMT-easy in den ebenso gespaltenen, von Jürgen Denecke zur Verfügung gestellten Vektor pLL4 (Brandizzi et al., 2003) ligiert.
- 35S::AtVPS26-Mutanten::pDE4
Die Mutanten der verschiedenen *Vps26* Konstrukte wurden durch Austausch der Isoleucin143 oder Valin144 Codons unter Verwendung von *VPS26* IA for/rev, *VPS26* VP for/rev, *VPS26* IVAP for/rev Primern (siehe 4.3) hergestellt. Hierzu wurde vom oben beschriebenen 35S::AtVPS26WT::pDE4 mit *Vps26* for und dem *VPS26* IA rev oder dem *Vps26* rev und dem *VPS26* IA for jeweils ein Teil der kodierenden Sequenz amplifiziert. Beide Fragmente wurden hybridisiert und mit den äußeren *Vps26* Primern (*VPS26* *NcoI* for und *VPS26* *NheI* rev) weiter amplifiziert und anschließend nach *KpnI/Clal* – Spaltung die Wildtyp-Sequenz im ebenso gespaltenen 35S::AtVPS26WT::pDE4 ersetzt. Das Vorgehen bei sämtlichen Mutanten war analog.

4.7 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Die oben beschriebenen Expressionsvektoren (s. 4.6.11) wurden in BL21(DE3)-CodonPlus oder Rosetta-Zellen durch Hitzeschock transformiert (s. 4.6.7.1) und die Bakterien in LB mit den Antibiotika Chloramphenicol (34 µg/ml) und Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) bei 37°C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in einer Verdünnung von 1:50 in 4 ml frisches LB überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von max. 0,8 kultiviert.

Bei Erreichen dieser OD wurden die Kulturen geteilt und in der einen Hälfte mit 0,5 mM IPTG die Expression für drei Stunden bei 24°C induziert. Alternativ wurden im Rahmen des Solubilitätsscreens (siehe 4.8.1) auch Expressionen bei 16°C über Nacht durchgeführt. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, ihr Sediment in 500 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 95°C für fünf Minuten gekocht. Die Proben wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Von Kulturen, die das gewünschte Protein gut exprimierten, wurden stabile Langzeitkulturen angelegt und die Proteine daraufhin in einem großen Maßstab exprimiert. Dazu wurden die Übernachtskulturen in 500 ml LB überimpft und diese in entsprechender Weise induziert und nach der Expression bei 6000 g (Sorvall RC5CPlus, Rotor SLA3000) zentrifugiert, die Sedimente mit PBS gewaschen und in Falconröhrchen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -78°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

4.8 Aufreinigung der Fusionsproteine

4.8.1 Solubilitätsscreen

Von 50 ml wie unter 4.7 beschriebenen Expressionsansätzen wurden nach Ende der Expressionszeit 2 ml Aliquots entnommen und für vier Minuten bei 4000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Das Sediment wurde in 1 ml PBS gewaschen und bei -78°C eingefroren. Zur Aufarbeitung wurde es in 500 µl eines der weiter unten aufgeführten Lysispuffer resuspendiert und mit mehreren Ultraschallpulsen (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 5*30 s, 200 W) lysiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 20000 g wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen vom unlöslichen Rückstand getrennt. Die löslichen Proteine wurden mittels Flüggefällung (siehe 4.10.3) gefällt und in 30 µl Probenpuffer aufgenommen. Zum unlöslichen Rückstand wurden direkt 50 µl Probenpuffer gegeben. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 95°C und anschließender Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden 10 µl von beiden Fraktionen zur Untersuchung der Anwesenheit der überexprimierten Proteine in einem SDS-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Die unterschiedlichen Lysispuffer hatten die folgende Zusammensetzung:

pH-Screen

pH5	50 mM Na Acetate pH 5	50 mM NaCl	5 mM EDTA
pH6	50 mM MES pH 6	50 mM NaCl	5 mM EDTA
pH7	50 mM Tris pH 7	50 mM NaCl	5 mM EDTA
pH8	50 mM Tris pH 8	50 mM NaCl	5 mM EDTA
pH9	50 mM Tris pH 9	50 mM NaCl	5 mM EDTA

Salz-Screen

0.1 S	50 mM Tris pH 7.5	100 mM NaCl	5 mM EDTA
0.5 S	50 mM Tris pH 7.5	500 mM NaCl	5 mM EDTA
1 S	50 mM Tris pH 7.5	1 M NaCl	5 mM EDTA
0.1 KS	50 mM Tris pH 7.5	100 mM KCl	5 mM EDTA
1 KS	50 mM Tris pH 7.5	1 M KCl	5 mM EDTA

Detergenz-Screen

NP40	20 mM Tris pH 7.5	50 mM NaCl	0.2% NP 40
Triton X-100	20 mM Tris pH 7.5	50 mM NaCl	0.2% Triton X-100
Tween-20	20 mM Tris pH 7.5	50 mM NaCl	0.2% Tween-20
Natriumdesoxycholat	20 mM Tris pH 7.5	50 mM NaCl	0.2% Natriumdesoxycholat

Stabilisator-Screen

NP40	20 mM Tris pH 7.5	50 mM NaCl	10% Glycerin
Triton X-100	20 mM Tris pH 7.5	50 mM NaCl	50% Glycerin

4.8.2 Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose 4B

Jedes der unter 4.7 hergestellten 500 ml-Sedimente wurde in 20 ml eiskaltem Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM KCl; 5 mM EDTA; 2 mM Leupeptin; 0,7 µM Pepstatin; 2 µg/ml Aprotinin; 1 mM PMSF) resuspendiert und mit mehreren Ultraschallpulsen (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 5*30 s,

200 W) lysiert. Durch anschließende Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall Discovery 90SE, Rotor Ti-60) wurde der cytosolische Überstand erhalten und mit 500 µl Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, Freiburg) versetzt. Die Bindung des Proteins an die Beads erfolgte während einer Stunde bei 4°C auf dem Drehrad. Danach wurde der gesamte Ansatz in eine Leersäule gegeben und fünf Mal mit jeweils 6 ml Lysispuffer gewaschen, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit 10 ml Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M KCl; 5 mM EDTA). Die gebundenen Proteine wurden fünf Mal mit je 500 µl Elutionspuffer (10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl; pH7,5) eluiert. Pro Fraktion wurden 20 µl-Proben einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassieärbung analysiert.

4.8.3 Aufreinigung aus Einschlusskörpern (Inclusionbodies)

Das wie in 4.7 beschrieben hergestellte 500 ml-Sediment wurde in 20 ml eiskaltem Puffer A (50 mM TRIS pH 8,5; 200 mM NaCl; 10 % Glycerin; 10 mM Imidazol pH 8,0; 3 mMol β-Mercaptoethanol; 0,1 mM PMSF) resuspendiert und mit mehreren Ultraschallpulsen (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 5*30 s, 200 W) lysiert. Durch anschließende, einstündige Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall Discovery 90SE, Rotor Ti-60) wurde der cytosolische Überstand erhalten und verworfen. Der unlösliche Rückstand, wurde anschließend zweimal mit Waschpuffer A (Puffer A mit 1 % Triton X-100 und 1 M Harnstoff) gewaschen und jeweils 30 Minuten wie oben zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 30 ml Solubilisierungspuffer (Puffer A mit 8 M Harnstoff) gelöst und daraufhin an 3 ml Ni-NTA Fastflow (Qiagen, Hilden) gebunden. Die Bindung des Proteins an die Nickelsäule erfolgte durch einstündiges Umpumpen der Proteinlösung bei 4°C und einer Flußrate von 1 ml/min auf die entsprechend gepackte Säule. Danach wurden die gebundenen Proteine mit 20 ml Waschpuffer B (Solubilisierungspuffer mit 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Rückfaltung bzw. Renaturierung des gebundenen Proteins erfolgte über einen Gradienten von Solubilisierungspuffer zu Puffer A von dem 100 ml bei einer Flußrate von 1 ml/min über die Säule gegeben wurde („on-column-refolding“, siehe auch Glynou, K. et al., 2003). Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten von Imidazol in Puffer A. Hierzu wurden bei gleichbleibender

Flußrate je 20 ml Puffer A mit 20 mM, 60 mM, 80 mM und schließlich 250 mM Imidazol über die Säule geleitet bis kein Protein mehr eluiert wurde. Die Elution wurde über die UV-Absorption kontrolliert. Von den einzelnen Fraktionen wurden danach je 20 µl in einem SDS-Gradientengel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie gefärbt.

4.8.4 TEV-Spaltung und Aufreinigung

Die wie unter 4.8.3 gewonnenen Fraktionen gereinigter und rückgefalteter Fusionsproteine wurden vereint und mit Hilfe eines 30 kDa Zentrifons (Centriprep, Millipore, Bedford, USA) auf ca. 5 ml in Puffer B (50 mM TRIS pH 8,5; 200 mM NaCl; 10 % Glycerin; 3 mMol β-Mercaptoethanol; 0,1 mM PMSF) eingeeengt. Zur Spaltung des Tags mit TEV-Protease wurde die Lösung mit Puffer C (Puffer B mit 5 mM DTT) auf 50 ml verdünnt und 1% TEV-Protease (Invitrogen) zugegeben. Nach 36stündiger Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation zur Abtrennung ausgefallenen Proteins wurde der Überstand abermals mit Hilfe eines 10 kDa Zentrifons konzentriert und zur weiteren Reinigung in 2 ml Probevolumen einer Gelfiltration (Superdex S75 26/60) mit Laufpuffer D (20 mMol Tris pH 8,5; 200 mM NaCl; 1 % Glycerin) unterzogen. Die Elution wurde via UV-Absorption bei 280 nm aufgezeichnet.

4.9 Gewinnung und Aufreinigung von Antikörpern

Als Antigene wurden die Retromeruntereinheiten AtVps29, AtVps26 als His₆-GST-TEV-Fusionsproteine und GST-AtVps35 aus Einschlußkörpern (Inclusion bodies) und GST-Pep12 als affinitätsgereinigtes Fusionsprotein verwendet. Das GST-AtVps35 wurde dabei direkt aus den solubilisierten Einschlußkörpern im folgenden Schritt eingesetzt. Dabei wurde zur Solubilisierung der oben (4.8.3) beschriebene Puffer A mit 8 M Harnstoff und ohne Imidazol verwendet. Die gereinigten rekombinanten Proteine wurden in einer präparativen SDS-Gelelektrophorese (Geldicke 0,75mm) getrennt und die Gele eine halbe Stunde in 250 mM KCl-Lösung bei 4°C gefärbt, wobei die Proteine als weiße K-SDS-Proteinkomplexe sichtbar werden. Die Banden wurden dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Biotrap Elektroelutionssystems (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

Das Extrakt wurde in Zentrifugationsgefäßen (Centriprep, Millipore, Bedford, USA) aufkonzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt. Das eluierte Protein wurde nochmals in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Abbauprodukte analysiert. Die den Informationen der Anbieter entsprechenden Proteinmengen wurden dann an diese zur Immunisierung der Kaninchen versandt (AtVps35 und Pep12: BioScience, Göttingen; AtVps26 und AtVps29: Eurogentec, Seraing, Belgien). Die erhaltenen Seren wurden entweder direkt verwendet oder die IgGs vom Serum auf einer ProteinG–Sepharose CL-4B Säule (P3391; Sigma, Taufkirchen) getrennt und mit 100 mM Glycin-HCl, pH 2,9 eluiert wie bei Harlow und Lane (1988) beschrieben. Die aufgereinigten Fraktionen wurden dann mit 0,02 % NaN₃ konserviert und bei 4°C aufbewahrt. Die Seren wurden bei -20°C gelagert. Die Antikörper wurden in den oben (siehe 4.4.1) angegebenen Verdünnungen verwendet.

4.10 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

4.10.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zu 20 µl einer Probe wurden mit 1 ml Bradfordreagenz (0,007 % (w/v) Serva Blue G250; 2 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure in aqua_{bidest.}) gegeben und 10 min inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve über die Messung der Extinktion bei 595 nm (DU 640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter) bestimmt (Bradford, 1976).

4.10.2 TCA-Fällung von Proteinen

Den Proteinlösungen wurden hierzu 10 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) zugesetzt und die Proteine eine Stunde bei 0°C gefällt. Nach einer halbstündigen Zentrifugation bei 20000 g (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg) wurde das Präzipitat mit eiskaltem 80 % Aceton oder 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.10.3 Chloroform/Methanol-Fällung von Proteinen

Mit dieser Methode lassen sich vor allem Salze und Detergenzien sehr gut entfernen. Zu einem Volumen einer Proteinlösung wurden vier Volumina

Methanol gegeben, gut gemischt, danach ein Volumen Chloroform, nochmals gut gemischt und zuletzt drei Volumina Wasser und nochmals gut gemischt. Die Lösung wurde dann bei 9000 g (Eppendorf miniSpin plus-Tischzentrifuge, Hamburg) für zwei Minuten zentrifugiert, die obere Phase vorsichtig abgenommen (das Proteinpräzipitat befindet sich in der Interphase) und vier Volumina Methanol zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für zwei Minuten bei 12000 g sedimentiert das Protein und der Überstand wurde abgesaugt (Wessel und Flügge, 1984).

4.10.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmten Proteinproben wurden stets in SDS-Probenpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2,5 % (w/v) SDS; 12,5 % (v/v) Glycerin; 2,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,0625 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 10-12%igen Trenngel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS; 10-12 % (w/v) Polyacrylamid; 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,1 % (v/v) TEMED) der eine Fokussierung der Proben in einem 4% igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS; 4 % (w/v) Polyacrylamid; 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,1 % (v/v) TEMED) vorangestellt war (Lämmli, 1970). Die Elektrophorese wurde in Gelapparaturen der Firma Hoefer Scientific Instruments (California, USA) bei 100 V – 220 V in Laufpuffer (50 mM Tris-HCl; pH 8,3; 380 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) durchgeführt.

4.10.4.1 2-D-Gelelektrophorese

Die aus den Immunpräzipitationsexperimenten (siehe 4.12.5 und 2.13.1) eluierten Proteine wurden mit einer Chloroform-Methanol-Fällung (4.10.3) gefällt und die getrockneten Proteinpräzipitate in 7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 2 % (w/v) CHAPS; 0,5 % (v/v) IPG Buffer pH 3-10 (Amerham Biosciences, Freiburg, Germany), 360 mg/ml DTT, sowie einer Spur Bromphenolblau (BPB) gelöst. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 14000 g (Eppendorf Centrifuge 5417R) zur Entfernung unlöslicher Aggregate wurden 125 μ l Proben mit 40 μ g Protein auf einen 7 cm IPG-Streifen mit einem

stabilisierten, linearen pH-Gradienten von pH 3-10 gemäß den Herstellerangaben für das IPGphor-System (Amerham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Die Rehydrierung der Streifen wurde für 14 Stunden unter einer Spannung von 30 V im proteinhaltigen Puffer durchgeführt. Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) schloß sich daran wie folgt an: 1 Stunde mit 500 V, 1 Stunde mit 1000 V, danach linear ansteigend bis maximal 8000 V. Die IEF wurde bis 30000 Vh durchgeführt, die Streifen wurden dann zweimal für je 15 Minuten in 10 ml Äquilibrationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; eine Spur BPB) äquilibriert. Dabei wurden beim ersten Mal 10 mg/ml DTT, beim zweiten Mal 25 mg/ml Iodacetamid zugegeben. Die äquilibrierten Streifen wurden dann auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel ohne Sammelgel fixiert und unter Standardbedingungen eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden anschließend elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen und mit verschiedenen Antikörpern analysiert.

4.10.5 Coomassie-Färbung

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Gele zwischen einer und sechzehn Stunden in Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) auf einer Standardlaborwippe inkubiert und anschließend in Fixierlösung (50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) zwei bis vier Stunden entfärbt.

4.10.6 Western-Blot-Analyse (Immunoblot)

4.10.6.1 Elektrophoretischer Proteintransfer

Vor dem elektrophoretischen Proteintransfer, der im Naßblotverfahren (Bio-Rad, München) erfolgte, wurden die Nitrocellulosemembranen (Pall, Dreieich) in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA in einer Stunde oder bei 150 mA über Nacht durchgeführt.

4.10.6.2 Proteinfärbung auf Blots

Die Membranen wurden nach dem Proteintransfer mit Ponceaurot (0,2 % (w/w) Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure) zwei Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend in TBS-T auf einer Standardlaborwippe wieder vollständig entfärbt.

4.10.6.3 Immunnachweis

Die Membranen wurden zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 60 Minuten in Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T) inkubiert und dreimal jeweils zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Danach wurden die Membranen in Primärantikörper in den angegebenen Verdünnungen eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum inkubiert und wieder dreimal jeweils 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation in Sekundärantikörperlösung für eine Stunde in den angegebenen Verdünnungen in Blocklösung bei Raumtemperatur und das erneute Waschen mit zweimal TBS-T und einmal TBS für jeweils 15 Minuten.

Zur ECL-Detektion wurde dann das Detektionsreagenz wie folgt verwendet: 200 µl 250 mM Luminol in DMSO, 89 µl 90 mM p-Coumarsäure in DMSO und 2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 wurden auf 20 ml mit aqua_{bidest.} aufgefüllt und 6 µl 30 %ige H₂O₂-Lösung zugesetzt und gemischt. Filme (Hyperfilm, RPN 2104, Amersham, GB) wurden nach dem Versetzen der Membranen mit dem Detektionsreagenz sofort zwischen 20 s und einer Stunde belichtet.

4.11 Pflanzenmaterial

4.11.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (var. Columbia) Pflanzen wurden auf Erde (TKS1, Floragard, Oldenburg) unter Kaltlicht (430 W Son-T Agro-Lampen, Philips, Hamburg) bei Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit), 22-25°C und 40-60 % relativer Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus aufgezogen.

4.11.2 Kultivierung von *Nicotiana tabacum*

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Ökotyps SR1) wurden auf festem Nährmedium (4,30 g/l MS medium basal salt mixture [Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande, M0221.0050]; 20 g/l Saccharose; 0,2 g/l MES; pH 5,7 mit KOH eingestellt; 0,8 g/l Agar) in WECK-Gläsern (WECK, Wehr) unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei 24°C und 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ aufgezogen. Sämtliche Anzuchtgläser sowie Medien wurden autoklaviert, alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Samen wurden vor der Aussaat durch zweiminütige Inkubation in 12 %iger Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert und anschließend dreimal mit aqua_{bidest.} gewaschen und zur Keimung auf das feste Nährmedium pipettiert. Nach 14 Tagen wurden die Pflanzen vereinzelt. Zur *in vitro*-Vermehrung wurden Sproßstecklinge verwendet.

4.11.3 Zellkulturen

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

4.11.3.1 *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur

Die Subkultivierung der *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur (Ökotyp Col-0) erfolgte durch Zugabe von 5 g abgeseibten Zellen in 100 ml frisches MS-Medium (4,41 g/l MS medium including vitamins [Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande M0222.0050]; 30 g/l Saccharose; 1 mg/l 2,4-D; pH 5,7 mit KOH eingestellt). Die Kulturen wurden bei 25°C und 100 Upm in einem Orbitalschüttler im Dunkeln gehalten. Die Zellen wurden vier Tage nach der Subkultivierung für die Zellfraktionierung verwendet.

4.11.3.2 BY-2 Suspensionszellkultur

Die Subkultivierung der Tabak Bright Yellow 2 (BY-2)-Suspensionszellkultur erfolgte wöchentlich in einem Verdünnungsverhältnis von 1:50 in frischem MS-Medium (4,30 g/l MS medium basal salt mixture [Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande, M0221.0050]; 30 g/l Saccharose; 0,2 mg/l 2,4-D; 200 mg/l KH_2PO_4 ; 100 mg/l Myoinositol; 1 mg/l Thiamin; pH 5,8 mit KOH eingestellt). Die Kulturen wurden bei 25°C und 150 Upm in einem Orbitalschüttler im Dunkeln

gehalten. Die Zellen wurden ca. fünf Tage nach der Subkultivierung für die Zellfraktionierung verwendet.

4.11.4 Protoplastengewinnung aus Tabakmesophyll

Vier bis sechs Wochen nach Vereinzeln oder *in vitro*-Vermehrung wurden die Blätter der Tabakpflanzen zur Gewinnung von Protoplasten unter sterilen Bedingungen geerntet. Den Blättern wurden mit einem Skalpell die Hauptleitbündel entfernt und die untere Epidermis mit dem Skalpell oder einem speziell angefertigten Stößel angeritzt bzw. punktiert. Anschließend wurden die Blätter mit der Blattunterseite auf ca. 7 ml Enzymlösung (0,4 % (w/v) Cellulase R10 Onozuka; 0,2 % (w/v) Mazerozym R10 Onozuka in TEX-Puffer [500 mg/l MES; pH 5,7 mit KOH eingestellt; 3,1 g/l Gamborg B5 Medium; 400 mM Saccharose; 750 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 250 mg/ml NH_4NO_3 in aqua_{bidest.}]) in Petrischalen gelegt und für 20 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Petrischalen vorsichtig geschwenkt und eine weitere Stunde inkubiert. Insgesamt wurden für eine Isolierung 7 Petrischalen verwendet, die allesamt nach der Inkubation durch ein 100 µm Nylonnetz filtriert wurden. Alle Petrischalen und das Nylonnetz wurden anschließend nochmals mit 50 ml TEX-Puffer ausgeschwenkt und gespült, so dass 100 ml vereinigte Protoplastenlösung in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen bei 80 g für 15min ungebremst zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus) werden konnten. Die Zelltrümmer und die Enzymlösung wurden daraufhin mit einer Pasteurpipette mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Watson Marlow U310) entfernt und die flotierenden Protoplasten in zwei Waschschritten mit Elektroporationspuffer (10 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH eingestellt; 400 mM Saccharose; 600 mg/l CaCl_2 ; 6 g/l KCl in aqua_{bidest.}) und abermaligen, ungebremsten Zentrifugationen wie oben auf eine Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ Protoplasten/ml konzentriert.

4.12 Zellbiologische Methoden

4.12.1 Subzelluläre Fraktionierung

100 g frisch abgenutzte suspensionskultivierte Arabidopsiszellen wurden zwei Minuten mit einem Handmixgerät (ESGE-Zauberstab M150; ESGE;

Mettlen, Schweiz) in 100 ml gekühltem Homogenisationspuffer (0,4 M Saccharose; 40 mM HEPES-KOH pH 7,0; 10 mM KCl; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 2 mM o-Phenanthrolin; 0,5 µg/ml Leupeptin; 2 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-4-(4-guanido)-butan [E-64]) auf Eis homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch zwei Schichten Miracloth® (Calbiochem) filtriert und das erhaltene Filtrat für 10 min bei 3000 g vorzentrifugiert (Sorvall RC5C Plus, Rotor SS34), um Zelltrümmer und Zellwände zu entfernen. Der Überstand wurde dann für 20 min bei 13000 g zentrifugiert (Sorvall RC5C Plus, Rotor SS34). Das Sediment (P13) wurde aufbewahrt und der Überstand nochmals für 60 min bei 100000 g zentrifugiert (Sorvall Discovery 90 SE, Rotor AH629). Der erhaltene cytosolische Überstand wurde als S100-Fraktion bezeichnet, das Sediment mit den Membranbestandteilen als P100-Fraktion. Bei den suspensionskultivierten BY-2 Zellen wurde analog vorgegangen mit der Ausnahme, dass die Zellen zuerst mit einem Glasdouncer (Cole Parmer Instruments Co.) grob homogenisiert und anschließend bei 100 bar durch eine Jeda-Press (LINCA, Tel-Aviv, Israel) passiert wurden. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis oder in gekühlten Gefäßen und Zentrifugen durchgeführt. Gleiche Mengen Protein aus jeder Fraktion wurden mit Methanol/Chloroform gefällt, in SDS-Probenpuffer resuspendiert, auf einem 10 % Polyacrylamidegel getrennt und mittels Western Blot und verschiedenen Antikörpern analysiert.

4.12.2 Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Das P100-Sediment wurde auf einen linearen 15-55 % (w/w) Saccharosedichtegradienten in Homogenisationspuffer (siehe 4.12.1) geladen. Die Trennung erfolgte in einer 16-stündigen isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation bei 100000 g (Sorvall Discovery 90 SE, Rotor AH629). Der Gradient wurde in 30 Fraktionen zu je 1,3 ml mit Hilfe einer an eine P1-Pumpe (Amersham Bioscience, Freiburg) angeschlossenen Kapillare fraktioniert. Die Fraktionen wurden nach Messung der jeweiligen Protein- und Zuckerkonzentration mit TCA gefällt und in 350 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proteinproben wurden auf einem 10 % Polyacrylamidegel

getrennt und mittels Western Blot und verschiedenen Antikörpern u.a. gegen Markerproteine analysiert.

4.12.3 Dissoziation von P100-Membranen

Die P100 Membranfraktion aus dem Arabidopsissuspensionskulturlysate wurde in Homogenisationspuffer alleine, sowie in Homogenisationspuffer (siehe 4.12.1) mit 0,25 M NaCl; 1 M NaCl; 0,1 M Na₂CO₃; 2 M Harnstoff und 1 % Triton X-100 resuspendiert und eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall Discovery M120, Rotor S45A) für 60 min resedimentiert und die löslichen und unlöslichen Fraktionen auf einem 12 % Polyacrylamidgel getrennt und mittels Western Blot und Antisera gegen AtVPS35 analysiert.

4.12.4 Gelfiltration dissoziierter P100-Membranen

Die P100 Membranfraktion wurde in Homogenisationspuffer (siehe 4.12.1) mit 250 mM NaCl resuspendiert, sowie eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und die Membranen durch eine weitere einstündige Zentrifugation bei 100000 g (Sorvall Discovery M120, Rotor S45A) abermals sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend auf einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) mit obigem Puffer bei einer Flussrate von 0,4 ml/min in 1 ml-Fractionen getrennt. Die Proteinkonzentration wurde via UV-Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Die gesammelten Fraktionen wurden mit TCA gefällt und auf einem 10 % Polyacrylamidgel getrennt und mittels Western Blot und verschiedenen Antikörpern analysiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde das Standardisierungspaket MW-GF-1000 (Sigma-Aldrich) zur Kalibrierung von 29 kDa – 700 kDa in mehreren Kalibrationsläufen unter denselben Bedingungen eingesetzt.

4.12.5 Immunpräzipitation

Fraktionen aus dem dichten Teil (47-50 % (w/w) Saccharose) der isopyknischen Saccharosedichtegradientenzentrifugation einer P100 Arabidopsis-membranfraktion (s. 4.12.1) wurden vereint und eine Stunde bei 4°C mit 2 % (w/v) CHAPS behandelt. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei

100000 g wurde der Überstand mit einer Suspension kovalent an ProteinG-Sepharose4 Fast Flow Beads (Amerham Biosciences, Freiburg) gebundener AntiVps35-Antikörper versetzt. Die Kopplung von 1 ml Antiserum (35 mg/ml Gesamtproteingehalt) an 200 µl ProteinG-Beads erfolgte gemäß Herstellerangaben und wurde ergänzt durch die kovalente Bindung (Vernetzung) mit Dimethylpimelimidat (DMP) nach den Angaben von PIERCE (Rockford, IL, USA). Vor der Verwendung der gekoppelten Antikörper wurden die Beads einmal mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert, um eventuell ungebundene IgGs zu entfernen. Zu 100 µl dieser AntiVps35-Beads wurde 1 ml (5 mg/ml Gesamtproteingehalt) des CHAPS-löslichen Extrakts gegeben und bei 4°C für zwei Stunden auf dem Drehrad inkubiert, fünfmal mit je 1 ml Homogenisationspuffer (siehe 4.12.1) mit 2 % (w/v) CHAPS und fünfmal mit je 1 ml Homogenisationspuffer ohne CHAPS gewaschen. Die Beads wurden bei 500 g eine Minute sedimentiert und gebundene Proteine fünfmal mit je 1 ml Elutionspuffer (100 mM Glycin, pH 2,5) eluiert und direkt mit 100 µL 1M Tris-HCl, pH 8,8 pro ml Eluat neutralisiert. Das Eluat wurde anschließend mit TCA gefällt und die eluierten Proteine in einer ein- oder zweidimensionalen SDS-PAGE getrennt, elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen und mit Hilfe verschiedener Antikörper analysiert.

4.12.6 α -Amylase-Assay

4.12.6.1 Transformation der Protoplasten

Die Transformation der wie unter 4.11.4 gewonnenen Protoplasten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurde ausschließlich die wie unter 4.6.8.3 hergestellte DNA verwendet. Diese wurde hierzu in Elektroporationspuffer (10 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH eingestellt; 400 mM Saccharose; 600 mg/l CaCl_2 ; 6 g/l KCl in aqua_{bidest.}) entsprechend auf 100 µl verdünnt. Zu 500 µl der Protoplastensuspension wurden in einer Halbmikroküvette die 100 µl der DNA-Lösung gegeben, durch kurzes Aufschütteln gut durchmischt und für fünf Minuten inkubiert. Nach der Elektroporation (910 µF, 130 V) wurde die transformierte Protoplastensuspension nochmals für 30 min inkubiert und dann

mit 2 ml TEX-Puffer in eine 4 cm Petrischale überführt und für 24 h bei RT im Dunkeln inkubiert.

4.12.6.2 Ernten der Protoplasten und des Mediums

Nach der 24stündigen Inkubation wurde die Transformationslösung in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 100 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) für fünf Minuten zentrifugiert. 1 ml des Mediums unter den flotierenden intakten Protoplasten wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Zelltrümmer wurden in einer anschließenden Zentrifugation bei 13000 g für 10 min entfernt (Eppendorf Centrifuge 5417R). Nach Entnahme des Mediums wurde die verbliebene Suspension mit 250 mM NaCl-Lösung zehnfach verdünnt und fünf Minuten bei 100 g in einer ungebremsten Zentrifugation (Megafuge 1.0R, Heraeus) sedimentiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe entfernt und das Protoplastensediment auf Eis oder bei -78°C gelagert.

4.12.6.3 Messung der α -Amylaseaktivität

Die α -Amylaseaktivität wurde sowohl in den entnommenen Medienproben als auch in den Protoplastensedimenten gemessen. Zur Messung im Medium wurde dieses im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Amylaseextraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0) gemischt und jeweils die Aktivität in 30 μl einer solchen 1:1 verdünnten Probe gemessen. Zur Extraktion der Zellen wurden diese im Verhältnis 1:10 (w/v) mit Amylaseextraktionspuffer versetzt, aufgeschlämmt und durch einen kurzen Ultraschallpuls (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 5 s, 50 % Leistung) homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann fünf Minuten bei 13000 g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R) und auf Eis aufbewahrt. Von diesem Homogenisat wurde jeweils ein Teil mit fünf Teilen Amylaseextraktionspuffer versetzt und ebenfalls die Aktivität in 30 μl einer so aufbereiteten Probe gemessen. Die α -Amylaseaktivität wurde mit Hilfe des „Cereal α -amylase assay“ (Megazyme, Australien) bestimmt. Dabei wurden jeweils 30 μl Probe in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 30 μl Substratlösung (54,5 mg geblocktes p-Nitrophenylmaltoheptaosid [BPNPG7]; 100 U Glucoamylase bei pH 5,2; 100 U α -Glucosidase bei pH 5,2 in 10 ml

aqua_{bidest.}) versetzt, kurz gemischt und bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zusatz von 150 µl einer 1 %igen Tris-Lösung (in aqua_{bidest.}) gestoppt. Die Extinktion der Proben wurde in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Lesegeräts (Biorad Benchmark Platereader) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

4.12.7 Lysis von Hefen

Zur Lyse der Hefezellen wurde ein Wildtyphefestamm verwendet. Dieser wurde in 2 l YPD-Medium bei 30°C kultiviert, bei einer OD₆₀₀ von max. 4 die Zellen geerntet, das Sediment in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -78°C gelagert. Das Zellsediment wurde bei 37°C aufgetaut und in 25 ml Homogenisationspuffers (20 mM HEPES-KOH, pH 7,0; 50 mM KOAc; 2 mM EDTA; 0,2 M Sorbit) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 25 ml Glassperlen (0,5 mm) in einer Planeten-Monomühle (Pulverisette 6, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) lysiert (Geräteeinstellungen: 4 min bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 500 Upm, 1 min Pause, 2 Wiederholungen). Wie unter 4.12.1 beschrieben wurden nach Abtrennung der Glasperlen P13-, S100- und P100-Fractionen gewonnen.

4.13 Elektronenmikroskopie

4.13.1 Immunnegativkontrastierung

Die Negativkontrastierung erfolgte nach Mayer (Robinson et al., 1985, Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie). Dazu wurde ein ca. 3 mm * 3 mm großes, kohlebedampftes Glimmerplättchen für jeweils 20 s in die Probenlösung, in 1 % (v/v) Glutardialdehyd, in H₂O_{bidest} und in 4 % Uranylacetat in der Weise eingetaucht, dass sich der Kohlefilm von der Trägerfolie ohne vollständige Ablösung abhob und auf der Oberfläche flottierte. Anschließend folgten gleichartige Inkubationsschritte mit Antikörpern gegen AtVps35 oder AtVps26 in Primärverdünnungen von 1:25 bis 1:100 und anschließend in H₂O_{bidest}. Im letzten Schritt - der Uranylacetat-Lösung - wurde das Glimmerplättchen fallengelassen, so dass die Kohlefolie auf der Lösung schwamm und mit einem unbefilmten Kupfergrid aufgenommen werden konnte.

Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgesaugt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem Philips CM10 Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV.

4.13.2 Probenvorbereitung für die Immunelektronenmikroskopie

BY-2 Zellen wurden aus dem Kulturmedium durch Filtration geerntet. Sie wurden anschließend auf dem Filter mit Hexadecen überschichtet, und überschüssiges Hexadecen durch weiteres Filtrieren entfernt. Danach wurden die Zellen in Trägerplättchen überführt und mit einer Hochdruckgefrieranlage (HPM010; Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) gefroren. Die Gefriersubstitution wurde in einer Leica Gefriersubstitutionseinheit (AFS, Leica, Bensheim) ausgeführt, wobei die Zellen in trockenes Aceton, das 0,1 % Uranylacetat enthielt, überführt wurden. Die Substitution begann mit einer dreitägigen Inkubation bei -85°C bevor die Temperatur über einen Zeitraum von 18 Stunden auf -35°C erhöht wurde. Die Zellen wurden dann mit Lowicryl HM20 infiltriert und bei -35°C eingebettet. Das Harz wurde zwei Tage lang bei -35°C und weitere drei Tage bei Raumtemperatur mit UV-Licht polymerisiert. Die anschließend hergestellten Ultradünnschnitte wurden mit Antikörpern gegen AtVps35, AtVps29 oder AtVps26 in Primärverdünnungen von 1:25 bis 1:100 inkubiert, mit Waschpuffer (PBS mit 1 % BSA oder Fischgelatine) gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit goldgekoppelten Sekundärantikörpern (Biocell GAR10) bei einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit entweder 1 % BSA oder Kaltwasserfischgelatine (Sigma-Aldrich). Die Schnitte wurden mit wässrigen Uranylacetat/Bleicitrat-Lösungen nachkontrastiert und in einem Philips CM10 Transmissionselektronenmikroskop (Philips, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV betrachtet.

4.14 Fluoreszenzmikroskopie

4.14.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz an BY-2 Zellen und die Fixierung derselben wurde wie bei Jiang und Rogers (1998) und Tse et al. (2004) beschrieben, in Kooperation mit Liwen Jiang (Chinese University of Hong Kong) durchgeführt.

BY-2 Suspensionskulturzellen (ca. 2 bis 3 Tage nach Subkultivierung) oder wortmanninbehandelte Zellen wurden zuerst mit einer Lösung (50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0; 5 mM EGTA; 0,02 % Natriumazid; 4,5 % Paraformaldehyd) für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Na-Phosphat-EGTA-Puffer wurden die Zellwände der fixierten Zellen mit 1 % Cellulysin (Serva, Heidelberg, Germany) in Na-Phosphat-Puffer während 20 Minuten partiell verdaut, woraufhin die Zellmembranen durch eine zweiminütige Behandlung mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert wurden. Zur Antikörpereinzelmarkierung wurden die fixierten Zellen zunächst 30 Minuten mit Blockpuffer 1 (1*PBS, 1 % BSA) inkubiert, bevor die Primärantikörper zugegeben wurden. Die polyklonalen Primärantikörper wurden dann in Blockpuffer 2 (1*PBS; 0,25 % BSA; 0,25 % Gelatine; 0,05 % NP-40; 0,02 % Na-Azid) angesetzt (4 µg/mL) und die fixierten Zellen bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden dann weiterhin mit Blockpuffer 2 gewaschen, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit rhodamingekoppelten Sekundärantikörpern in einer finalen Verdünnung von 1:100. Schließlich wurden die markierten Zellen zweimal mit Blockpuffer 2 gewaschen und auf Objektträger aufgebracht.

Zur Doppelmarkierung mit zwei polyklonalen Antikörpern wurde zuerst der Primärantikörper (4 µg/ml) bei 4°C über Nacht inkubiert mit anschließendem Waschen mit PBS-T (PBS mit 0,05 % (v/v) Tween20). Rhodamingekoppelte Fab-Fragmente wurden dann zugegeben und bei Raumtemperatur für vier Stunden inkubiert vor einem zweiten Waschschrift, gefolgt von einer Nachfixierung und weiterem Waschen vor Zugabe des zweiten Primärantikörpers (4 µg/ml). Die rhodamingekoppelten Fab-Fragment-Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:20 verwendet, während FITC- und Cy-5-gekoppelte Sekundärantikörper 1:100 verdünnt wurden. Die Kontrollen wurden ohne zweiten Primärantikörper durchgeführt.

Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden dabei mit einem Bio-Rad Radiance 2100 System (Maylands Avenue, Hemel Hempstead, UK) mit einem 60*Ölobjektiv (Nikon, Tokyo) unter Verwendung der Steuerungssoftware Laser Sharp 2000 aufgenommen.

Weil die Primärantikörper mit rhodamingekoppelten Sekundärantikörpern oder Fab-Fragmenten detektiert wurden, während die beiden GFP/YFP-Marker schon von sich aus mit einer FITC-Einstellung unter dem Konfokalmikroskop detektierbar waren, wurde eine FITC/Rhodamin-Scanningmethode (Simultanes oder sequentielles Scannen) verwendet, um duale Bilder zu erhalten. Es wurde insbesondere darauf geachtet sicherzustellen, dass die Laserleistung und andere Parameter (Pinhole und Detektorempfindlichkeit) so eingestellt waren, dass kein Signalübertrag (crossover signal) zwischen der Rhodamin- und der FITC-Emission gemessen werden konnte. Die Filtereinstellungen waren wie folgt: Zur Detektion von YFP: Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionsfilter HQ515/30; zur Detektion von Rhodamin: Anregungswellenlänge 543 nm, Emissionsfilter HQ600/50. Die YFP/GFP-Signale wurden in grün pseudogefärbt und die Rhodaminsignale in rot. Die Aufnahmen wurden außerdem mit Adobe Photoshop Software (San Jose, CA, USA) weiterverarbeitet wie bei Jiang und Rogers (1998) beschrieben. Der Anteil der Kolo-kalisation wurde wie in der Literatur beschrieben errechnet (Jiang und Rogers, 1998; Li et al., 2002; Tse et al., 2004).

4.14.2 Fluoreszenzmikroskopie an transformierten Protoplasten

Protoplasten wurden 24 Stunden nach der Transformation (siehe 4.12.6.1) mit den unterschiedlichen Fluoreszenzkonstrukten geerntet (siehe 4.12.6.2), dabei in TEX-Puffer gewaschen und auf eine Dichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml konzentriert, um eine ausreichende Zelldichte zur Identifikation von Transformanten zu erreichen. Den Protoplasten wurde keine NaCl-Lösung zugesetzt, sondern sie wurden im flotierenden Zustand vorsichtig auf den Objektträger pipettiert. Objektträger wurden mit 150 µm-Folie beklebt in die mit dem Skalpell ein 0,5 cm * 1 cm großer Ausschnitt geschnitten wurde, um die empfindlichen Protoplasten zwischen Deckglas (22mm*50mm) und Objektträger zu beherbergen. 100µl-Aliquots der Protoplastensuspension wurden in diesen Ausschnitt pipettiert, mit dem Deckglas bedeckt und die Objektträger gedreht. Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden dabei mit einem inversen Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM 510 META) unter Verwendung eines 40fach Ölimmersionsobjektivs ("EC Plan-Neofluar" 40x/1,30 Oil DIC)

aufgenommen. cGFP-Konstrukte wurden mit einer Wellenlänge von 458 nm, YFP-Konstrukte mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde mit einem 475nm bis 525nm Bandpassfilter für GFP und 560 nm bis 615 nm Bandpassfilter für YFP detektiert. Die Aufnahmen wurden mit LSM 5 Software (Zeiss) prozessiert.

5 Literaturverzeichnis

- Ahmed, S.U., Bar-Peled, M., and Raikhel, N.V.** (1997). Cloning and subcellular location of an Arabidopsis receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol* **114**, 325-336.
- Ahmed, S.U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J.E., Matsuoka, K., and Raikhel, N.V.** (2000). The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in Arabidopsis thaliana. *J Cell Biol* **149**, 1335-1344.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.** (2003). *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim.
- Altschul, S.F., and Lipman, D.J.** (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5509-5513.
- Arighi, C.N., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Haft, C.R., and Bonifacino, J.S.** (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* **165**, 123-133.
- Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.I., Orellana, A., and Dupree, P.** (2001). Identification and characterization of GONST1, a golgi-localized GDP-mannose transporter in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2283-2295.
- Bankaitis, V.A., Johnson, L.M., and Emr, S.D.** (1986). Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9075-9079.
- Banta, L.M., Robinson, J.S., Klionsky, D.J., and Emr, S.D.** (1988). Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol* **107**, 1369-1383.
- Barbero, P., Buell, E., Zulley, S., and Pfeffer, S.R.** (2001). TIP47 is not a component of lipid droplets. *J Biol Chem* **276**, 24348-24351.
- Barlowe, C.** (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**, 371-377.
- Barlowe, C.** (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* **13**, 295-300.
- Bassham, D.C., and Raikhel, N.V.** (2000). Plant cells are not just green yeast. *Plant Physiol* **122**, 999-1001.

- Bassham, D.C., Gal, S., da Silva Conceicao, A., and Raikhel, N.V.** (1995). An Arabidopsis syntaxin homologue isolated by functional complementation of a yeast pep12 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7262-7266.
- Batoko, H., Zheng, H.Q., Hawes, C., and Moore, I.** (2000). A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *Plant Cell* **12**, 2201-2218.
- Becherer, K.A., Rieder, S.E., Emr, S.D., and Jones, E.W.** (1996). Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol Biol Cell* **7**, 579-594.
- Bethke, P.C., and Jones, R.L.** (2000). Vacuoles and prevacuolar compartments. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 469-475.
- Bhat, R.A., Lahaye, T., and Panstruga, R.** (2006). The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**, 12.
- Bonifacino, J.S., and Traub, L.M.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brandizzi, F., Snapp, E.L., Roberts, A.G., Lippincott-Schwartz, J., and Hawes, C.** (2002). Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* **14**, 1293-1309.
- Brandizzi, F., Hanton, S., DaSilva, L.L., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J., and Hawes, C.** (2003). ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J* **34**, 269-281.
- Bright, N.A., Lindsay, M.R., Stewart, A., and Luzio, J.P.** (2001). The relationship between luminal and limiting membranes in swollen late endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation. *Traffic* **2**, 631-642.
- Burda, P., Padilla, S.M., Sarkar, S., and Emr, S.D.** (2002). Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J Cell Sci* **115**, 3889-3900.

- Cao, X., Rogers, S.W., Butler, J., Beevers, L., and Rogers, J.C.** (2000). Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* **12**, 493-506.
- Chrispeels, M.J.** (1991). Sorting of Proteins in The Secretory System. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 21-53.
- Collins, B.M., Skinner, C.F., Watson, P.J., Seaman, M.N., and Owen, D.J.** (2005). Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 594-602.
- Cooper, A.A., and Stevens, T.H.** (1996). Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J Cell Biol* **133**, 529-541.
- Costaguta, G., Stefan, C.J., Bensen, E.S., Emr, S.D., and Payne, G.S.** (2001). Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol Biol Cell* **12**, 1885-1896.
- Cozier, G.E., Carlton, J., McGregor, A.H., Gleeson, P.A., Teasdale, R.D., Mellor, H., and Cullen, P.J.** (2002). The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem* **277**, 48730-48736.
- da Silva Conceicao, A., Marty-Mazars, D., Bassham, D.C., Sanderfoot, A.A., Marty, F., and Raikhel, N.V.** (1997). The syntaxin homolog AtPEP12p resides on a late post-Golgi compartment in plants. *Plant Cell* **9**, 571-582.
- Dacks, J.B., Davis, L.A., Sjogren, A.M., Andersson, J.O., Roger, A.J., and Doolittle, W.F.** (2003). Evidence for Golgi bodies in proposed 'Golgi-lacking' lineages. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **270 Suppl 2**, S168-171.
- Damen, E., Krieger, E., Nielsen, J.E., Eygensteyn, J., and van Leeuwen, J.E.** (2006). The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide. *Biochem J* **398**, 399-409.
- daSilva, L.L., Foresti, O., and Denecke, J.** (2006). Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail. *Plant Cell* **18**, 1477-1497.
- 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.

- Davidson, H.W.** (1995). Wortmannin causes mistargeting of procathepsin D. evidence for the involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase in vesicular transport to lysosomes. *J Cell Biol* **130**, 797-805.
- Deloche, O., Yeung, B.G., Payne, G.S., and Schekman, R.** (2001). Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* **12**, 475-485.
- Dennes, A., Madsen, P., Nielsen, M.S., Petersen, C.M., and Pohlmann, R.** (2002). The yeast Vps10p cytoplasmic tail mediates lysosomal sorting in mammalian cells and interacts with human GGAs. *J Biol Chem* **277**, 12288-12293.
- Dhugga, K.S., Tiwari, S.C., and Ray, P.M.** (1997). A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7679-7684.
- Diaz, E., and Pfeffer, S.R.** (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* **93**, 433-443.
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H.J., and Kornfeld, S.** (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* **297**, 1700-1703.
- Drewes, G., and Bouwmeester, T.** (2003). Global approaches to protein-protein interactions. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 199-205.
- Felsenstein, J.** (1988). Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* **22**, 521-565.
- Fichmann, J., Taiz, L., Gallagher, S., Leonard, R.T., Depta, H., and Robinson, D.G.** (1989). Immunological comparison of the coated vesicle H⁺-ATPases of plants and animals. *Protoplasma* **V153**, 117.
- Geelen, D., Leyman, B., Batoko, H., Di Sansebastiano, G.P., Moore, I., and Blatt, M.R.** (2002). The abscisic acid-related SNARE homolog NtSyr1 contributes to secretion and growth: evidence from competition with its cytosolic domain. *Plant Cell* **14**, 387-406.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., and Jürgens, G.** (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., and Kornfeld, S.** (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 202-212.

- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G., and Stenmark, H.** (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J* **19**, 4577-4588.
- Glynou, K., Ioannou, P.C., and Christopoulos, T.K.** (2003). One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **27**, 384-390.
- Gomord, V., and Faye, L.** (1996). Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. *Plant Physiol Biochem* **34**, 165-181.
- Griffiths, G., Matteoni, R., Back, R., and Hoflack, B.** (1990). Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells. *J Cell Sci* **95 (Pt 3)**, 441-461.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H.** (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-323.
- Gullapalli, A., Garrett, T.A., Paing, M.M., Griffin, C.T., Yang, Y., and Trejo, J.** (2004). A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. *Mol Biol Cell* **15**, 2143-2155.
- Hadlington, J.L., and Denecke, J.** (2000). Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 461-468.
- Haft, C.R., de la Luz Sierra, M., Bafford, R., Lesniak, M.A., Barr, V.A., and Taylor, S.I.** (2000). Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell* **11**, 4105-4116.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- 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.
- Harlow, E., and Lane, D.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

- Hassan, A.J., Zeng, J., Ni, X., and Morales, C.R.** (2004). The trafficking of prosaposin (SGP-1) and GM2AP to the lysosomes of TM4 Sertoli cells is mediated by sortilin and monomeric adaptor proteins. *Mol Reprod Dev* **68**, 476-483.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Hetteima, E.H., Lewis, M.J., Black, M.W., and Pelham, H.R.** (2003). Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *Embo J* **22**, 548-557.
- Hickenbottom, S.J., Kimmel, A.R., Londos, C., and Hurley, J.H.** (2004). Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP47. *Structure* **12**, 1199-1207.
- 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.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.
- Hohl, I., Robinson, D.G., Chrispeels, M.J., and Hinz, G.** (1996). Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J Cell Sci* **109 (Pt 10)**, 2539-2550.
- Holstein, S.E.** (2002). Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* **3**, 614-620.
- Holstein, S.E., Drucker, M., and Robinson, D.G.** (1994). Identification of a beta-type adaptin in plant clathrin-coated vesicles. *J Cell Sci* **107 (Pt 4)**, 945-953.
- Horazdovsky, B.F., Davies, B.A., Seaman, M.N., McLaughlin, S.A., Yoon, S., and Emr, S.D.** (1997). A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol Biol Cell* **8**, 1529-1541.
- 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., and Emr, S.D.** (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277-298.

- Jiang, L., and Rogers, J.C.** (1998). Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J Cell Biol* **143**, 1183-1199.
- Jiang, L., and Rogers, J.C.** (1999). Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. *Plant J* **18**, 23-32.
- Jiang, L., and Rogers, J.C.** (2003). Sorting of lytic enzymes in the plant Golgi apparatus. *Annu Plant Rev* **9**, 114-140.
- Jiang, L., Phillips, T.E., Hamm, C.A., Drozdowicz, Y.M., Rea, P.A., Maeshima, M., Rogers, S.W., and Rogers, J.C.** (2001). The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *J Cell Biol* **155**, 991-1002.
- Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C., and Neefjes, J.** (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* **6**, 1070-1077.
- Jürgens, G.** (2004). Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 481-504.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D.** (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Kazan, K.** (2003). Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci* **8**, 468-471.
- Kim, D.H., Eu, Y.J., Yoo, C.M., Kim, Y.W., Pih, K.T., Jin, J.B., Kim, S.J., Stenmark, H., and Hwang, I.** (2001). Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell* **13**, 287-301.
- Kirchhausen, T.** (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 187-198.
- Kirsch, T., Saalbach, G., Raikhel, N.V., and Beevers, L.** (1996). Interaction of a potential vacuolar targeting receptor with amino- and carboxyl-terminal targeting determinants. *Plant Physiol* **111**, 469-474.
- 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 U S A* **91**, 3403-3407.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K.S., de Moerloose, P., Parton, R.G., and Gruenberg, J.** (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-197.

- Kurten, R.C., Eddington, A.D., Chowdhury, P., Smith, R.D., Davidson, A.D., and Shank, B.B.** (2001). Self-assembly and binding of a sorting nexin to sorting endosomes. *J Cell Sci* **114**, 1743-1756.
- Lämmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, S.K., Tse, Y.C., Jiang, L., Oliviusson, P., Heinzerling, O., and Robinson, D.R.** (2005). Plant prevacuolar compartments and endocytosis. In "Plant Endocytosis" Samaj, J., Baluska, F. and Menzel, D. (eds). *Plant Cell Monographs* **1**, 37-61.
- Leborgne-Castel, N., Jelitto-Van Dooren, E.P., Crofts, A.J., and Denecke, J.** (1999). Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* **11**, 459-470.
- Lemmon, S.K., and Traub, L.M.** (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 457-466.
- Lewis, M.J., Nichols, B.J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., and Pelham, H.R.** (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**, 23-38.
- Li, Y.B., Rogers, S.W., Tse, Y.C., Lo, S.W., Sun, S.S., Jauh, G.Y., and Jiang, L.** (2002). BP-80 and homologs are concentrated on post-Golgi, probable lytic prevacuolar compartments. *Plant Cell Physiol* **43**, 726-742.
- Liebecq, C.** (1992). *Biochemical Nomenclature and Related Documents - A Compendium*, Second edition. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Portland Press, London and Chapel Hill.
- Lutzmann, M., Kunze, R., Buerer, A., Aebi, U., and Hurt, E.** (2002). Modular self-assembly of a Y-shaped multiprotein complex from seven nucleoporins. *Embo J* **21**, 387-397.
- Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., and Piper, R.C.** (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* **113 (Pt 9)**, 1515-1524.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J.C., and Rothman, J.E.** (1989). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* **58**, 329-336.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B., and Johannes, L.** (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* **143**, 973-990.

- Mallet, W.G., and Maxfield, F.R.** (1999). Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J Cell Biol* **146**, 345-359.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D.** (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**, 579-586.
- Matsuoka, K., and Neuhaus, J.M.** (1999). Cis-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* **50**, 165-174.
- Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N.V., and Nakamura, K.** (1995). Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**, 1307-1318.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E.** (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121-132.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., and Schu, P.** (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J* **19**, 2193-2203.
- Mo, B., Tse, Y.C., and Jiang, L.** (2003). Organelle identification and proteomics in plant cells. *Trends Biotechnol* **21**, 331-332.
- Modrek, B., and Lee, C.** (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* **30**, 13-19.
- Movafeghi, A., Happel, N., Pimpl, P., Tai, G.H., and Robinson, D.G.** (1999). Arabidopsis Sec21p and Sec23p homologs. Probable coat proteins of plant COP-coated vesicles. *Plant Physiol* **119**, 1437-1446.
- Myers, E.W., and Miller, W.** (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* **4**, 11-17.
- Neuhaus, J.M., and Rogers, J.C.** (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* **38**, 127-144.
- Nothwehr, S.F., Roberts, C.J., and Stevens, T.H.** (1993). Membrane protein retention in the yeast Golgi apparatus: dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J Cell Biol* **121**, 1197-1209.
- Nothwehr, S.F., Bruinsma, P., and Strawn, L.A.** (1999). Distinct domains within Vps35p mediate the retrieval of two different cargo proteins from the yeast prevacuolar/endosomal compartment. *Mol Biol Cell* **10**, 875-890.

- Nothwehr, S.F., Ha, S.A., and Bruinsma, P.** (2000). Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol* **151**, 297-310.
- Paravicini, G., Horazdovsky, B.F., and Emr, S.D.** (1992). Alternative pathways for the sorting of soluble vacuolar proteins in yeast: a vps35 null mutant missorts and secretes only a subset of vacuolar hydrolases. *Mol Biol Cell* **3**, 415-427.
- Paris, N., and Neuhaus, J.M.** (2002). BP-80 as a vacuolar sorting receptor. *Plant Mol Biol* **50**, 903-914.
- 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.
- Paris, N., Rogers, S.W., Jiang, L., Kirsch, T., Beevers, L., Phillips, T.E., and Rogers, J.C.** (1997). Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol* **115**, 29-39.
- Park, K.Y., Jung, J.Y., Park, J., Hwang, J.U., Kim, Y.W., Hwang, I., and Lee, Y.** (2003). A role for phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiol* **132**, 92-98.
- Parton, R.G., Schrotz, P., Bucci, C., and Gruenberg, J.** (1992). Plasticity of early endosomes. *J Cell Sci* **103 (Pt 2)**, 335-348.
- Pelham, H.R.** (1995). Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 530-535.
- Pelham, H.R.** (1999). SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp Cell Res* **247**, 1-8.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R., and McMahon, H.T.** (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-499.
- Pfeffer, S.R.** (2001). Membrane transport: retromer to the rescue. *Curr Biol* **11**, R109-111.
- 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 efficient and COPII dependent. *Plant Cell* **13**, 2005-2020.

- Phizicky, E.M., and Fields, S.** (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**, 94-123.
- Pimpl, P., and Denecke, J.** (2002). Protein-protein interactions in the secretory pathway, a growing demand for experimental approaches in vivo. *Plant Mol Biol* **50**, 887-902.
- 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.
- Pimpl, P., Movafeghi, A., Coughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S., and Robinson, D.G.** (2000). In situ localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles. *Plant Cell* **12**, 2219-2236.
- Raiborg, C., Rusten, T.E., and Stenmark, H.** (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 446-455.
- Rapoport, T.A., Rolls, M.M., and Jungnickel, B.** (1996). Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 499-504.
- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., and Marks, M.S.** (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* **152**, 809-824.
- 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.
- Reaves, B.J., Bright, N.A., Mullock, B.M., and Luzio, J.P.** (1996). The effect of wortmannin on the localisation of lysosomal type I integral membrane glycoproteins suggests a role for phosphoinositide 3-kinase activity in regulating membrane traffic late in the endocytic pathway. *J Cell Sci* **109** (Pt 4), 749-762.
- Record, R.D., and Griffing, L.R.** (1988). Convergence of the endocytic and lysosomal pathways in soybean protoplasts. *Planta* **V176**, 425-432.
- Reddy, J.V., and Seaman, M.N.** (2001). Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Mol Biol Cell* **12**, 3242-3256.
- Reggiori, F., Black, M.W., and Pelham, H.R.** (2000). Polar transmembrane domains target proteins to the interior of the yeast vacuole. *Mol Biol Cell* **11**, 3737-3749.

- Ritzenthaler, C., Nebenfuhr, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, 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.
- Robenek, H., Lorkowski, S., Schnoor, M., and Troyer, D.** (2005). Spatial integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies. *J Biol Chem* **280**, 5789-5794.
- Robinson, D.G., Hinz, G., and Holstein, S.E.** (1998). The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol Biol* **38**, 49-76.
- Robinson, D.G., Rogers, J.C., and Hinz, G.** (2000). Post-Golgi, prevacuolar compartments. *Annu Plant Rev* **5**, 270-298.
- 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., Ehlers, U., Herken, R., Hermann, B., Mayer, F., and Schürmann, F.-W.** (1985). *Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Rojo, E., Zouhar, J., Kovaleva, V., Hong, S., and Raikhel, N.V.** (2003). The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in arabidopsis. *Mol Biol Cell* **14**, 361-369.
- Rothman, J.H., and Stevens, T.H.** (1986). Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* **47**, 1041-1051.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanderfoot, A.A., and Raikhel, N.V.** (1999). The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* **11**, 629-642.
- Sanderfoot, A.A., Assaad, F.F., and Raikhel, N.V.** (2000). The Arabidopsis genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol* **124**, 1558-1569.

- Sanderfoot, A.A., Ahmed, S.U., Marty-Mazars, D., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Marty, F., and Raikhel, N.V.** (1998). A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in Arabidopsis roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9920-9925.
- Sato, T.K., Overduin, M., and Emr, S.D.** (2001). Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* **294**, 1881-1885.
- Seaman, M.N.** (2004). Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* **165**, 111-122.
- Seaman, M.N.** (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* **15**, 68-75.
- Seaman, M.N., and Williams, H.P.** (2002). Identification of the functional domains of yeast sorting nexins Vps5p and Vps17p. *Mol Biol Cell* **13**, 2826-2840.
- Seaman, M.N., McCaffery, J.M., and Emr, S.D.** (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol* **142**, 665-681.
- Seaman, M.N., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L., and Emr, S.D.** (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J Cell Biol* **137**, 79-92.
- Segui-Simarro, J.M., and Staehelin, L.A.** (2006). Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of Arabidopsis thaliana: a quantitative and spatial analysis. *Planta* **223**, 223-236.
- Shimada, T., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (1997). A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol* **38**, 1414-1420.
- Shimada, T., Koumoto, Y., Li, L., Yamazaki, M., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2006). AtVPS29, a Putative Component of a Retromer Complex, is Required for the Efficient Sorting of Seed Storage Proteins. *Plant Cell Physiol* **47**, 1187-1194.
- Smith, R.F., Wiese, B.A., Wojzynski, M.K., Davison, D.B., and Worley, K.C.** (1996). BCM Search Launcher--an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res* **6**, 454-462.

- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.
- Stack, J.H., and Emr, S.D.** (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J Biol Chem* **269**, 31552-31562.
- Sztul, E., and Lupashin, V.** (2006). Role of tethering factors in secretory membrane traffic. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C11-26.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- 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.
- van Dam, E.M., and Stoorvogel, W.** (2002). Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* **13**, 169-182.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panayotou, G., and Waterfield, M.D.** (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* **22**, 267-272.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E.** (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**, 1191-1208.
- Wang, D., Guo, M., Liang, Z., Fan, J., Zhu, Z., Zang, J., Zhu, Z., Li, X., Teng, M., Niu, L., Dong, Y., and Liu, P.** (2005). Crystal structure of human vacuolar protein sorting protein 29 reveals a phosphodiesterase/nuclease-like fold and two protein-protein interaction sites. *J Biol Chem* **280**, 22962-22967.
- Watanabe, E., Shimada, T., Tamura, K., Matsushima, R., Koumoto, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2004). An ER-localized form of PV72, a seed-specific vacuolar sorting receptor, interferes the transport of an NPIR-containing proteinase in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* **45**, 9-17.

- Wee, E.G., Sherrier, D.J., Prime, T.A., and Dupree, P.** (1998). Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* **10**, 1759-1768.
- Wessel, D., and Flügge, U.I.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**, 141-143.
- Westphal, V., Marcusson, E.G., Winther, J.R., Emr, S.D., and van den Hazel, H.B.** (1996). Multiple pathways for vacuolar sorting of yeast proteinase A. *J Biol Chem* **271**, 11865-11870.
- Wurmser, A.E., and Emr, S.D.** (1998). Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities. *Embo J* **17**, 4930-4942.
- Yang, Y.D., Elamawi, R., Bubeck, J., Pepperkok, R., Ritzenthaler, C., and Robinson, D.G.** (2005). Dynamics of COPII vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites. *Plant Cell* **17**, 1513-1531.
- Yeung, B.G., Phan, H.L., and Payne, G.S.** (1999). Adaptor complex-independent clathrin function in yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 3643-3659.
- Yu, J.W., and Lemmon, M.A.** (2001). All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem* **276**, 44179-44184.
- Zhong, Q., Lazar, C.S., Tronchere, H., Sato, T., Meerloo, T., Yeo, M., Songyang, Z., Emr, S.D., and Gill, G.N.** (2002). Endosomal localization and function of sorting nexin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6767-6772.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Drei-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die benutzten Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (Liebecq, 1992). Weitere bekannte Abkürzungen entstammen dem allgemeinen Sprachgebrauch.

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BFA	Brefeldin A
BiP	immunoglobulin binding protein
bp	Basenpaare
BP-80	Bindungsprotein von 80 kDa
BSA	Rinderserumalbumin
CCV	Clathrin-coated Vesikel
cDNA	komplementäre DNA
CFP	cyan fluorescent protein
CI-MPR	Kationunabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
Col-0	Ökotyp Columbia 0
COP	coat protein
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholat
DTT	1-4-Dithiothreitol
DV	dense vesicle
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
E64	trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanido)-Butan
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N,N-tetraessigsäure
ELP	epidermal growth factor like protein
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
et al.	et alteri
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung
GA	Golgi-Apparat
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austausch Faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	green fluorescent protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hsc	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani

LR-White	London Resin White
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MVB	Multivesikulärer Körper (multivesicular body)
NLS	nukleäre Lokalisations-Sequenz (nuclear localization sequence)
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
Nt	Nicotiana tabacum
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster, open reading frame
p.a.	pro analysi
PAC-Vesikel	precursor-accumulating vesicle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
PM-ATPase	Plasmamembran-H ⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSV	Proteinspeichervakuole
PVC	Prävakuoläres Kompartiment (prevacuolar compartment)
RGP	reversibel glycosyliertes Polypeptid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	interference RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNAP	soluble NSF attachment protein

SRP	signal recognition particle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TEV	tobacco etch virus – (Protease)
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	transmembrane domain
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
t-SNARE	target SNAP-receptor
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
ü.N.	über Nacht
v-SNARE	vesicle SNAP-receptor
w/w	weight per weight (Gewicht pro Gewicht)
YFP	yellow fluorescent protein

6.2 Sequenzen

6.2.1 AtVps26 (At5g53530)

1: ATGAATTATCTTCTTGGAGCTTTCAAGCCAGCATGTAATATTTCAATCACA
1: M N Y L L G A F K P A C N I S I T

52: TTTACTGATGGGAAAAACCGTAAACAGGTACCCACTAAGAAAGATAATGGA
18: F T D G K N R K Q V P T K K D N G

103: CAAATAGTTATGAATCCACTTTTCCAGAGTCAAGAACTATTGCTGGGAAG
35: Q I V M N P L F Q S Q E T I A G K

154: ATTAACATTGAACCATATCAAGGGAAAAAGTGGAGCATAATGGTGTAAAA
52: I N I E P Y Q G K K V E H N G V K

205: GTTGAGCTTCTTGGTCAAATAGAAATGTACTTTGACAGAGGAACTTTTAT
69: V E L L G Q I E M Y F D R G N F Y

256: GACTTCACTTCTTGGTGCCTGAGATTGATGTACCTGGAGAAATATATGAA
86: D F T S L V R E I D V P G E I Y E

307: AGAAAGACATACCCTTTTGAATTTTCGAGCGTTGAGATGCCATATGAGACA
103: R K T Y P F E F S S V E M P Y E T

358: TACAATGGCGTGAACGTGCGCCTAAGGTATGTCCTCAAAGTAACAGTCACA
120: Y N G V N V R L R Y V L K V T V T

409: CGTGGTTATGCTGGAAGCATCGTGAATACCAGGACTTTGTGGTCCGTAAC
137: R G Y A G S I V E Y Q D F V V R N

460: TATGTTCCGCTTCTCCAATCAATAATAGCATTAAGATGGAAGTTGGAATC
154: Y V P L P P I N N S I K M E V G I

511: GAGGACTGTCTGCATATCGAGTTTGTGAGTACAATAAAAGCAAGTATCACCTA
171: E D C L H I E F E Y N K S K Y H L

562: AAAGATGTTATCCTTGGGAAAATATACTTTCTTCTGGTGAGAATCAAGATA

188: K D V I L G K I Y F L L V R I K I

613: AAGAATATGGATCTTGAGATAAGACGGCGAGAATCAACTGGAGCAGGAGCT

205: K N M D L E I R R R E S T G A G A

664: AATACTCACGTCGAAACAGAAACACTAGCCAAATTTGAGTTAATGGATGGT

222: N T H V E T E T L A K F E L M D G

715: GCTCCAGTTAGAGGCGAATCGATACCTGTAAGAGTGTTCTTGACACCATAC

239: A P V R G E S I P V R V F L T P Y

766: GATCTGACACCAACGCATAAGAACATAAACAACAAATTCAGCGTAAAGTAT

256: D L T P T H K N I N N K F S V K Y

817: TATCTAAATCTTGTGCTGGTGGATGAAGAGGATCGCCGTTACTTCAAGCAG

273: Y L N L V L V D E E D R R Y F K Q

868: CAAGAAATCACGTTGTACAGGCTCAAGGAAGAGACATCTTGA

290: Q E I T L Y R L K E E T S *

6.2.2 AtVps26 – Mutationen

Wildtyp

409: CGTGGTTATGCTGGAAGCATCGTGGAATACCAGGACTTTGTGGTCCGTAAC

137: R G Y A G S **I V** E Y Q D F V V R N

I > A Mutante:

409: CGTGGTTATGCTGGAAGCCGCCGTGGAATACCAGGACTTTGTGGTCCGTAAC

137: R G Y A G S **A V** E Y Q D F V V R N

V > P Mutante:

409: CGTGGTTATGCTGGAAGCATCCCGGAATACCAGGACTTTGTGGTCCGTAAC

137: R G Y A G S **I P** E Y Q D F V V R N

IV > AP Mutante:

409: CGTGGTTATGCTGGAAGCCCCCGAATACCAGGACTTTGTGGTCCGTAAC

137: R G Y A G S **A P** E Y Q D F V V R N

6.2.3 AtVps26 – alternatives Splicing

Genomische Sequenz (Großbuchstaben: Exons, kleinbuchstaben: Introns)

ATGgtaagtg ttggtttcaa caaaatttct cttatttgct tagtgctggt gtttctgtaa
 ttgttactaa agtttataacc ttttttgggg attaatatca cag**AATTATC TTCTTGGAGC**
TTTCAAGCCA GCATGTAATA TTTCAATCAC ATTTACTGAT GGGAAAAACC GTAAACAGgt
 acacatcgct ctttacgttt atcttacgga ttaattgttc cggacttta gggatataggt
 tttcttatcg tatctacttg gtctctgttg cgttag**GTAC CCACTAAGAA ACATAATCCA**
CAAATAGTTA TCAATCCACT TTTCCAGAGT CAAGAACTA TTCCTGGGAA Ggtacttgggt
 tttgttgta tctctagtta tcaggagctt tatggaattg cttttatagg agtgtttttt
 ttcgtaattt gtctctctca g**ATTAACATT GAACCATATC AAGGGAAAAA AGTGGAGCAT**
AATGGTGTAA AAGTTGAGCT TCTTGGTCAA ATAGgtctgc aaatactgtg aattatgtcg

1: **ATG****AATTATCTTCTTGGAGCTTTCAAGCCAGCATGTAATATTTCAATCACA**

1: M N Y L L G A F K P A C N I S I T

52: **TTTACTGATGGGAAAAACCGTAAACAG****GTACCCACTAACAACATAATCCA**

18: F T D G K N R K Q ~~V P T K K D N G~~

103: **CAAATAGTTATCAATCCACTTTTCCAGAGTCAAGAACTATTCCTGGCAAG**

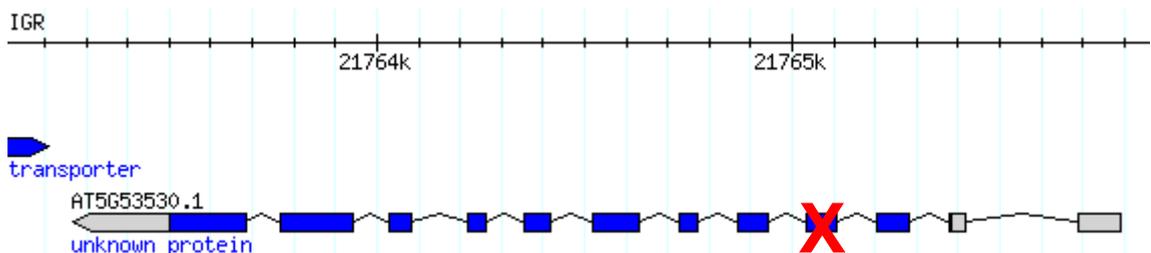
35: ~~Q I V M N P L F Q S Q E T I A G K~~

154: **ATTAACATTGAACCATATCAAGGGAAAAAAGTGGAGCATAATGGTGTAAAA**

52: I N I E P Y Q G K K V E H N G V K

205: **GTTGAGCTTCTTGGTCAAATAG**AAATGTACTTTGACAGAGGAACTTTTAT

69: V E L L G Q I E M Y F D R G N F Y



In der alternativ gesplittenen Form entfällt ein komplettes Exon (Exon 3), in der Sequenz in gelb und durchgestrichen. Die einzelnen Exons haben folgende Kennzahlen: Exon 1 (Start: 1, Stop: 3, Länge 3), Exon 2 (104, 178, 75), Exon 3 (277, 351, 75), Exon 4 (442, 514, 73), Exon 5 (612, 656, 45), Exon 6 (754, 865, 112), Exon 7 (964, 1030, 67), Exon 8 (1120, 1164, 45), Exon 9 (1299, 1354, 56), Exon 10 (1442, 1617, 176), Exon 11 (1701, 1882, 182).