

Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften



**SNARE-Interaktionen im frühen
sekretorischen System
der Pflanzenzelle**

Julia Bubeck

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Biologin Julia Bubeck
aus Weinstadt

Tag der mündlichen Prüfung:

**SNARE-Interaktionen im frühen
sekretorischen System
der Pflanzenzelle**

Gutachter: Prof. Dr. David G. Robinson
Prof. Dr. Karin Schumacher

Teile dieser Arbeit sind eingereicht:

Bubeck, J., Scheuring, D., Hummel, E., Langhans, M., Viotti, C., Foresti, O., Denecke, J., Banfield, D., Robinson, D.G. (2008). The Golgi and ER syntaxins SYP31 and SYP81 control anterograde and retrograde transport through the early secretory pathway. *Traffic*

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. D. G. Robinson für die Möglichkeit zur Erarbeitung dieser Dissertation bedanken. Dabei danke ich ihm besonders für die wissenschaftliche Betreuung, für seine stete Bereitschaft zur Diskussion und für die ermöglichten wissenschaftlichen Denk- und Freiräume. Ebenso bedanke ich mich dafür, dass er mir die Aufenthalte im Labor von Prof. Dr. Jürgen Denecke in Leeds ermöglichte.

Bei Frau Prof. Dr. K. Schumacher möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates und die Unterstützung im letzten Jahr bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Denecke für die Vermittlung der quantitativen Arbeiten im Rahmen des Tabak-Protoplasten-Systems und der stets anregenden wissenschaftlichen Diskussionen während meiner Aufenthalte in seinem Labor (Universität Leeds). Ebenfalls danke ich Dr. Luis daSilva, Dr. Ombretta Foresti und Dr. Chris Snowden für die Hilfe und die kollegiale Aufnahme in Leeds.

Für die Einweisung in die Transformation von BY-2 Zellen, sowie die Hilfe bei der Auswertung danke ich Herrn Dr. Christophe Ritzenthaler (Universität Strasbourg).

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die dazu beigetragen hat, dass ich mich in der Arbeitsgruppe stets wohlfühlt habe: Meike Barth, Oliver Heinzerling, Eva Besemfelder, Peter Oliviusson, Steffi Gold, Andrea Olbrich, Yaodong Yang, Goretti Virgili Lopez, Barbara Jesenovskiy, Christina Larenz, Silke Niemes, David Scheuring und Corrado Viotti.

Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Markus Langhans, für seine unendliche Geduld und Unterstützung, sowie die Einführung in die Welt des CLSM. Außerdem möchte ich Dr. Giselbert Hinz, Dr. Stefan Hillmer und Dr. Peter Pimpl für viele wertvolle Diskussionen und Hilfestellungen während meiner Arbeit danken.

Ganz herzlich möchte ich meiner Mutter danken. Sie unterstützte mich in allen Situationen meines Werdegangs und ich konnte immer auf ihre Hilfe zählen. Sie ist die Stütze unserer Familie und dafür danke ich ihr von Herzen.

Auch dem Rest meiner Familie möchte ich in jeglicher Hinsicht danken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich, freuten und ermunterten mich, auch wenn es nicht immer einfach war.

Ein großes „Dankeschön“ gilt jedoch meinem Freund Uli Pampel, der mich während dieser Zeit mit viel Geduld begleitet und unterstützt hat und mich auch immer wieder daran erinnert hat, dass es auch ein Leben außerhalb des Labors zu genießen gilt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE ORGANISATION DES ENDOMEMBRANSYSTEMS DER PFLANZEN	1
1.1.1. Das Endoplasmatische Retikulum	2
1.1.2. Der Golgi-Apparat	4
1.1.3. Proteinsortierung am Golgi-Apparat	5
1.2. PRINZIPIEN DES VESIKEL-VERMITTELTEN TRANSPORTS DES ENDOMEMBRANSYSTEMS	7
1.2.1. COPI-Vesikel	8
1.2.2. COPII-Vesikel	9
1.3. DIE SNARE-VERMITTELTE FUSION	11
1.3.1. Struktur und Klassifizierung der SNARE-Proteine	11
1.3.2. Der Mechanismus der SNARE-vermittelten Fusion	14
1.3.3. Die Regulation der SNARE-Proteine und deren Sortierung	16
1.3.4. Die SNARE-Proteine des frühen sekretorischen Transportweg	17
1.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	19
2. ERGEBNISSE	20
2.1. IDENTIFIZIERUNG VON SNARES DES FRÜHEN SEKRETORISCHEN WEGS AUS <i>L. ESCULENTUM</i> (TOMATE)	20
2.2. EINFLUSS DER ER-GOLGI-SNARE-PROTEINE AUF DEN FRÜHEN SEKRETORISCHEN WEG <i>IN VIVO</i>	24
2.2.1. Klonieren der ER-Golgi-SNAREs und deren Derivate für Expressionsstudien <i>in vivo</i>	24
2.3. DIE ÜBEREXPRESSION DES V-SNARES LeBET1 HAT KEINEN EFFEKT AUF DEN SEKRETORISCHEN WEG	27
2.3.1. Funktionsnachweis mittels quantitativen Tests (α -Amylase)	27
2.3.2. Lokalisierungsstudien von LeBet1 am CLSM	29
2.3.3. Gewebeabhängigkeit der Expression von LeBet1	33
2.4. DIE ÜBEREXPRESSION DES R-SNARES LeSEC22 ZEIGT KEINEN EFFEKT AUF DEN SEKRETORISCHEN WEG	34
2.4.1. Funktionsnachweis mittels quantitativen Enzymtests	34
2.4.2. Lokalisierungsstudien von LeSec22 am CLSM	37
2.4.3. Gewebeabhängigkeit der Expression von LeSec22	40
2.5. DIE ÜBEREXPRESSION DES „LIGHT CHAIN“ SNARES LeBOS1 ZEIGT EINEN INHIBITORISCHEN EFFEKT AUF DEN SEKRETORISCHEN WEG	41
2.5.1. Funktionsnachweis anhand quantitativer Enzymtests	41

2.5.2.	Das Qb-SNARE LeBos1 ist am Golgi-Apparat lokalisiert	44
2.5.3.	Gewebeabhängigkeit der Expression von LeBos1	45
2.6.	DIE ÜBEREXPRESSION DES SYNTAXINS LESED5 ZEIGT EINEN STARKEN INHIBITORISCHEN EFFEKT AUF DEN SEKRETORISCHEN WEG	46
2.6.1.	Funktionsnachweis mittels quantitativem Enzymtest.....	47
2.6.1.1.	Funktion der einzelnen Domänen.....	47
2.6.1.2.	Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von LeSed5	51
2.6.1.3.	Einfluss des Wildtyp-Proteins LeSed5 auf den gekoppelten ER-Golgi Transport.....	53
2.6.2.	Lokalisierungsstudien der LeSed5 Derivate.....	56
2.6.2.1.	Funktionsnachweis der XFP-LeSed5-Fusionsproteine.....	56
2.6.2.2.	Lokalisierungsstudien des Syntaxins in Tabak-Protoplasten	58
2.6.2.3.	N- und C-terminale XFP-Fusionen des LeSed5 SNARE-Proteins zeigen unterschiedliche Effekte auf die Sekretion	60
2.6.2.4.	Lokalisierungsstudien der C- und N-terminalen XFP-LeSed5-Fusionsproteine....	61
2.6.2.5.	Einfluss von YFP-LeSed5 auf COPI- bzw. COPII- Frachtmoleküle	65
2.6.2.6.	Einfluss von LeSed5 auf die Lokalisation weiterer Syntaxine	69
2.6.2.7.	Gewebeabhängigkeit der Expression von LeSed5	74
2.6.2.8.	Etablierung einer LeSed5-GFP exprimierenden BY-2 Zelllinie	77
2.6.3.	Ultrastrukturelle Aufklärung am EM durch Immunogold-markierung	79
3.	DISKUSSION	82
3.1.	BEDEUTUNG UND FUNKTION DER SNARE-PROTEINE IN PFLANZEN	82
3.2.	IDENTIFIZIERUNG DER ER-GOLGI-SNARES AUS <i>L. ESCULENTUM</i>	83
3.3.	HABEN DIE SNARE-PROTEINE EINE BEDEUTUNG AUF DIE PROTEIN-SEKRETION <i>IN VIVO</i> ?	84
3.3.1.	Bedeutung und Lokalisation des v-SNAREs LeBet1	84
3.3.2.	Welche Bedeutung hat die Redundanz des Longins LeSec22?.....	87
3.3.3.	Bedeutung von LeBos1 für den frühen sekretorischen Weg und dessen Lokalisierung	88
3.3.4.	Charakterisierung des Syntaxins LeSed5	90
3.3.4.1.	Überexpression von LeSed5 beeinflusst den Proteintransport des frühen sekretorischen Wegs	91
3.3.4.2.	Lokalisierung von LeSed5 im frühen sekretorischen Weg.....	93
3.3.4.3.	Einfluss von LeSed5 auf den Transport vakuolärer Proteine	96
3.4.	SNARE-INTERAKTIONEN SIND DIE ESSENTIELLEN KOMPONENTEN IM FRÜHEN SEKRETORISCHEN WEG	97

4. MATERIAL UND METHODEN	99
4.1. CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND ENZYME	99
4.2. BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE.....	99
4.2.1. Bakterienstämme	99
4.2.2. Verwendete Plasmide	100
4.2.3. Desoxyoligonukleotide.....	100
4.3. ANTIKÖRPER.....	102
4.3.1. Primäre Antikörper.....	102
4.3.2. Sekundäre Antikörper.....	102
4.4. COMPUTERANALYSE VON DNA UND PROTEINSEQUENZEN	103
4.5. PFLANZENMATERIAL	103
4.5.1. Kultivierung der Tabakpflanzen im Gewächshaus.....	103
4.5.2. Kultivierung von sterilen Tabakpflanzen <i>in vitro</i>	103
4.5.3. Zellkulturen	104
4.5.3.1. BY-2 Suspensionszellkultur	104
4.6. ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	104
4.6.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	104
4.6.2. Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	105
4.6.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	105
4.6.4. Ligation.....	105
4.6.5. Transformation von Bakterien.....	105
4.6.5.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	105
4.6.5.2. Transformation von <i>E. coli</i>	106
4.6.5.3. Transformation von Agrobakterien	106
4.6.5.4. Anlegen von Langzeitkulturen	107
4.6.6. Isolierung von Plasmid-DNA	107
4.6.6.1. Minipräparation von Plasmid-DNA	107
4.6.6.2. Midipräparation von Plasmid-DNA	107
4.6.6.3. Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	107
4.6.7. DNA-Sequenzierung	108
4.6.8. Plasmidkonstruktionen	108
4.6.8.1. N-terminale HA-Fusionskonstrukte	109
4.6.8.2. Expressionsplasmide der SNAREs.....	111
4.6.8.3. XFP-Fusionskonstrukte	112
4.6.8.4. GST-Fusionskonstrukte.....	113

4.7.	EXPRESSION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN <i>E. COLI</i> ZUR ANTIKÖRPERHERSTELLUNG	114
4.7.1.	Aufreinigung der Fusionsproteine	114
4.7.1.1.	Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose 4B	114
4.7.1.2.	Aufreinigung aus Einschlußkörpern (Inclusionbodies)	115
4.7.1.3.	Dialyse von Proteinlösungen	115
4.7.1.4.	Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen	115
4.7.2.	Herstellung von Antikörpern gegen LeSed5-SNARE	116
4.8.	ALLGEMEINE PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	117
4.8.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung	117
4.8.2.	Fällung von Proteinen	117
4.8.2.1.	TCA-Fällung von Proteinen	117
4.8.2.2.	Chloroform/Methanol-Fällung von Proteinen	117
4.8.2.3.	Ammoniumsulfat-Fällung von Proteinen	117
4.8.3.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	118
4.8.4.	Coomassie-Färbung	119
4.8.5.	Western-Blot-Analyse (Immunoblot)	119
4.8.5.1.	Elektrophoretischer Proteintransfer	119
4.8.5.2.	Proteinfärbung auf Blots	119
4.8.5.3.	Immunnachweis	119
4.9.	TRANSIENTE GENEXPRESSION IN TABAKPROTOPLASTEN	120
4.9.1.	Protoplastengewinnung aus Tabakmesophyll	120
4.9.2.	Transformation der Protoplasten	120
4.9.3.	Ernten der Protoplasten und des Mediums	121
4.10.	TRANSIENTE GENEXPRESSION IN BY-2 SUSPENSIONSKULTURZELLEN	121
4.11.	AGROBAKTERIEN-VERMITTELTE TRANSFORMATION VON TABAKBLÄTTERN ZUR TRANSIENTEN GENEXPRESSION	122
4.12.	AGROBAKTERIEN-VERMITTELTE TRANSFORMATION VON BY-2 ZELLEN ZUR STABILEN GENEXPRESSION	122
4.13.	MESSUNG DER α -AMYLASEAKTIVITÄT	123
4.14.	KONFOKALMIKROSKOPIE	124
4.14.1.	Probenvorbereitung	124
4.14.2.	CLSM	124
4.15.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	126
4.15.1.	Immunmarkierung von BY-2 Zellen für die Elektronenmikroskopie	126

5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	127
6.	ANHANG	152
6.1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	152
6.2.	SEQUENZEN	155
6.2.1.	LeBet1 (AW033981).....	155
6.2.2.	LeSec22 (BG123258).....	155
6.2.3.	LeBos1 (BG130394)	156
6.2.4.	LeSed5 (AW222275).....	157

Zusammenfassung

Eine essentielle Funktion aller eukaryotischen Zellen ist die Kontrolle des Transports von Proteinen und Lipiden innerhalb des Endomembransystems. Die Fusion von Membranen ist eine fundamentale biochemische Reaktion und ein wichtiger Schritt aller vesikulären Transportvorgänge, insbesondere des sekretorischen und des endocytotischen Wegs. Die wesentlichen Schritte des Vesikel-vermittelten Transports sind die Formation von Vesikeln des Donorkompartiments, die Translokation und das „Tethering“ dieser Vesikel zu einem Zielkompartiment und letztendlich das Andocken und die Fusion der Vesikel mit dem Zielkompartiment. Das gegenwärtige Modell der Spezifität der Vesikelfusion besagt, dass diese auf entsprechenden SNARE-Proteinen mit einer genau definierten subzellulären Lokalisation beruht (Söllner et al., 1993; Rothman and Warren, 1994). Seit der ersten Arbeit zu SNARE-Proteinen aus Säugerzellen (Block et al., 1988) gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen weitere strukturelle Bestandteile der SNARE-Komplexe in Hefe und Säugern zu identifizieren und die SNARE-vermittelte Fusion auch funktionell zu charakterisieren (Bennet and Scheller, 1993; Burri and Lithgow, 2004; Hong, 2005; Jahn and Scheller, 2006). Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung und Lokalisierung der SNARE-Proteine LeBet1, LeBos1, LeSec22 und LeSed5 in *Nicotiana tabacum* durch *in vivo* Experimente. Zur Charakterisierung der jeweiligen SNARE-Proteine wurde eine Methode verwendet mit der eine Veränderung der Transportvorgänge im frühen sekretorischen Weg visualisiert werden konnte. Hierbei wurde der Einfluss der verschiedenen SNARE-Proteine auf die Sekretion eines löslichen Reporterproteins (α -Amylase) in Tabak-Protoplasten untersucht und quantifiziert.

Die Überproduktion der beiden SNARE-Proteine LeBet1 und LeSec22 in ihrer Wildtypform und auch als Transmembrandomäne-Deletionsmutanten zeigte keinen Einfluss auf die Sekretion von α -Amylase. Anhand von Lokalisierungsstudien konnte LeBet1 am Golgi-Apparat und LeSec22 sowohl am Golgi-Apparat als auch am ER lokalisiert werden.

Die Überproduktion von LeBos1 zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die α -Amylase-Sekretion, wohingegen die Transmembrandomäne-Deletionsmutante keinen Einfluss darauf hatte. Bei Koexpressionsstudien mit Fluoreszenzfusionsproteinen in Tabak-Protoplasten oder BY-2 Zellen kam es jeweils zu einer Umverteilung des Golgi-Markers ManI-RFP in das ER. Nach Behandlung mit BFA lösten sich die punktförmigen Strukturen von YFP-LeBos1 auf und die Fluoreszenz konnte im ER detektiert werden; woraus hervorgeht, dass LeBos1 im Golgi-Apparat lokalisiert ist.

Zur funktionellen Charakterisierung des SNARE-Proteins LeSed5 wurde dessen Einfluss auf die Sekretionsrate der α -Amylase sowohl mit den jeweiligen Wildtyp-Proteinen als auch mit den Δ NT-, Δ TMD- und Δ NT Δ TMD-Mutanten untersucht. Die Wichtigkeit der Transmembrandomäne zeigte sich durch den fehlenden inhibitorischen Effekt der Δ TMD- und Δ NT Δ TMD-Mutanten, wie er sonst bei der Überexpression von LeSed5-Wildtyp und dessen Δ NT-Mutante

auftrat. LeSed5 beeinträchtigt sowohl anterograden als retrograden Transport zwischen ER und Golgi-Apparat, was nicht auch zuletzt durch den inhibitorischen Effekt auf den Reporter α -Amylase-HDEL gezeigt werden konnte. Die Daten aus den Ergebnissen ließen den Schluss zu, dass der inhibitorische Effekt zeitabhängig ist. Dabei setzte zunächst die Inhibierung der Sekretion sofort ein, während die Toxizität des Proteins LeSed5 an sich aber erst nach vier Stunden wirksam wurde. CLSM-Studien von LeSed5 zusammen mit Marker Proteinen, die über COPII-Vesikel transportiert werden zeigten, dass deren korrekte Lokalisierung nicht mehr gewährleistet wurde und diese hauptsächlich im ER zurückblieben. Der Transport der vakuolären Proteine wurde bei Koexpression mit LeSed5 hingegen nicht beeinflusst. Der inhibitorische Effekt von LeSed5 auf den ER-Golgi-Transport wurde bei Fusion eines XFP-Proteins an den C-terminus des SNAREs aufgehoben, während er bei der Fusion an den N-Terminus erhalten blieb. Das nicht funktionelle C-terminale und auch das funktionelle N-terminale Fusionsprotein konnten am Golgi-Apparat lokalisiert werden, was auch durch BFA-Studien belegt wurde. Die Expression des funktionellen Fusionsproteins führte zu einer vermehrten Aggregatbildung; diese Aggregate erwiesen sich als BFA-resistent. Was diese Aggregate im Endeffekt wirklich darstellen konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Floreszenzstudien nicht beantwortet werden. Die Ergebnisse der Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass das SNARE-Protein LeSed5 einen wichtigen regulatorischen Faktor in der Fusionsmaschinerie des ER-Golgi-Transports darstellt.

Summary

An essential function of all eukaryotic cells is the control of protein and lipid trafficking within the endomembrane system. Membrane fusion is a fundamental biochemical reaction and an important step in vesicular trafficking routes of the secretory pathway and endocytosis. The basic steps of vesicle mediated transport are the formation of vesicles at the donor compartment, translocation and tethering of the vesicles to their target compartment and finally docking and fusion of vesicles with their target compartment. The current model of specificity of vesicle fusion signifies that fusion is based on an appropriate set of SNAREs with a defined subcellular localisation (Söllner et al., 1993; Rothman and Warren, 1994). Since the first study about SNAREs in mammalian cells (Block et al., 1988) different groups have been able to identify the structural properties of the SNARE complex in yeast and mammals (Bennet and Scheller, 1993; Burri and Lithgow, 2004; Hong, 2005; Jahn and Scheller, 2006). Because of the high number of SNAREs in plants the understanding of SNARE function in plants is far behind. The main focus of the present dissertation was the functional characterisation and localisation of the SNARE proteins LeBet1, LeBos1, LeSec22 and LeSed5 in *Nicotiana tabacum* by *in vivo* approaches. In order to do so a method was used which allows for a quantitative analysis of the trafficking in the early secretory pathway *in vivo*. Thus, the effect of distinct SNAREs on the secretion of a soluble reporter protein (α -amylase) can be quantified.

Overproduction of both, LeBet1 and LeSec22 as wild type proteins or transmembrane deletion mutants did not show any effect on α -amylase secretion. Localisation studies demonstrated that LeBet1 is localised to the Golgi stacks whereas LeSec22 is localised to both, ER and Golgi stacks.

Overproduction of LeBos1 by contrast leads to an inhibition of α -amylase secretion, whereas the transmembrane deletion mutant did not show any effect. In studies coexpressing XFP-tagged proteins in tobacco protoplasts or BY-2 cells the Golgi-marker ManI-RFP is mislocalised to the ER. In BFA-treated protoplasts expressing YFP-LeBos1 the punctate pattern of the YFP-signal disappeared and the signal is detected in the ER suggesting that LeBos1 is localised to the ER.

For functional characterisation of the SNARE protein LeSed5, an effect of wild type protein and its Δ NT-, Δ TM- and Δ NT Δ TM-deletion mutants on the secretion of α -amylase has been investigated, which was detected by overexpression of LeSed5 wild type and its Δ NT-mutant. An important role of the transmembrane domain in the sorting has been ruled out by the absence of an inhibitory effect of Δ TM- and Δ NT Δ TM-mutants on α -amylase secretion. LeSed5 does not only inhibit the secretion of α -amylase but also influences trafficking of α -amylase-HDEL, suggesting that both, anterograde and retrograde trafficking between the ER and the Golgi are affected by overexpression of LeSed5. Although overproduction of LeSed5 is cytotoxic, I believe that the effect on the secretory pathway is specific for the following reason: The

block in secretion occurs immediately after infection, the decrease of protein synthesis is detectable only after 4 hours. CLSM studies of LeSed5 together with marker proteins that are transported from the ER to the Golgi in a COPII-dependent manner showed, that these markers were mislocalised to the ER. However, trafficking of vacuolar proteins was not influenced by coexpression of LeSed5. The inhibitory effect of LeSed5 on the ER-Golgi trafficking was dependent on the fusion site of the fluorescent protein (XFP): whereas the N-terminal XFP-Fusion was active, the C-terminal XFP-Fusion was inactive. Nevertheless, both C- and N-terminal XFP-tagged LeSed5 were localised to the Golgi stacks, as also documented by the effects of BFA-treatment. But expression of the functional N-terminal tagged LeSed5 caused an increased formation of aggregates, which show BFA resistance. The structure of these aggregates could not be explained in this study. These results indicate that the SNARE protein LeSed5 is a crucial regulatory factor in the fusion machinery of ER-Golgi trafficking.

1. Einleitung

Die eukaryotische Zelle ist durch eine Kompartimentierung charakterisiert und gewährleistet somit eine funktionelle und räumliche Aufteilung in hoch spezialisierte membran-umgebende Reaktionsräume innerhalb der Zelle. Diese Reaktionsräume sind in sich abgeschlossen und besitzen jeweils eine charakteristische Zusammensetzung an Biomolekülen, wie zum Beispiel an Polypeptiden, Carbohydraten, Lipiden und anderen Molekülen. Um die Versorgung dieser Reaktionszentren aufrecht zu erhalten, stehen diese durch einen intensiven, koordinierten Vesikelfluss miteinander in Verbindung. Dieses Endomembransystem, das aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen bzw. Vakuolen und der Plasmamembran besteht, ist daher sehr dynamisch und komplex.

1.1. Die Organisation des Endomembransystems der Pflanzen

Obwohl das Endomembransystem sehr viele Gemeinsamkeiten in allen eukaryotischen Organismen besitzt, gibt es jedoch einige Besonderheiten gerade im Transportsystem höherer Pflanzen. Dazu zählen unter anderem die Sekretion von Polysacchariden der Zellwand, die Bildung der Zellplatte während der Zellteilung, oder auch das Vorkommen spezieller Kompartimente wie Plastiden und Proteinspeichervakuolen (Jiang et al., 2001). Um die komplexen Funktionen der eukaryotischen Zelle aufrechterhalten zu können, muss ein kontinuierlicher Transport von Proteinen, Lipiden, Hormonen und Stoffwechselmetaboliten zwischen den einzelnen Kompartimenten stattfinden. Zwei Transportwege, an denen das Endomembransystem maßgeblich beteiligt ist, spielen dabei eine besonders wichtige Rolle. Der biosynthetische Weg, auch „sekretorischer Transportweg“ genannt, der über das ER und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran bzw. zur Vakuole gerichtet ist und die Endocytose, der Stofftransport über die Plasmamembran in das Innere der Zelle. Der sekretorische Weg wiederum kann in einen frühen sekretorischen Weg vom ER bis zum Golgi-Apparat und einen späten sekretorischen Weg ab dem Golgi-Apparat unterteilt werden. Der Transport zwischen den einzelnen Kompartimenten findet mittels kleiner Transportvesikel statt, die von einer Donor-Membran abknospen, um dann am Zielort mit der Membran des Zielkompartiments zu fusionieren. Alle vorwärts (anterograd) und rückwärts (retrograd) gerichteten Transportvorgänge bilden ein System, das in einem dynamischen Gleichgewicht steht. Um diese gerichteten Transportvorgänge regulieren zu können sind eine Reihe von Kontrollmechanismen notwendig (Palade, 1975).

Der sekretorische Transportweg beginnt mit dem ko- oder posttranslationalen Eintritt der Proteine in das Lumen des ER. Der Eintritt eines Proteins mittels kotranslationaler Translokation in das Lumen des ER wird durch ein 16-30 Aminosäurereste langes Signalpeptid ermöglicht (Rapport et al., 1996). Proteine, die kein weiteres Sortierungssignal aufweisen, werden auf dem so genannten „default pathway“ zur Plasmamembran transportiert und sekretiert (Pfeffer and

Rothman, 1987; Denecke et al., 1990). Je nach weiterer spezifischer Signalsequenz wird entweder der Verbleib des Proteins in einem Kompartiment des sekretorischen Wegs oder dessen selektiver Transport zu anderen Zielkompartimenten ermöglicht (Chrispeels, 1991; Pelham, 1995; Gomord and Faye, 1996).

1.1.1. Das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) erstreckt sich als ein komplexes Membransystem von der Kernhülle bis hin zu den kortikalen Regionen der Zelle und kann in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt werden: Kernhülle, raues ER, glattes ER und transitorisches ER (Stae helin, 1997). Das ER der Pflanzenzelle erstreckt sich durch die Plasmodesmata auch über die Zellgrenzen hinaus. Diese spezialisierten Kanäle in den Zellwänden sind eine Besonderheit der pflanzlichen Zellen. Durch den kontinuierlichen Verlauf des ER entsteht eine direkte Verbindung des Endomembransystems benachbarter Zellen und ermöglicht somit den Austausch von Proteinen und Lipiden im Zellverband (Lucas and Wolf, 1993).

Das transitorische ER galt als der Bildungsort von Transportvesikeln, welche Proteine und Lipide zu anderen Kompartimenten der Zelle transportieren. Heutzutage nimmt man allerdings an, dass das transitorische ER in höheren Pflanzen gar nicht existiert (Robinson et al., 2007). Diese Annahme beruht auf ultrastrukturellen Studien, die aufgrund verbesserter Fixierungs- und Einbettungsmethoden entstanden sind. Die Bereiche des ER, die stark mit Ribosomen besetzt sind stellen das raue ER dar. Sie sind der Ort der Synthese von Proteinen, deren Translokation direkt in das Lumen des ER erfolgt. Ribosomenfreie, netzförmig verzweigte Abschnitte des ER, in denen die Lipide synthetisiert werden, bezeichnet man als das glatte ER (Stae helin, 1997; Rose and Doms, 1988; Sitia and Meldolesi, 1992).

Der Eintritt der neu synthetisierten Proteine in das Endomembransystem beginnt mit der kotranslationalen Translokation in das Lumen des ER. Nach der Translation des N-terminalen Signalpeptids bindet daran ein cytosolischer Signal-Erkennungs-Partikel („signal recognition particle“; SRP) und leitet diesen Komplex durch die Interaktion mit dem SRP-Rezeptor, einem integralen Membranprotein, zur ER-Membran. Anschließend wird das Protein durch die Translokationspore (Sec61) in das Lumen des ER transloziert (Walter and Blobel, 1981; Meyer et al., 1982; Hartmann et al., 1994; Wanker et al., 1995). Nach dem Entfernen des Signalpeptids durch eine luminal Signalpeptidase, werden die löslichen Proteine mit Hilfe der Chaperone BiP (Munro and Pelham, 1986), Calreticulin (Denecke et al., 1995) und Calnexin (Hebert et al., 1995; 1996) gefaltet. Falsch gefaltete Proteine scheinen mittels eines qualitativen Kontrollmechanismus abgebaut und zur Degradation über die ER-Membran zurück ins Cytosol transportiert zu werden (Brandizzi et al., 2003).

Sowohl lösliche Proteine als auch TypI-Membranproteine werden nach dem Eintritt in das Lumen des ER N-glykosyliert (Vitale and Denecke, 1999). Arabidopsis-Mutanten, die einen De-

fekt in der N-Glykosylierung aufweisen, oder denen die α -Glucosidase I zur N-Glykosylierung fehlt, sind Embryo letal (Lukowitz et al., 2001; Gillmore et al., 2002; Boisson et al., 2001). TypII-Membranproteine und Proteine mit einem hydrophoben C-terminalen Membrananker bleiben hauptsächlich im Cytosol zurück. Erst nach abgeschlossener Modifikation und korrekter Faltung werden die Proteine mittels so genannter COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat befördert. Diese werden am ER gebildet und mit entsprechenden Frachtmolekülen beladen. Alle Proteine, die kein spezifisches Sortierungssignal tragen, werden mit dem Hauptstrom („bulk flow“) in den Extrazellularraum sekretiert. Ein spezifisches ER-Exportsignal wird dazu nicht zwangsläufig benötigt (Chrispeels, 1991). Dennoch konnten im Falle von Membran-gebundenen Frachtmolekülen Interaktionen zwischen Motiven in deren cytosolischer Domäne („di-hydrophobic“, „di-acidic“ oder „di-basic“) und Untereinheiten der COPII-Hüllproteine identifiziert werden. Um einen Überblick über die ER-Exportsignale in Eukaryonten zu bekommen, sei auf die Fachliteratur verwiesen (Barlowe, 2003; Sato and Nakano, 2007; Robinson et al., 2007).

Proteine, die in der Zelle verbleiben und damit vom „bulk flow“ abzweigen, müssen ein entsprechendes Signal tragen (Pfeffer and Rothman, 1987). ER-residente Proteine werden aktiv im ER zurückgehalten oder durch einen selektiven Rücktransport aus dem Golgi-Apparat mittels COPI-Vesikel zurück in das ER transportiert (Vitale and Denecke, 1999). Die Identifizierung von ER-Retentionssignalen an ER-residenten Proteinen stützt die „bulk-flow“-Hypothese. Am Beispiel des ER-residenten Chaperons BiP konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Aminosäuresequenz HDEL dessen Retention in das ER der Säuger bewirkt (Munro and Pelham, 1987). In Hefen bewirkt die KDEL-Sequenz die Retention (Pelham et al., 1988) und in Pflanzen funktioniert sowohl HDEL als auch KDEL als Retentionssignal (Denecke et al., 1992; Napier et al., 1992). Als ER-Marker werden auch in dieser Arbeit unter anderem das GFP-HDEL, wie auch die ER-residenten Proteine BiP, Calreticulin und Calnexin verwendet (Bar-Peled and Raikhel, 1997; Irons et al., 2003). Die Retention ER-residenter Membranproteine erfolgt mittels eines di-Lysin-Signals (KKXX bzw. KXKXX) in deren cytoplasmatischer Domäne (Nilsson et al., 1989; Shin et al., 1991; Jackson et al., 1993). Dieses Signal interagiert mit dem Coatomer der COPI-Vesikel und ist daher am Rücktransport ER-residenter Proteine beteiligt (Letourneur et al., 1994; Zerangue et al., 2001; Eugster et al., 2004). In Hefen und Säugern wurde ein weiteres ER-Retentionssignal, das Arginin-Signal („R-based signal“), in der Aminosäuresequenz von Membranproteinen identifiziert. Dieses R-Signal wird an Untereinheiten des Coatomer gebunden und das Protein somit in COPI-Vesikel integriert (Zerangue et al., 2001; Michelsen et al., 2007).

Zusätzlich zum COPII-abhängigen ER-Golgi Transport, werden vom ER auch Membrankompartimente abgespalten, deren Zielkompartiment nicht zwangsläufig der Golgi-Apparat ist, wie zum Beispiel so genannte „oil bodies“ oder auch andere Protein-Transporter, die direkt zur Proteinspeichervakuole transportiert werden (Hara-Nishimura et al., 1998; Jiang and Rogers, 1998; Chrispeels and Herman, 2000).

1.1.2. Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat ist das zentrale Kompartiment aller eukaryotischen Zellen und hat eine Schlüsselposition innerhalb des sekretorischen Transportwegs inne. Die zu sekretierenden Proteine werden hier prozessiert und für den Transport in die entsprechenden Zielkompartimente sortiert und verpackt (Farquhar and Palade, 1998).

Der Golgi-Apparat höherer Pflanzen unterscheidet sich morphologisch deutlich von dem der Säugerzellen (Pavelka and Robinson, 2003). Während in Säugerzellen der Golgi-Apparat aus mehreren Golgi-Stapeln besteht, die durch verzweigte tubuläre Membranen miteinander verbunden sind und dadurch ein Zellkern umgebendes, komplexes Netzwerk bilden, sind die Golgi-Stapel in Pflanzenzellen nicht miteinander verbunden und stellen funktionell unabhängige Einheiten dar. Diese sind überall im Cytosol verteilt und weisen eine hohe Mikrofilament-abhängige Mobilität auf. (Boevink et al., 1998; Nebenfuhr et al., 1999; Brandizzi et al., 2003).

Die Golgi-Stapel der Pflanzenzelle werden als Dictyosomen bezeichnet und bestehen aus Stapeln membran-umschlossener Zisternen. Die Anzahl der Zisternen je Dictyosom sowie die Anzahl der Dictyosomen selbst variiert stark innerhalb verschiedener Pflanzenarten (Staehein and Moore, 1995; Dupree and Sherrier, 1998). Die Dictyosomen weisen morphologisch eine starke Polarität auf und werden in *cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi unterteilt. An den *trans*-Golgi gliedert sich das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an (Nebenfuhr and Staehein, 2001).

Die Proteine des sekretorischen Weges durchlaufen den Golgi-Apparat unidirektional von *cis* nach *trans* und werden während des Transports meist glykosyliert (O-gekoppelte Glykosylierung). Des Weiteren stellt die Synthese von Polysacchariden der Zellwand eine weitere wichtige Aufgabe des Golgi-Apparates dar. Die funktionelle Einteilung des Golgi-Apparates in *cis*-, *medial*- und *trans*-Zisternen basiert auf der Zusammensetzung der Enzyme in den jeweiligen Zisternen. Ein Beispiel ist die Mannosidase II, welche N-Glycane in medialen-Zisternen modifiziert (Staehein and Moore, 1995; Dupree and Sherrier, 1998). Als Golgi-Marker können außerdem weitere Enzyme, wie die im *cis*-Golgi vorkommende Mannosidase I oder die im *trans*-Golgi vorkommenden UDP-Glucose-Transporter GONST1 bzw. die Sialyltransferase (ST) aus Säugern verwendet werden (Neumann et al., 2003; Saint-Jore-Dupas et al., 2004).

Für eine Sortierung der Proteine zu den vakuolären Kompartimenten sind spezifische Sortierungssignale erforderlich (Übersicht in Robinson and Hinz, 1997; Neuhaus and Rogers, 1998; Hadlington and Denecke, 2000).

1.1.3. Proteinsortierung am Golgi-Apparat

In Pflanzen teilt sich am Golgi-Apparat der Transportweg zum einen zur Plasmamembran und zum anderen zu den verschiedenen Vakuolen. Der „default pathway“ führt vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran. Der Transport zur Vakuole hingegen benötigt ein Aussortieren vom Hauptstrom („bulk flow“) am Golgi-Apparat (Pfeffer and Rothman, 1987). Für eine Sortierung der Proteine zu den vakuolären Kompartimenten sind daher spezifische Sortierungssignale erforderlich (Robinson and Hinz, 1997; Neuhaus and Rogers, 1998). Diese unterscheiden sich voneinander in Abhängigkeit vom jeweiligen Organismus (Hadlington and Denecke, 2000).

Die pflanzlichen Vakuolen nehmen neben ihrer Funktion als lytisches Kompartiment eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Zellurgors und der Speicherung von Proteinen, organischen Säuren, Lektinen und Stoffwechselmetaboliten ein (Wink, 1993). Außerdem lassen sie sich in Form, Größe, Inhalt und Funktion unterscheiden (Marty, 1999). Es gibt zwei funktionell unterschiedliche Vakuolen, die auch innerhalb einer Zelle koexistieren können. So konnte die Koexistenz von lytischen Vakuolen (LV) und Proteinspeichervakuolen (PSV) in Wurzelspitzen der Gerste und in Mesophyll-Protoplasten des Tabaks nachgewiesen werden (Paris et al., 1996; Di Sansebastiano et al., 1998). Mittels der so genannten „tonoplast intrinsic proteins“ (TIPs), die spezifische intergrale Membranproteine darstellen, lassen sich die beiden Vakuolentypen unterscheiden. So ist die PSV durch die Isoformen δ -TIP bzw. α -TIP und die LV durch die Isoform γ -TIP charakterisiert (Swanson et al. 1998, Jauh et al., 1999).

Die Sortierung vakuolärer Proteine in Pflanzen erfolgt durch Sortierungssignale, die aus ihrer Aminosäuresequenz resultieren. Es gibt drei Kategorien von pflanzlichen vakuolären Sortierungssignalen (VSS): (1) das Sequenz-spezifische VSS (ssVSS), (2) das C-terminale VSS (ctVSS) und (3) das strukturelle VSS („physical structure VSS“; psVSS). Je nach Lage des ssVSS unterscheidet man zwischen N- und C-terminalem ssVSS (Matsuoka et al., 1990; Holwerda et al., 1992). Die meisten N-terminalen ssVSS zeigen eine gemeinsame Aminosäuresequenz (NPIR) (Matsuoka and Neuhaus, 1999). Dagegen gibt es innerhalb des C-terminalen ssVSS keine Konsensussequenz (Cao et al., 2000; Brown et al., 2003). Das Sortierungssignal kann sich aber auch innerhalb der Proteinsequenz befinden (Ricin; Frigerio et al., 2001). Um einen vollständigen Überblick über die Diversität der verschiedenen Sortierungssignale zu bekommen sei auf die Fachliteratur (Robinson et al., 2005; Vitale and Hinz, 2005) verwiesen. Spezifische Sortierungssignale in löslichen vakuolären Hydrolasen interagieren mit einem Rezeptor („vacuolar sorting receptor“; VSR) in der Membran des *trans*-Golgi oder des TGN (Rouille, et al., 2000). Diese Ligand-Rezeptor-Komplexe werden anschließend in CCVs („Clathrin-coated vesicles“) rekrutiert und zum so genannten prävakuolären Kompartiment (PVC) transportiert (Robinson et al., 1998). Es wird angenommen, dass der Transport zur lytischen Vakuole ausschließlich auf diese Weise abläuft (Vitale and Raikhel, 1999). Im Falle vie-

ler Speicherproteine, wie Legumin und Vicilin, konnte jedoch gezeigt werden, dass diese nicht in CCVs, also VSR-unabhängig, transportiert werden. Sie werden in Vesikeln, die aufgrund ihres elektronendichten Inhalts in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als „dense vesicles“ (DVs) bezeichnet werden, transportiert. DVs werden an den lateralen Enden der Golgi-Cisternen gebildet, wobei die Sortierung in DVs bereits am *cis*-Golgi beginnt (Hohl et al., 1996; Hinz et al., 1999; Hillmer et al., 2001). In diesem Sortierungsprozess ist ein weiteres membranständiges Rezeptorprotein involviert, das im Gegensatz zum VSR nicht zum Golgi-Apparat rezykliert wird. Es gehört zu RMR Proteinfamilie („luminal **R**eceptor homology domain, trans **M**embrane domain and **R**ing-H2 motif in the cytoplasmic tail protein) (Jiang et al, 2000). Demnach stellen sowohl der *cis*-Golgi als auch der *trans*-Golgi und das TGN unterschiedliche Sortierungsdomänen innerhalb eines Dictyosoms dar (Abb. 1.1).

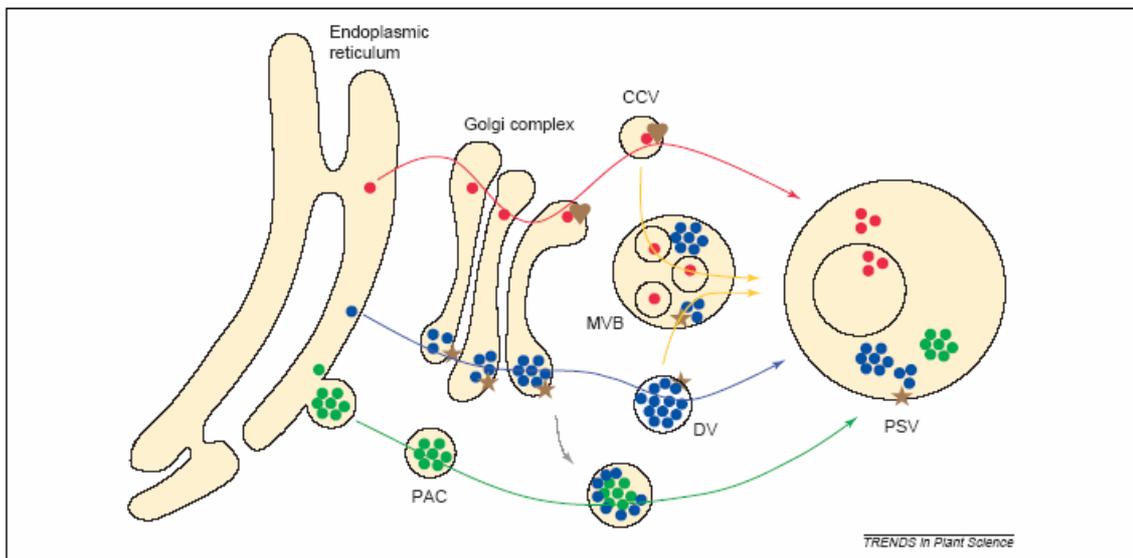


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Proteintransports zur Proteinspeichervakuole (PSV). (aus Vitale and Hinz, 2005). Der Transportweg vakuolärer Proteinen, deren Sortierung mittels VSR (braunes Herz) in CCVs stattfindet, ist in rot dargestellt. VSR wird zum Golgi-Komplex zurückgeführt. Im Gegensatz dazu findet die Sortierung in DVs mittels Aggregatbildung bereits im *cis*-Golgi statt (in blau dargestellt). Der RMR-Rezeptor (brauner Stern) könnte diese Sortierung initiieren oder begünstigen. RMR wird nicht rezykliert. Ein direkter Weg, der den Golgi-Apparat mittels „precursor-accumulating (PAC) vesicles“ umgeht, wurde in Kürbis beobachtet (in grün dargestellt; Hara-Nishimura et al., 1998). Die Wege der DVs and CCVs könnten in Form eines „multivesicular body“ (MVB) zusammentreffen (in gelb dargestellt).

1.2. Prinzipien des Vesikel-vermittelten Transports des Endomembransystems

Der intrazelluläre Proteintransport in eukaryotischen Zellen wird durch verschiedenartige Transportvesikel, die jeweils von einer charakteristischen Proteinhülle umgeben sind, gewährleistet. Während COPII-Vesikel für den klassischen ER-Export und den Transport zum *cis*-Golgi (anterograd) verantwortlich sind, bestimmen die COPI-Vesikel den retrograden Transport vom *cis*-Golgi zum ER als auch den Transport innerhalb des Golgi-Apparates. „Clathrin coated vesicles“ (CCVs) vermitteln den selektiven Proteintransport vom *trans*-Golgi bzw. vom TGN zu den prävakuoären Kompartimenten (PVCs) und sind ebenfalls am endocytotischen Proteintransport beteiligt (Schekman and Orci, 1996; Rothman and Wieland, 1996; Barlowe, 1998; Sanderfoot and Raikhel, 1999; 2003). Ein neuer Hüllprotein-Komplex, der so genannte Retromer-Komplex wurde erstmals in Hefen beschrieben (Seaman et al., 1998) und konnte nun auch in Pflanzen identifiziert werden (Oliviusson et al., 2006). Dieser scheint essentiell für das Recycling von Membranproteinen vom PVC zurück zum Golgi-Apparat zu sein.

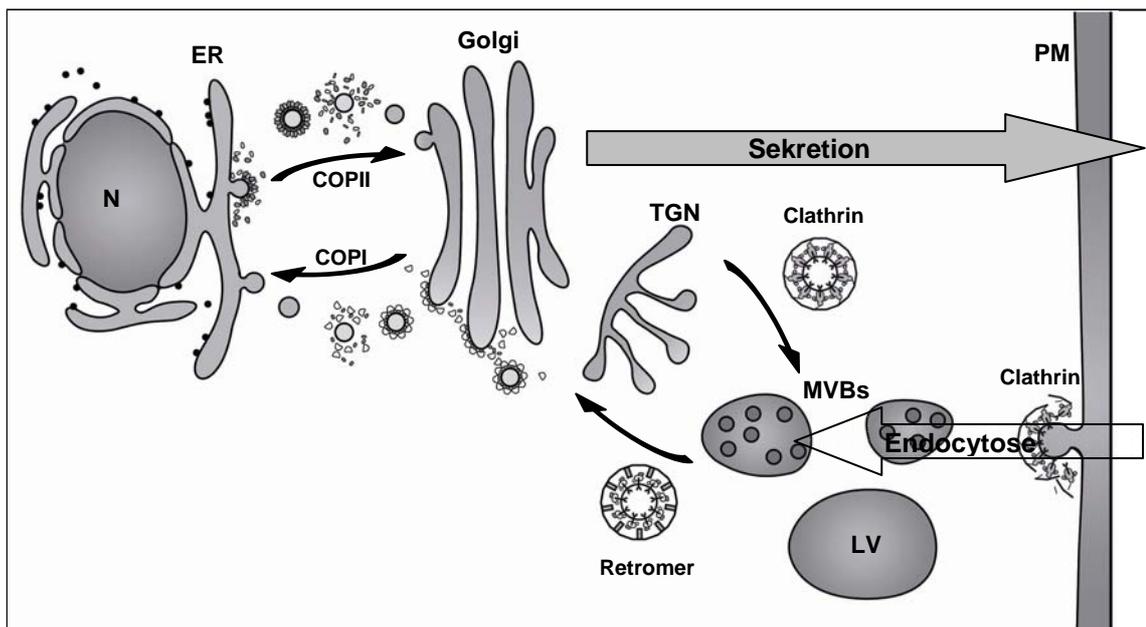


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Proteintransports des biosynthetisch-sekretorischen Wegs und des endocytotischen Wegs der Pflanze. Die verschiedenen Transportrichtungen zwischen den Kompartimenten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Nur der sich im Gleichgewicht befindende Transport zwischen endocytotischem und sekretorischem Weg in anterograder wie retrograder Richtung kann zu einem Strukturerehalt des Endomembransystems und damit der Zelle führen.

Diese Vesikel-vermittelten Transporte haben alle die folgenden drei Schritte gemeinsam: Im ersten Schritt assemblieren die Hüllproteine an die Membran, sodass eine Wölbung der Membran entsteht. Einzelne Komponenten der Hüllproteine interagieren mit Membranproteinen und lösliche Proteine werden an Rezeptoren gebunden. So werden die Frachtmoleküle angereichert

und das Transportvesikel schnürt sich von der Donor-Membran ab. Im zweiten Schritt erfolgt die Dissoziation der Hüllproteine, sodass die Anlagerung an die Zielmembran ermöglicht wird. Im dritten Schritt fusioniert der Transportvesikel mit der Membran seines Zielkompartiments und die Frachtmoleküle werden freigegeben (Robinson et al., 1999; Kirchhausen, 2000). Um einen koordinierten Vesikel-vermittelten Proteintransport innerhalb der Zelle zu gewährleisten, bedarf es bestimmter Kontrollmechanismen. Dabei unterscheidet man zwischen zwei Teilprozessen. Zum einen die korrekte Zuordnung der Transportvesikeln zu den richtigen Zielkompartimenten und zum anderen die eigentliche Fusion. Beim ersterwähnten Prozess sind so genannte Rab-GTPasen und Tethering-Faktoren beteiligt (Sogaard et al., 1994; Rutherford and Moore, 2002; Lupashin and Sztul, 2005). Bei der Fusion der Vesikel mit der Zielmembran hingegen sind vor allem die SNAREs („soluble NSF attachment protein receptor“) für die Spezifität entscheidend (Sollner et al., 1993; Sanderfoot and Raikhel, 1999; McNew et al., 2000; Hong, 2005; Lipka et al., 2007).

1.2.1. COPI-Vesikel

Bei Untersuchungen des *intra*-Golgi Transports von Säugerzellen wurden die so genannten COPI-Vesikel („coat protein-coated vesicles“) identifiziert (Balch et al., 1984). Diese Transportvesikel weisen eine diffuse, unregelmäßige Proteinhülle auf und werden an den lateralen Enden der Zisternen des Golgi-Apparates gebildet (Orci et al., 1986). Im Rahmen weiterer Untersuchungen zur Bildung und Fusion der COPI-Vesikel konnten diese schließlich isoliert und deren Hüllproteine charakterisiert werden (Malhotra et al., 1989; Serafini et al., 1991; Waters et al., 1991). Die Existenz von COPI-Vesikeln in Pflanzen konnte mittels Zellfraktionierung, biochemischen Rekonstitutionsversuchen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden (Movafeghi et al., 1999; Contreras et al., 2000; Pimpl et al., 2000). Die Bildung der Proteinhülle der COPI-Vesikel ist ein koordinierter Vorgang. Durch die Rekrutierung der GTPase ARF1 (ADP-Ribosylierungsfaktor; Serafini et al., 1991) wird die Bildung von COPI-Vesikeln eingeleitet (Abb. 1.3). Der zweite Hauptbestandteil der COPI-Vesikel ist das Coatomer. Es setzt sich aus sieben Untereinheiten zusammen (α -COP/Rer1p, β -COP/Sec26p, β^{\prime} -COP/Sec27p, γ -COP/Sec21p, δ -COP/Ret2p, ϵ -COP/Sec28p, ζ -COP/Ret3p; aufgezählt in der Nomenklatur von Hefen/Säugern). Die Assemblierung des Coatomers erfolgt spontan durch direkte Interaktion der COP-Untereinheiten (Faulstich et al., 1996; Lowe and Kreis, 1996).

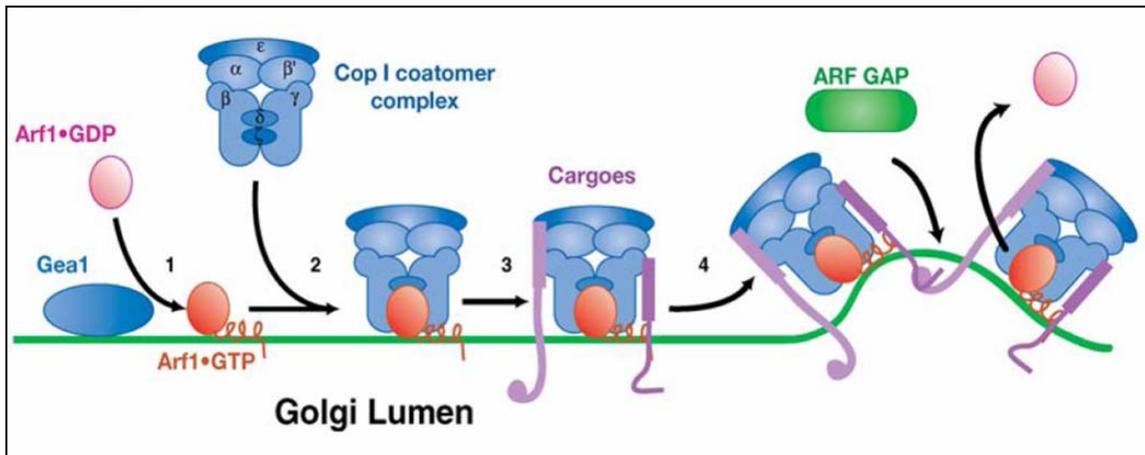


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Rekrutierung der COPI-Hüllproteine von Säugern (aus Lee et al., 2004).

Durch die Interaktion von ARF1 mit einem Membran-gebundenen GEF („guanine nucleotide exchange factor“), der den Austausch von GDP gegen GTP von ARF1 katalysiert, kommt es zu einer Konformationsänderung des ARF1 und es kann an der Membran verankert werden (Helms and Rothman, 1992; Abb. 1.3 (1)). Es wurden bereits einige ARF-GEFs in Hefen, Säugern und Pflanzen identifiziert. Alle GEFs enthalten eine konservierte Sec7-Domäne, durch die der Austausch von GDP zu GTP katalysiert wird (Übersicht in Donaldson, 2000; Sanderfoot and Raikhel, 2003; Jurgens, 2004). Das Membran-gebundene ARF1 rekrutiert nun das Coatomer (Abb. 1.3 (2)), das mittels verschiedener Kargo-Bindungsstellen der Untereinheiten Frachtmoleküle rekrutieren kann (Abb. 1.3 (3)). Die Rekrutierung weiterer ARFs und Coatomer-Komplexe entsteht eine Wölbung der Membranoberfläche, die sich dann letztendlich als Vesikel ablöst (Ostermann et al., 1993). Die Dissoziation der Proteinhülle wird durch die Hydrolyse des gebundenen GTP mittels eines cytosolischen GTPase aktivierenden Proteins (GAP) eingeleitet (Abb. 1.3 (4)). Nach der Dissoziation der Proteinhülle liegen Coatomer und ARF-GDP im Cytosol zur Bildung eines neuen Vesikels vor (Übersicht in Barlowe, 2000; Duden, 2003; Lee et al., 2004).

1.2.2. COPII-Vesikel

Ein zweiter Typ von Transportvesikeln wurde aus Hefen isoliert und charakterisiert und wird aufgrund der Ähnlichkeit in elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit den COPI-Vesikeln als COPII-Vesikel bezeichnet (Barlowe et al., 1994; Antony and Schekman, 2001). Diese Vesikel werden am ER gebildet und vermitteln den Proteintransport vom ER zum *cis*-Golgi (Salama et al., 1993). Dieser vorwärts gerichtete (anterograde) Transport steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem retrograden, COPI-vermittelten Transport vom Golgi-Apparat zum ER (Letourneur et al., 1994). Dadurch wird ein Recycling von Proteinen, die am ER-Golgi-Transport beteiligt sind, ermöglicht und der Membranfluss des anterograden Transports ausglich (Rothman, 1994; Townsley et al., 1994; Lewis and Pelham, 1996).

Die Hülle der COPII-Vesikel setzt sich aus drei Hauptbestandteilen, der GTPase Sar1, dem Sec23/24- und dem Sec13/31-Proteinkomplex, zusammen (Barlowe et al., 1994; Matsuoka et al., 1998). Die Rekrutierung der COPII-Hüllproteine wird durch die Hydrolyse der kleinen GTPase Sar1p initiiert (Abb. 1.4 (1)). Diese liegt im Cytosol in einer inaktiven, GDP-gebundenen Form vor und muss zur Bindung an die Membran durch dessen Membran-gebundenes GEF Sec12p in eine aktive, GTP-gebundene Form überführt werden (Nakano et al., 1988; Barlowe and Schekman, 1993). Auch in Pflanzen (Bar-Peled and Raikhel, 1997) und Säugern (Weissman et al., 2001) konnte jeweils ein homologes Protein zu Sec12p identifiziert werden. Nach der Bindung an die Membran rekrutiert Sar1p-GTP den Sec23/24-Proteinkomplex (Abb. 1.4 (2)). Frachtmoleküle werden von der Sec24-Untereinheit, die verschiedene unabhängige Bindungsstellen („A-site“, „B-site“ and „C-site“) aufweist, gebunden (Mossessova et al., 2003; Miller et al., 2003; Sato and Nakano, 2007) und der Sec13/31-Proteinkomplex wird rekrutiert (Abb. 1.4 (3) und (4)). Durch weitere Rekrutierungen von Sar1p und der beiden Proteinkomplexe erfolgt eine Krümmung der Membran, die zur Abknospung des Vesikels führt (Übersicht in Bonifacino and Glick, 2004; Lee et al., 2004). Die Dissoziation der COPII-Proteinhülle erfolgt durch die Hydrolyse des am Sar1p gebundenen GTP. Hierbei agiert das Sec23p als das Sar1p-spezifische GAP (Yoshihisa et al., 1993).

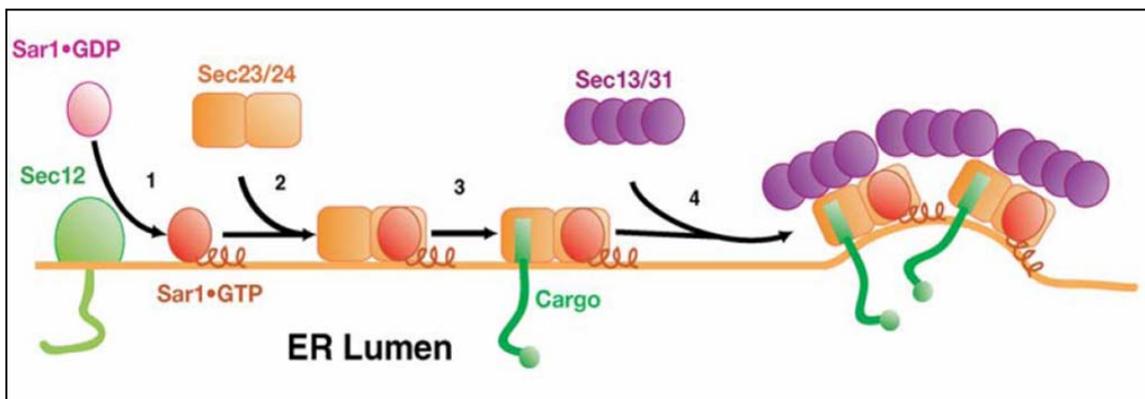


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Rekrutierung der COPII-Hüllproteine von Säugern (aus Lee et al., 2004).

Das Genom von *A. thaliana* codiert jeweils für mehrere Gene der COPII-Hüllproteine (Übersicht in Robinson et al., 2007). Die Bedeutung des COPII-Mechanismus für den anterograden Proteintransport im frühen sekretorischen Weg der Pflanzen konnte in verschiedenen Studien demonstriert werden. So führte die Überproduktion von AtSEC12 oder von dominant-negativen Mutanten der GTPase SAR1 aus *A. thaliana* zu einer Inhibition des ER-Exports (Takeuchi et al., 2000; Phillipson et al., 2001; daSilva et al., 2004).

1.3. Die SNARE-vermittelte Fusion

Die Membranfusion ist eine fundamentale biochemische Reaktion und der finale Schritt aller Vesikel-vermittelten Transportvorgänge. Um den kontrollierten Transport innerhalb des sekretorischen Weges zu gewährleisten, bedarf es einer Vielzahl von Faktoren, die die Fusion des Donorkompartiments mit dem entsprechenden Zielorganell steuern. Dazu gehören neben den Rab-GTPasen, „Tethering“-Komplexen und den AAA-type ATPasen vor allem die SNARE-Proteine, die durch die gesamte eukaryotische Evolution konserviert wurden (Vale, 2000; Pfeffer, 2001; Lupashin and Sztul, 2005; Jahn and Scheller, 2006; Cai et al., 2007; Markgraf et al., 2007).

Die SNARE-Proteine konnten nach mehr als einem Jahrzehnt intensiver biochemischer Studien identifiziert werden. Nachdem in den frühen 1980ern ein *in vitro* Transport-Assay entwickelt worden war, konnten zwei lösliche Proteine aufgereinigt werden, die für einen effizienten Transport benötigt werden (Balch et al., 1984). Diese Proteine, NSF („*N*-ethylmaleimide sensitive factor“) und das Adaptor-Protein SNAP („soluble NSF attachment protein“) agieren in vielen intrazellulären Transportvorgängen (Block et al., 1988; Clary et al., 1990). Weitere Untersuchungen zur Fusion von Vesikeln der neuronalen Synapsen mit der präsynaptischen Membran führten zur Isolation der dazugehörigen Rezeptoren, den so genannten SNAREs („SNAP receptors“). Nach der daraufhin postulierten SNARE-Hypothese trägt jeder Vesikel für die Zielmembran charakteristische Proteine, die als v-SNAREs („vesicle-SNAP-receptor“) bezeichnet werden und mit spezifischen Proteinen, den t-SNAREs („target-SNAP-receptor“), der Zielmembran in Wechselwirkung treten (Söllner et al., 1993; Rothman, 1994). Durch die Identifizierung organellspezifischer SNARE-Proteine in Säugern, Hefen und Pflanzen liegt die Vermutung nahe, dass der Erkennung des Zielkompartiments durch die Transportvesikel und deren anschließender Fusion ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt, der in allen eukaryotischen Zellen konserviert ist.

1.3.1. Struktur und Klassifizierung der SNARE-Proteine

Die SNARE-Proteine weisen eine einfache Domänenstruktur auf. Sie besitzen im Allgemeinen eine cytosolische N-terminale Domäne mit dem charakteristischen SNARE-Motiv und eine Transmembrandomäne (TMD) mit einem kurzen luminalen C-Terminus oder selten eine Prenylgruppe (Hong, 2005; Jahn and Scheller, 2006). Der ursprünglichen funktionellen Klassifizierung der SNARE-Proteine in t- und v-SNAREs, folgte eine zweite Klassifizierung, basierend auf strukturellen Eigenschaften der SNARE-Motive der jeweiligen SNARE-Proteine (Fasshauer et al., 1998; Sutton et al., 1998). Das so genannte SNARE-Motiv ist eine hoch konservierte Sequenz mit einer Länge von etwa 60 - 70 Aminosäuren (Weimbs et al., 1997), das die Bildung eines tetramerschen *trans*-SNARE-Komplexes ermöglicht (Weber et al., 1998). Jedes SNARE-Motiv trägt eine Helix zu diesem SNARE-Komplex bei, sodass ein Bündel entsteht, das durch

16 Ebenen von interagierenden Aminosäuren-Seitenketten im Zentrum stabilisiert wird (Sutton et al., 1998). Die Aminosäuren dieser Ebenen sind überwiegend hydrophob, außer der Aminosäure der innersten Ebene, dem so genannten "zero layer." Entsprechend der jeweiligen Aminosäure Glutamin (Q) oder Arginin (R) dieser innersten Ebene wurden die SNARE-Proteine in Q- und R-SNAREs eingeteilt (Fasshauer et al., 1998). Im Allgemeinen entsprechen t-SNAREs den Q-SNAREs und v-SNAREs den R-SNAREs. Die Q-SNAREs werden wiederum in Qa-, Qb- und Qc-SNAREs unterteilt (Bock et al., 2001). Einen Sonderfall stellt die SNARE Unterfamilie SNAP25 dar; anstelle eines SNARE-Motivs besitzen Vertreter dieser Gruppe zwei SNARE-Motive (Qbc-SNARE).

Der cytosolische N-terminale Teil der SNARE-Proteine weist je nach Unterfamilie neben dem SNARE-Motiv eine verlängerte N-terminale Domäne auf, die eine regulatorische oder autoinhibitorische Funktion innehaben kann. Im Falle der Qa-SNAREs besteht diese aus drei Helices, welche sich zu einem 3-fachen helikalen Bündel zusammenlagern und als Habc-Domäne bezeichnet wird. Die Habc-Domäne des neuronalen Qa-SNAREs (Syntaxin1) kann mit dem SNARE-Motiv interagieren und imitiert somit das 4-fache helikale Bündel des SNARE-Komplexes. Diese so genannte „geschlossene Konformation“ verhindert die Interaktion des Syntaxins mit anderen SNARE-Proteinen (Fernandez et al., 1998; Lerman et al., 2000; Munson et al., 2000). Nicht alle Qa-SNAREs zeigen diese Formation, sondern liegen daher in einer „offenen“ Konformation vor, in der die Habc-Domäne nicht mit dem SNARE-Motiv interagiert (Übersicht in Dietrich et al., 2003).

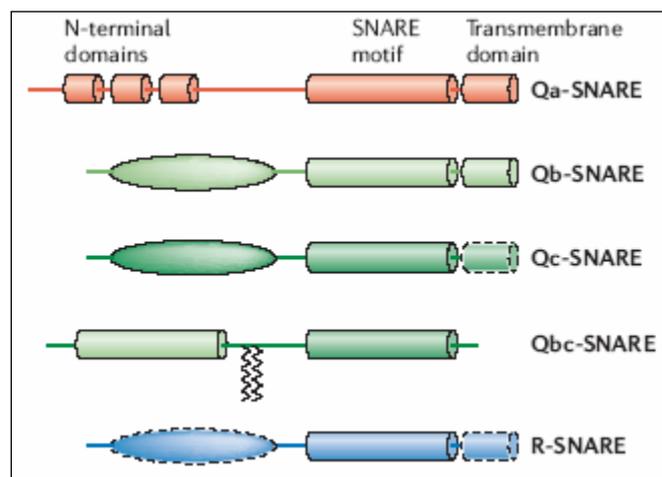


Abb. 1.5: Die Struktur der SNARE-Proteine (aus Jahn and Scheller, 2006). Dargestellt ist die Domänenstruktur der strukturell klassifizierten Q- und R-SNARE-Proteine. Die gestrichelte Linie stellt Domänen dar, die in manchen Unterfamilien fehlen. Qa-SNAREs haben drei antiparallele Helices (auch Ha-, Hb- und Hc-Domänen genannt) am N-Terminus. Die variablen N-terminalen Domänen der Qb-, Qc-, und R-SNAREs sind durch eine ovale Form gekennzeichnet. Qbc-SNAREs stellen die kleine Unterfamilie SNAP-25 der SNAREs dar, welche sowohl ein Qb-SNARE-Motiv (hellgrün) als auch ein Qc-SNARE-Motiv (dunkelgrün) besitzen. Diese Motive sind über einen Linker, welcher palmitoyliert werden kann (zick-zack-Linie), miteinander verbunden.

Obwohl zur Bildung eines funktionellen SNARE-Komplexes jeweils ein Qa-, Qb-, Qc- und R-SNARE (kurz: QabcR) beitragen muss, existieren SNARE-Komplexe in fast beliebiger Zusammensetzung. Allen Paarungen gemeinsam ist jedoch, dass die Assoziierung anderer als der funktionellen SNAREs zu keiner stabilen Komplexbildung führt und die Energie, welche zum Überwinden von Membranwiderständen benötigt wird, nicht freigesetzt werden kann, es also zu keiner Vesikelbildung führt (Jahn and Scheller, 2006).

Aus historischen Gründen, basierend auf deren Rolle in der synaptischen Exocytose, spricht man im Falle der Qa-SNAREs auch von Syntaxinen (Bennet et al., 1992). Ebenso werden Vesikel-residente R-SNAREs oft als VAMPs („vesicle-associated membrane proteins“) bezeichnet. R-SNAREs besitzen wiederum entweder eine kurze oder eine lange N-terminale regulatorische Region, was zu einer Subklassifizierung der R-SNAREs in Brevins (lat. „brevis“, kurz) und in Longins (lat. „longus“, lang) führt (Rossi et al., 2004). R-SNARE-Proteine mit einer kurzen N-terminalen Domäne werden aber auch aufgrund ihrer Rolle in der synaptischen Exocytose als Synaptobrevine bezeichnet (Baumert et al., 1989). Diese entwicklungsmäßig junge Klasse von R-SNAREs findet man nicht in Pflanzen. Alle bekannten pflanzlichen R-SNAREs gehören zu der Klasse der Longine (Uemura et al., 2005; Lipka et al., 2007).

Tabelle 1.1: Klassifizierung der SNARE-Proteine der Eukaryonten.

Funktionell (Weber et al., 1998)	v-SNARE		t-SNARE			
			Heavy chain	Light chain		
Strukturell (Fasshauer et al., 1998) (Hong, 2005)	R-SNARE		Qa-SNARE	Qb-SNARE	Qc-SNARE	Qbc-SNARE
	Brevine Synaptobrevin	Longine	Syntaxine			
Pflanzen-spezifisch (Sanderfoot et al., 2000)	VAMPs		Syntaxine (SYP)	Vtip-, Gos1p- und Membrin-ähnliche SNAREs	SNAP25- ähnliche SNAREs	
	-	Longine				

Das Genom aller höheren Pflanzen codiert für ein sehr großes Repertoire von SNAREs: 60 allein in *A. thaliana* (dicotyl), 57 in *Oryza sativa* (Reis; monocotyl) und 69 in *Populus trichocarpa* (amerikanische Balsampappel; dicotyl). Zum Vergleich: in Hefen sind 25 und Säugern 36 verschiedene SNARE-Proteine bekannt (Jahn and Scheller, 2006). Deshalb wurden im Falle der pflanzlichen SNARE-Proteine eine Pflanzen-basierte Nomenklatur erstellt (Sanderfoot et al., 2000; Lipka et al., 2007). Hierbei werden SNAREs in Syntaxine („syntaxins in plants“, SYP), SNAP25-ähnliche SNAREs mit zwei SNARE-Motiven, Vtip-, Gos1p- und Membrin-ähnliche SNAREs, sowie VAMPs eingeteilt (Tabelle 1.1).

1.3.2. Der Mechanismus der SNARE-vermittelten Fusion

Damit die ankommenden Vesikel mit ihrem Zielkompartiment fusionieren können, muss das v-SNARE, welches meist ein R-SNARE darstellt, immer mit den SNAREs der Zielmembranen (t-SNAREs) interagieren und aufgrund der Bündelung der Helices aller beteiligten SNAREs einen SNARE-Komplex bilden (siehe Abb. 1.6). Dieser Komplex wird als *trans*-SNARE-Komplex oder SNAREpin bezeichnet (Weber et al., 1998; Chen and Scheller, 2001). Nur die korrekte Paarung von SNAREs der Zielmembran und des Vesikels ermöglicht eine Konformationsänderung des SNARE-Komplexes von *trans* nach *cis* und setzt die nötige Energie frei um die Verschmelzung von Vesikel- und Zielmembran katalysieren zu können (McNew et al., 2000; Rothman, 2002).

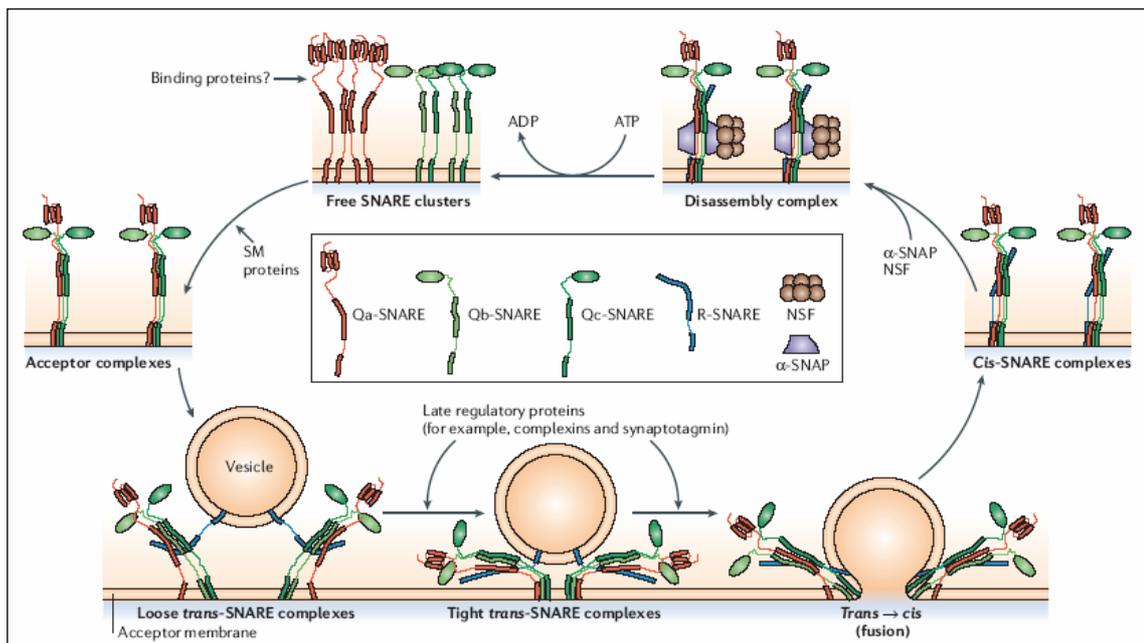


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des SNARE Zyklus während der Fusion (aus Jahn and Scheller, 2006). Damit ein SNARE-Komplex entstehen kann, müssen drei freie, Qabc-SNAREs des Zielkompartiments durch Aktivität eines SM-Proteins („Sec1/Munc18-like proteins“) einen Akzeptor-Komplex bilden. Das v-SNARE interagiert mit diesem Komplex und bildet einen *trans*-SNARE-Komplex, der in lockerer Formation vorliegt. Durch regulatorische Proteine ändert sich die Konformation des SNARE-Komplexes und die Bindung wird fester sodass der Vesikel an die Zielmembran angenähert wird. Durch eine Konformationsänderung des SNARE-Komplexes von *trans* nach *cis* fusioniert der Vesikel anschließend und die Frachtmoleküle werden in das Zielorganell abgegeben. An die verbleibenden *cis*-SNARE-Komplexe binden nun SNAP-Proteine („soluble NSF attachment protein“) und fungieren als Adapterproteine für NSF („N-ethylmaleimide-sensitive factor“), das durch Hydrolyse von ATP die Dissoziation des SNARE-Komplexes in die einzelnen SNARE-Proteine ermöglicht.

Die extreme kinetische und thermodynamische Stabilität des *cis*-SNARE-Komplexes bedeutet, dass dessen Dissoziation nur durch die Aktivität einer spezialisierten Chaperon-Maschinerie erfolgen kann (Fasshauer et al., 1997; Fasshauer et al., 2002). Diese Maschinerie setzt sich aus dem Chaperon NSF („N-ethylmaleimide-sensitive factor“), einem so genannten AAA⁺-Protein

(„ATPases associated with various cellular activities“) und dessen Kofaktor SNAP („soluble NSF attachment protein“) zusammen. Die Bindung von SNAP am *cis*-SNARE-Komplex ermöglicht die Bindung von NSF an den SNARE-Komplex. NSF/SNAP verwendet die Energie der ATP-Hydrolyse, der *cis*-SNARE-Komplex wird aufgelöst und die einzelnen SNARE-Proteine können anschließend recycelt werden (Rothman and Warren, 1994; May et al., 2001). Bevor es zu einer weiteren Verschmelzung von Vesikel und Zielorganell kommen kann, müssen sich drei freie SNAREs zu einem definierten Akzeptor-Komplex zusammenlagern (siehe Abb. 1.6). So genannte SM-Proteine („Sec1/Munc18-like proteins“) kontrollieren und stabilisieren die Bildung des Akzeptor-Komplexes (Jahn and Scheller, 2006). Dieser Komplex besteht meistens aus einem Qa-, Qb-, und Qc-SNARE und stellt wahrscheinlich eine entscheidende Zwischenform zur Bildung des *trans*-SNARE-Komplexes dar (Fiebig et al., 1999; Fasshauer and Margittai, 2004). Nach der Bildung des *trans*-SNARE-Komplexes folgt eine Konformationsänderung innerhalb der SNARE-Proteine. Ausgehend von den N-Termini der SNARE-Motive ziehen sich t- und v-SNAREs in Richtung ihrer C-terminalen Membrananker durch einen Reißverschluss ähnlichen Mechanismus zusammen. Durch diese mechanische Kraft kann die Energiebarriere zwischen den beiden Membranen überwunden werden und es kommt zur Membranfusion. Dieser Schritt wird durch regulatorische Proteine, wie zum Beispiel Synaptotagmine und Connexine, unterstützt (Abb. 1.6). Diese binden an noch nicht vollständig assemblierte *trans*-SNARE-Komplexe und regulieren in einem Kalzium-abhängigen Schritt die Fusion der Membranen (Reim et al., 2001). Ein physikalisch begründetes Modell beschreibt den Prozess der Fusion als eine Abfolge von Interaktionen der einzelnen Lipidschichten biologischer Membranen („Stalk-Hypothese“) (Jahn and Grubmüller, 2002; Chernomordik and Kozlov, 2003). Dieses Modell erklärt zwar die Verschmelzung von Membranen, jedoch ist noch immer unklar wie viele SNARE-Komplexe notwendig sind um die mechanische Kraft zur Verformung der Membranen und der anschließenden Fusion aufzubringen. Es wird vermutet, dass 3 bis 15 SNARE-Komplexe für ein einziges Fusionsereignis ausreichen (Montecucco et al., 2005). Neben der Stalk-Hypothese gibt es noch weitere Modelle, die versuchen die Verschmelzung von Membranen und die Bedeutung von SNARE-Proteinen daran, zu erklären. So wurde die Möglichkeit postuliert, dass vakuoläre H⁺-ATPasen durch Wechselwirkungen ihrer V₀-Untereinheiten Fusionsporen bilden können und die Rolle der SNARE-Proteine lediglich darin besteht die Membranen von Vesikel und Zielkompartiment in räumliche Nähe zu bringen (Mayer, 2002; Hiesinger et al., 2005).

1.3.3. Die Regulation der SNARE-Proteine und deren Sortierung

Obwohl SNARE-Proteine selbstständig in der Lage sind die Fusion von Vesikeln *in vitro* durchzuführen, sind sie nicht die einzigen Faktoren, die eine zielgenaue Fusion *in vivo* gewährleisten. Neben der bereits beschriebenen Aktivität der Chaperon-Maschinerie SNAP/NSF, die das Recycling der SNARE-Proteine und damit auch die Kontinuität der Fusionsvorgänge gewährleistet, sind regulatorische Faktoren, wie SM-Proteine, Ras-GTPasen der Familie der Rab-Proteine sowie „Tethering“-Faktoren ebenfalls sehr wichtig.

SM-Proteine (Sec1/Munc18) interagieren mit nicht konservierten Peptiden des N-Terminus der Qa-SNARE-Proteine, dem so genannten N-terminalen Peptid (NTP), und regulieren somit Konformationsänderungen von Syntaxinen (Gerst et al., 2003). Diese Interaktion kann zum Beispiel dazu führen, dass eine „geschlossene“ Konformation eines Syntaxins aufgelöst wird, sodass dieses in „offener“ Form für andere SNARE-Proteine zugänglich wird. Dadurch sind sie in der Lage die Bildung eines SNARE-Komplexes und damit Fusionsvorgänge zu kontrollieren (Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000; Yang et al., 2000). Das Genom von *A. thaliana* kodiert für 6 Proteine der Sec1-Familie (Sanderfoot and Raikhel, 2003), wovon eines, das so genannte KEULE (KEU), während der Vorgänge der Cytokinese aktiv zu sein scheint (Assaad et al., 2001).

Ras-GTPasen kontrollieren mehrere Schritte des Vesikel-vermittelten Transports, wie das Abschnüren von Vesikeln, Kargo-Selektion, Bewegung, „Tethering“ und das Andocken der Vesikel an die Zielmembran (Deneka et al., 2003). Das Genom von *A. thaliana* kodiert für 57 potentielle Rab-GTPasen, die in 8 Unterfamilien (RabA bis RabH) eingeteilt werden (Sanderfoot and Raikhel, 2003). Obwohl die genauen biologischen Funktionen der meisten pflanzlichen Rab-Proteine noch nicht bekannt sind, konnte gezeigt werden, dass die Rab-Proteine Rha1 und RabE1 entscheidende Rollen im vakuolären Transport und der Exocytose innehaben (Sohn et al., 2003, Zheng et al., 2005). In Hefe- und Säugerzellen interagieren sowohl Rab-, als auch Rho-GTPasen möglicherweise mit einem großen Protein-Komplex, dem so genannten Exocyst-Komplex. Dieser Komplex agiert Organell-spezifisch als ein „Tethering“-Komplex und leitet das Andocken der Vesikel an die Zielmembran ein, agiert daher im Fusionsprozess zeitlich vor den SNARE-Proteinen und assoziierten Proteinen (Elias et al., 2003). In *A. thaliana* gibt es zu allen Untereinheiten des Exocysten jeweils Pflanzen-homologe Proteine, was höchstwahrscheinlich auf eine konservierte Funktion in Pflanzen zurückzuführen ist (Elias et al., 2003).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass SNARE-Proteine in Form von inhibitorischen SNAREs (i-SNAREs) die Spezifität der Membranfusion regulieren können, indem sie fusionsunfähige Komplexe eingehen. Entsteht ein Ungleichgewicht im Konzentrationsverhältnis der verschiedenen SNARE-Proteine an der Zielmembran, so können untypische t-SNARE-Komplexe gebildet werden, die nicht mehr mit dem v-SNARE interagieren und somit eine Fusion verhindern (Varlamov et al., 2004).

Nur eine exakte subzelluläre Lokalisierung von SNARE-Proteinen und deren regulatorischer Kofaktoren kann die Spezifität intrazellulärer Transportvorgänge gewährleisten. Aus diesem Grund muss jedes Kompartiment mit einem passenden Satz an SNARE-Proteinen versehen sein. Nach erfolgter Fusion müssen die am Vesikel lokalisierten SNARE-Proteine wieder zurück in ihr Donor-Kompartiment transportiert werden. Daher können sich SNARE-Proteine auch in mehreren Kompartimenten befinden und nur unter Gleichgewichtsbedingungen in einer charakteristischen Verteilung vorliegen (Hay et al., 1998). Zweifellos haben akzessorische Proteine, die an freie SNARE-Proteine binden, eine Rolle in der Lokalisation und Sortierung der SNAREs inne. Jedoch, obwohl die cytosolische Domäne mancher SNARE-Proteine essentiell für deren korrekte Sortierung sein kann (West et al., 1997; Zeng et al., 2003), konnten bisher noch keine definierten Sortierungssignale definiert werden.

1.3.4. Die SNARE-Proteine des frühen sekretorischen Transportweg

In Hefen (*S. cerevisiae*) konnten 4 SNARE-Proteine identifiziert werden, die am anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt sind. Das Qa-SNARE Sed5p ist am Golgi-Apparat lokalisiert und bildet am *cis*-Golgi den t-SNARE-Komplex mit dem Qb-SNARE Bos1p und dem R-SNARE Sec22p aus. Dieser trimäre Komplex interagiert mit dem Qc-SNARE Bet1p, das in COPII-Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat transportiert wird und reguliert somit die Fusion von COPII-Vesikeln an die *cis*-Golgi-Membran (Newman et al., 1990; Hardwick and Pelham, 1992; Sacher et al., 1997; Parlati et al., 2002). Befindet sich die Verteilung im Gleichgewicht („steady state“), so befinden sich Sed5p, Bos1p und Bet1p hauptsächlich im Golgi-Apparat, während Sec22p sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Burri and Lithgow, 2004). Der SNARE-Komplex, der am retrograden Transport zum ER beteiligt ist, besteht aus dem Qa-SNARE Ufe1p, das mit Sec20p, Tip20p, Use1p und dem R-SNARE Sec22p interagiert (Lewis et al., 1997; Burri et al., 2003; Dilcher et al., 2003).

Das R-SNARE Sec22p nimmt, im Gegensatz zum anterograden Transport, im retrograden Transport höchstwahrscheinlich die Rolle des v-SNAREs ein (Ballensiefen et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die SNARE-Proteine zwischen dem ER und Golgi-Apparat zyklieren und sowohl in COPI- als auch in COPII-Vesikel vorkommen (Matsuoka et al., 1998; Spang and Schekman, 1998; Pelham, 1999; Liu and Barlowe, 2002). Dabei ist es von Bedeutung, in welcher Form die SNARE-Proteine transportiert werden. Bet 1p und Sec22p müssen als freie SNAREs vorliegen um mit dem Sec24-Hüllprotein (Kap. 1.2.2) interagieren zu können. Das COPII-Bindemotiv (LxxLE) von Bet1p ist nur dann in der Lage an Sec24 zu binden, wenn es als Monomer vorliegt (Mossessova et al., 2003). Im Falle des Longins Sec22p kann dieses nur in COPII-Vesikel aufgenommen werden, wenn die N-terminale Longin-Domäne (Gonzalez et al., 2001) mit dem SNARE-Motiv im gleichen Molekül interagieren kann. Es muss daher ebenfalls als Monomer vorliegen, sodass es diese Konformation einnehmen kann (Liu et al.,

2004; Mancias and Goldberg, 2007). Das Vorliegen freier SNARE-Proteine ist, wie bereits erwähnt, die Konsequenz der SNAP und NSF Aktivität am ER und am Golgi-Apparat (Mancias and Goldberg, 2007).

Das Qa-SNARE Sed5p besitzt zwei COPII-Bindestellen. Das LxxME-Motiv bindet an die sogenannte „B-site“ des Sec24-Hüllproteins und ein weiteres Motiv (YNN SNP) bindet an die „A-site“ von Sec24 (Mossessova et al., 2003). Beide Motive sind auch in einer „geschlossenen“ Konformation von Sed5p zugänglich. Des Weiteren ist es möglich, dass die Motive in einem assemblierten t-SNARE-Komplex ebenfalls an Sec24 binden können (Mossessova et al., 2003). Somit ist gewährleistet, dass Bos1p, das keine direkte COPII-Bindungsstelle aufweist, in assemblierter Form zusammen mit Sed5p zum *cis*-Golgi transportiert werden kann.

Ein weiterer regulatorischer Schritt der Fusion von COPII-Vesikeln an die *cis*-Golgi-Membran scheint die Bindung des SM-Proteins Sly1 an das N-terminale Peptid (NTP) von Sed5p zu sein (Grabowski and Gallwitz, 1997; Bracher and Weissenhorn, 2002; Kosodo et al., 2002; Peng and Gallwitz, 2002; 2004; Li et al., 2005). Auch in Säugern scheint die Bindung von Sly1 an das homologe Qa-SNARE Syntaxin5 die Bildung des t-SNARE-Komplexes am *cis*-Golgi voranzutreiben (Dascher and Balch, 1996; Williams et al., 2004).

Die Tatsache, dass das Genom von *A. thaliana* für eine höhere Zahl an SNARE-Proteinen kodiert, als das Genom von Hefen und Säugern, spricht für eine größere SNARE-vermittelte Diversität zellulärer Funktionen in Pflanzen (Surpin and Raikhel, 2004). Bis heute ist die Lokalisation von 15 SNARE-Proteinen im frühen sekretorischen Weg bekannt. Davon sind 9 im Golgi-Apparat und 6 im ER lokalisiert (Uemura et al., 2004; Moreau et al., 2007; Lipka et al., 2007). Darunter befinden sich auch die homologen SNARE-Proteine, die für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat in Hefen verantwortlich sind: Das Qa-SNARE AtSYP31 (Sed5p), das Qb-SNARE AtMEMB11 (Bos1p), das Qc-SNARE AtBS14 (Bet1p) und das R-SNARE AtSEC22 (Sec22p). Über die Funktionalität dieser SNARE-Proteine in Pflanzen ist kaum etwas bekannt. In Untersuchungen von Chatre et al. (2005) wurden XFP-SNARE-Proteine von SYP31, MEMB11, BS14 und SEC22 mittels transienter Expressionsstudien in Tabakblättern getestet. Daraus geht hervor, dass SYP31, MEMB11 und BS14 im Golgi-Apparat und SEC22 im Golgi-Apparat und im ER lokalisiert werden. Die Überexpression dieser SNARE-Proteine führte zur Retention eines sekretorischen Marker-Proteins (secYFP) im ER. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SEC22 und MEMB11 zu einer Umverteilung koexprimierter Golgi-Marker in das ER führte (Chatre et al., 2005). Damit wies man erstmals auf die Bedeutung der SNARE-Proteine im frühen sekretorischen Weg der Pflanze hin. Diese Studien beruhen allerdings ausschließlich auf fluoreszenzmikroskopischen Daten. Daher bedarf es weiterer quantitativer Daten und Interaktionsstudien um die Rolle dieser SNARE-Proteine im frühen sekretorischen Transportweg der Pflanzen zu verstehen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es erste Einblicke in die molekularen Eigenschaften der pflanzlichen SNARE-Proteine des ER-Golgi-Transports zu gewinnen und somit zum Verständnis der Funktion dieser SNAREs in der Pflanzenzelle beizutragen. Während in Hefen und Säugern die SNARE-Proteine des ER-Golgi-Transports sowohl strukturell als auch funktionell intensiv untersucht worden sind und es dadurch gelungen ist eine Vorstellung der verschiedenen Interaktionen dieser SNARE-Proteine wie auch deren Regulation und Lokalisierung zu entwickeln, war in Pflanzen bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit nur sehr wenig über die SNARE-Proteine des frühen sekretorischen Wegs bekannt. Die Identifizierung einer großen Anzahl von SNARE-kodierenden Genen im Genom von *A. thaliana* ließ bereits annehmen, dass die SNARE-Proteine auch in Pflanzen von großer Bedeutung sind (Sanderfoot et al., 2000). Um eine möglichst große Homologie zwischen den Genomsequenzen von *A. thaliana* und der Untersuchungspflanze *N. tabacum* zu gewährleisten wurden Sequenzdaten aus *L. esculentum* für die Experimente verwendet.

Die Untersuchung der einzelnen SNARE-Proteine LeBos1, LeBet1 und LeSec22 sollte in einem *in vivo* Versuchssystem mit *N. tabacum* Protoplasten (Phillipson et al. 2001) durchgeführt werden. Dabei sollte vor allem die Selektivität der SNARE-vermittelten Fusion durch einen Nachweis sekretierter und retenierter Reporterproteine quantitativ untersucht werden. Des Weiteren sollte die Beteiligung der einzelnen Domänen der SNARE-Proteine, die im Falle der homologen Proteine aus Hefen und Säugern regulatorische Funktionen innehaben, charakterisiert werden. Für die Analyse der intrazellulären Lokalisierung der SNARE-Proteine und zur Visualisierung der quantitativen Daten, werden konfokalmikroskopische Studien mit XFP-Fusionsproteinen eingesetzt. Insbesondere steht hier die Charakterisierung und Lokalisierung des Qa-SNAREs LeSed5 im Vordergrund. Dabei werden wie bei LeBos1, LeBet1 und LeSec22 auch zunächst quantitative *in vivo* Studien mit verschiedenen Deletionsmutanten und dem Wildtyp als auch mit Fusionsproteinen durchgeführt um die Funktion der einzelnen Domänen zu untersuchen. Lokalisationsstudien am CLSM sollen mit Einsatz verschiedener Markerproteine Aufschluss über die genaue Lokalisation von LeSed5 im frühen sekretorischen Weg geben. Sowohl bei quantitativen Enzymtests als auch bei den Lokalisationsstudien sollen Zeitreihen einen möglichen Effekt auf den frühen sekretorischen Effekt aufzeigen. Eine weitergehende Charakterisierung des Qa-SNAREs auf ultrastruktureller Ebene erforderte zusätzlich die Herstellung eines Antikörpers gegen das SNARE-Protein und einer transgenen Zelllinie.

2. Ergebnisse

2.1. Identifizierung von SNAREs des frühen sekretorischen Wegs aus *L. esculentum* (Tomate)

Im Rahmen des Arabidopsis-Genom-Projekts wurden in *A. thaliana* für alle SNARE-Proteine, welche in Hefe- und Säugerzellen die Fusion von COPII-Vesikeln mit der *cis*-Golgi Membran regulieren, codierende Sequenzhomologe identifiziert. Die SNARE-Proteine werden entsprechend der Nomenklatur nach Sanderfoot et al. (2000) als AtSYP31 (Qa-SNARE), AtMEMB11 (Qb-SNARE), AtBS14 (Qc-SNARE) und AtSEC22 (R-SNARE) bezeichnet. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung und Lokalisierung dieser SNARE-Proteine in *Nicotiana tabacum* (Tabak). Sowohl *N. tabacum* als auch *Lycopersicon esculentum* (Tomate) gehören zu der Familie der Solanaceae. Um die höchst mögliche Homologie zwischen dem Organismus Tabak und den für die SNARE-Proteine verfügbaren Sequenzen zu finden, wurden die homologen Proteinsequenzen aus der Tomatendatenbank des „sol genomic networks“ ermittelt und die jeweiligen EST-Klone angefordert. Die für diese Arbeit relevanten Proteinsequenzen aus *Lycopersicon esculentum*, hier bezeichnet als Le, wurden in Analogie zu den SNARE-Proteinen aus Hefe als LeSed5, LeBos1, LeBet1 und LeSec22 bezeichnet. Die Proteinsequenzen wurden mit ClustalW-Alignment auf Ähnlichkeit und Identität innerhalb der Aminosäureabfolgen analysiert und das Ergebnis in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Sequenzvergleich der SNARE-Proteine aus *L. esculentum* und den jeweiligen homologen SNARE-Proteinen aus *A. thaliana*, *S. cerevisiae* (Hefe) und *H. sapiens* (Säugetern) in Bezug auf Ähnlichkeit und Identität. Die jeweiligen Gen Accession Nummern sind in Klammern aufgeführt.

<i>L. esculentum</i>	<i>A. thaliana</i> Ähnlichkeit [%] (Identität [%])	<i>S. cerevisiae</i> Ähnlichkeit [%] (Identität [%])	<i>H. sapiens</i> Ähnlichkeit [%] (Identität [%])
LeSed5 (AW222275)	AtSYP31 (At5g05760) (NP_196195) 64% (46%)	Sed5p (NP_013126.1) 50% (32%)	Syntaxin 5 (NP_003155) 49% (36%)
LeBos1 (BG130394)	AtMEMB11 (At2g36900) (NP_181227) 79% (60%)	Bos1p (NP_013179.1) 38% (18%)	GOSR2A (NP_004278) 45% (27%)
LeBet1 (AW033981)	AtBS14a (At3g58170) (NP_191376) 70% (52%)	Bet1p (NP_0122621.1) 42% (18%)	BET1 (NP_005859) 51% (27%)
LeSec22 (BG123258)	AtSEC22 (At1g11890.1) (NP_172653.1) 94% (90%)	Sec22p (NP_013370.1) 59% (39%)	SEC22B (NP_004883.2) 64% (46%)

Zwischen den jeweiligen Proteinsequenzen der SNARE-Proteine aus *L. esculentum* und aus *A. thaliana* besteht die höchste Ähnlichkeit von 94% zwischen den R-SNAREs LeSec22 und AtSEC22 (Identität: 90%), und die niedrigste Ähnlichkeit von 64% zwischen den Qa-SNAREs LeSed5 und AtSYP31 (Identität: 46%). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ähnlichkeit und Identität der Proteinsequenzen zwischen den SNARE-Proteinen in höheren Pflanzen

(*L. esculentum* und *A. thaliana*) grundsätzlich höher ist, als die zwischen den Proteinen aus höheren Pflanzen und denen aus Hefen (*S. cerevisiae*) bzw. Säugern (*H. sapiens*).

Durch die Suche in der Conserved Domain Database (CDD) des NCBI Webportals wurden die charakteristischen Domänen innerhalb der SNARE-Proteinsequenzen aus *L. esculentum* identifiziert. Bei diesen handelte es sich zum einen um das, bei allen in dieser Arbeit verwendeten SNARE-Proteinen vorkommende SNARE-Motiv (Weimbs et al., 1997; Fasshauer et al., 1998), welches eine hoch konservierte Domäne in der Familie der SNARE-Proteine darstellt, sowie zum anderen um eine Syntaxin-Domäne (Teng et al., 2001), auch Habc-Domäne genannt, in LeSed5, oder eine Longin-Domäne in LeSec22 (Filippini et al., 2001; Rossi et al., 2004).

In Abbildung 2.1 ist eine Analyse des Sequenzvergleichs, welcher mit dem Programm „ClustalW“ durchgeführt wurde, von dem hier speziell untersuchten LeSed5 und den homologen Qa-SNAREs in *A. thaliana* (AtSYP31), *S. cerevisiae* (Sed5p) und *H. sapiens* (Syntaxin 5) dargestellt. Die charakteristischen Domänen der Qa-SNAREs (Hong, 2005), wie die N-terminale cytosolische Domäne, bestehend aus dem N-terminalen Peptid (NTP), den drei Subdomänen Ha, Hb und Hc und dem SNARE-Motiv, als auch die kurze Transmembrandomäne (TMD) konnten identifiziert werden und weisen an den entscheidenden Positionen eine sehr hohe Ähnlichkeit in der Aminosäureabfolge auf.

Die im N-terminalen Peptid befindlichen Bindungsstellen für das SM-Protein Sly1 (¹²D – ¹⁷F) (Bracher and Weissenhorn, 2002; Yamaguchi et al., 2002; Dulubova et al., 2003) sind hoch konserviert (Abb. 2.1B). Die Aminosäuren innerhalb des erwähnten SNARE-Motivs weisen auf eine hohe Konservierung hin. So ist die Aminosäure Glutamin (Q), die sich im so genannten „zero layer“ des SNARE-Motivs befindet und zur Subklassifizierung innerhalb der SNARE-Proteine (Fasshauer et al., 1998) beiträgt, in allen Sed5 Homologen absolut identisch. Die aus nur 26 Aminosäuren bestehende Transmembrandomäne von LeSed5 ist den Homologen aus Hefe, Säugern und *A. thaliana* ebenfalls sehr ähnlich.

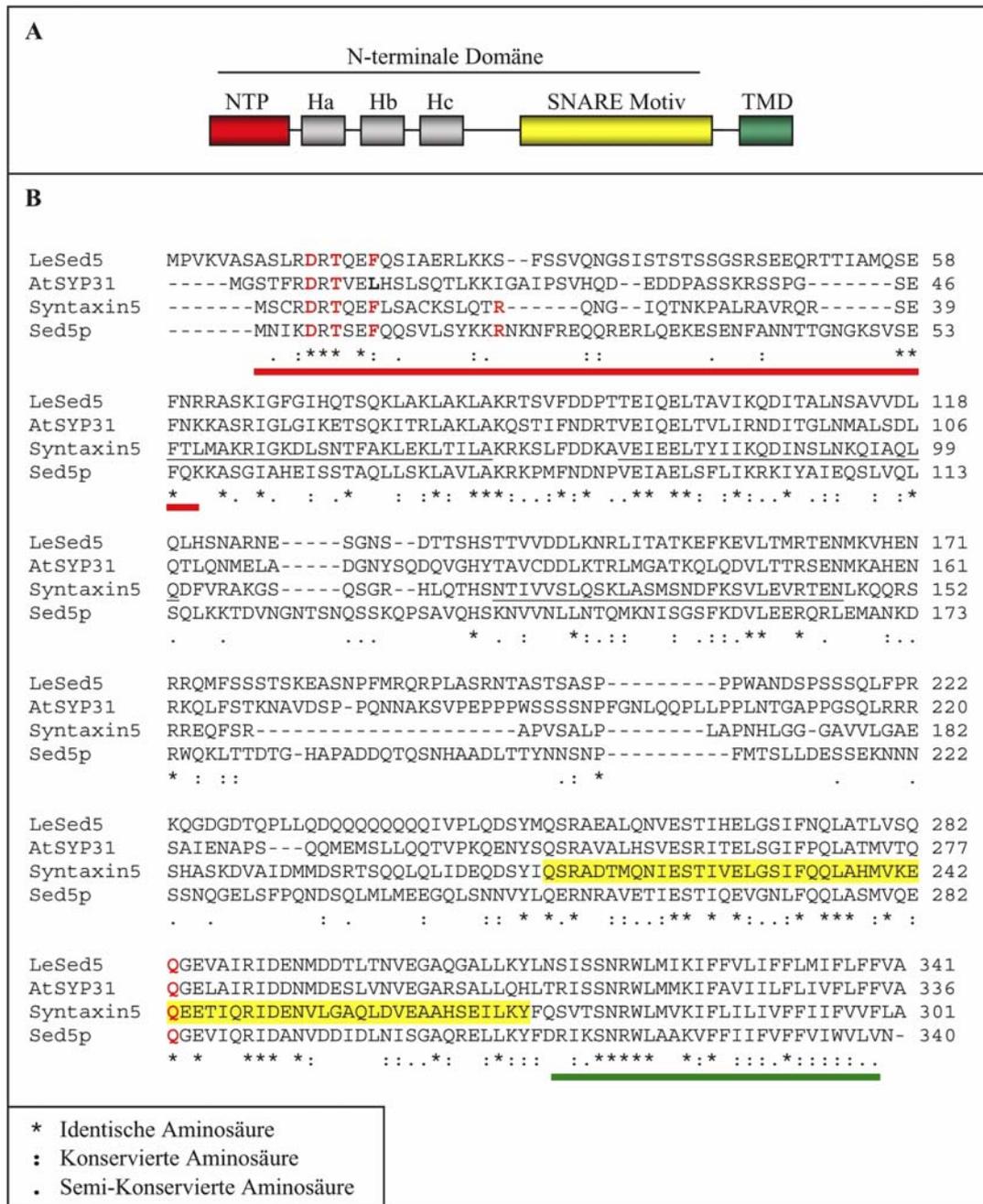


Abb. 2.1: **A** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von LeSed5. Das Protein besteht aus einer C-terminalen Transmembrandomäne (TMD, grün dargestellt) und einer N-terminalen cytosolischen Domäne, welche das konservierte SNARE-Motiv (gelb), die drei Subdomänen Ha, Hb und Hc (grau) und das N-terminale Peptid (NTP, rot) enthält. **B** Sequenzvergleich von LeSed5 und den homologen SNARE-Proteinen in *A. thaliana* (AtSYP31), *H. sapiens* (Syntaxin 5) und *S. cerevisiae* (Sed5p). Untereinander sind die Proteinsequenzen der verschiedenen Organismen dargestellt. Das SNARE-Motiv ist gelb unterlegt, das NTP ist rot und die TMD grün unterstrichen. Die entscheidenden Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die Subdomänen Ha, Hb und Hc sind unterstrichen. Die Abbildung wurde mit dem Programm „ClustalW“ erstellt.

Wie hoch die Ähnlichkeit der in dieser Arbeit verwendeten SNARE-Proteine ist, lässt sich bei der beispielhaften Betrachtung eines Proteinsequenz Alignments des hoch konservierten SNARE-Motivs der jeweiligen Qb-, Qc- und R-SNAREs verstehen. In Abbildung 2.2 B sind die

Aminosäuren der 16 Ebenen, welche wie in der Einleitung beschrieben zur Stabilität der SNARE-Fibrille beitragen, am Beispiel der SNARE-Proteine von *H. sapiens* (GOSR2A, BET1 und SEC22B) blau und unterstrichen dargestellt. Die Aminosäure der innersten Ebene, des so genannten „zero layers“, ist rot markiert.

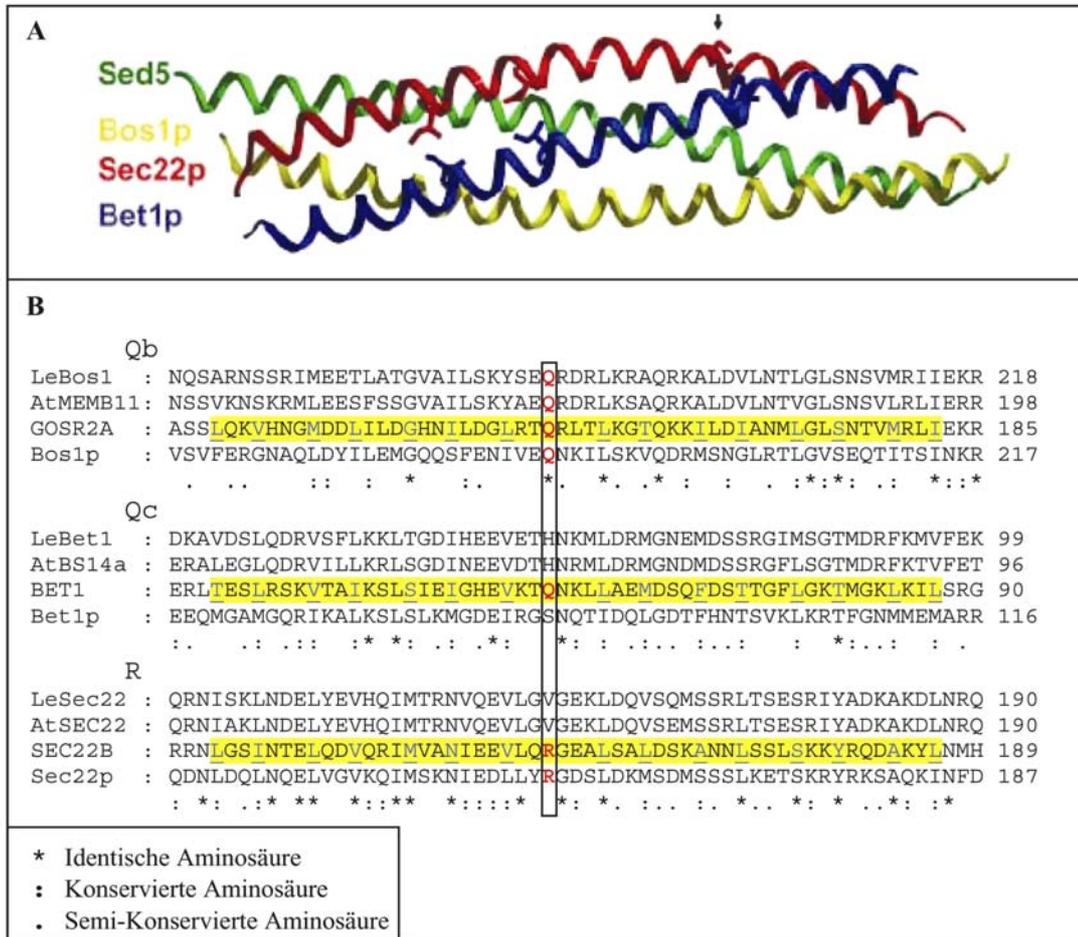


Abb. 2.2: **A** Darstellung eines Modells des ER-Golgi-SNARE-Komplexes aus *S. cerevisiae* (Flanagan and Barlowe, 2006). **B** Sequenzvergleich der SNARE Motive der Qb-, Qc- und R-SNARE Proteine aus *L. esculentum* und den Homologen aus *A. thaliana* (AtMEMB11, AtBS14a und AtSEC22), *H. sapiens* (GOSR2A, BET1 und SEC22B) und *S. cerevisiae* (Bos1p, Bet1p und Sec22p). Untereinander sind die Proteinsequenzen der verschiedenen Organismen dargestellt. Das SNARE-Motiv der jeweiligen SNARE-Proteine aus *H. sapiens* ist gelb unterlegt. Die interagierenden Aminosäuren sind blau und unterstrichen dargestellt und die entscheidenden Aminosäuren des „zero layers“ sind rot hervorgehoben oder in der schwarzen Box markiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm „ClustalW“ erstellt.

Die zentrale Aminosäure des „zero layers“ der Qb-SNAREs (LeBos1, AtMEMB11, GOSR2A und Bos1p) ist identisch, wohingegen die zentrale Aminosäure der Vertreter der anderen beiden Proteinfamilien, Qc (LeBet1, AtBS14a, BET1 und Bet1p) und R (LeSec22, AtSEC22, SEC22B und Sec22p), nicht konserviert ist. Die zentrale Aminosäure ist aber innerhalb der jeweiligen SNARE-Proteine aus höheren Pflanzen (*L. esculentum* und *A. thaliana*) identisch (siehe Abb. 2.2B). Die anderen Aminosäuren der 16 Interaktionsebenen der SNARE-Motive zwischen den Vertretern der Qc- und R-SNAREs sind bis auf eine Ausnahme identisch oder konserviert.

2.2. Einfluss der ER-Golgi-SNARE-Proteine auf den frühen sekretorischen Weg *in vivo*

Der Einfluss und die Relevanz von Proteinen auf die verschiedenen Prozesse des sekretorischen Wegs können mittels transienter Genexpressionsstudien in Pflanzenzellen untersucht werden. Um den Effekt von SNARE-Proteinen auf den frühen sekretorischen Weg zwischen ER und Golgi-Apparat quantitativ darzustellen, wurde α -Amylase aus *H. vulgare* (Gerste) als Reporterprotein transient exprimiert. Die α -Amylase ist ein in der Pflanze natürlich vorkommendes Protein, das den sekretorischen Weg durchläuft, vollständig sekretiert wird und aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität mit sehr hoher Empfindlichkeit quantifiziert werden kann (Phillipson et al., 2001). Die Sekretion der α -Amylase wird als Sekretionsindex angegeben, welcher den Quotienten aus der Aktivität von sekretiertem und zellulärem Reporterprotein darstellt (Pimpl and Denecke, 2002; Yang et al., 2005; Foresti et al., 2006). Zur funktionellen Charakterisierung der SNARE-Proteine LeBet1, LeSec22, LeBos1 und LeSed5 im frühen sekretorischen Weg wurde deren Einfluss auf die Sekretionsrate der α -Amylase sowohl mit den jeweiligen Wildtyp-Proteinen als auch mit HA- und XFP-Fusionsproteinen untersucht. Anhand des HA-Epitops am N-Terminus der SNARE-Proteine konnte deren Expression in Protoplasten aus *N. tabacum* mittels Western-Blot-Analysen mit einem anti-HA Antikörper überprüft werden. Des Weiteren wurden Lokalisierungsstudien der XFP-Fusionsproteine in *N. tabacum* am CLSM durchgeführt und die jeweiligen Effekte mit Hilfe von Markerproteinen visualisiert.

2.2.1. Klonieren der ER-Golgi-SNAREs und deren Derivate für Expressionsstudien *in vivo*

Zur experimentellen Untersuchung und funktionellen Charakterisierung der vier ER-Golgi-SNARE-Proteine aus *L. esculentum* wurden zunächst deren Gene in Expressionsvektoren zwischen den Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S-Promotor und den NOS-Terminator kloniert. Expressionsstudien mit dem Plasmamembran-Syntaxin NtSYR1 zeigten, dass die Überexpression der cytosolischen Domäne SP2 zu einer Inhibition der Sekretion führte, wohingegen die Koexpression des Wildtyp-Proteins diesen Effekt verringerte (Geelen et al., 2002). Gegensätzliche Ergebnisse traten bei der Expression des Syntaxins des Prävakuolären Kompartiments SYP21 aus Arabidopsis (AtSYP21) auf. Hier wurde zum einen gezeigt, dass es bei Überexpression des Wildtyp-Proteins und nicht des cytosolischen Derivats zu einer Inhibition des Transports zur Vakuole kommt (Foresti et al., 2006). Kürzlich erstellte Studien (Tyrrell et al., 2007) zeigten aber, dass das cytosolische Fragment von SYP21 den Transport von Membran-gebundenen Reporterproteinen zum Tonoplasten inhibiert. Beide Syntaxine findet man in SNARE-Komplexen des späten sekretorischen Wegs. Um Einblicke in die Fusionsmaschinerie des frühen sekretorischen Weges zu erhalten, wurden mehrere chimäre Deletionskonstrukte der

vier ER-Golgi-SNAREs hergestellt (Abb. 2.3).

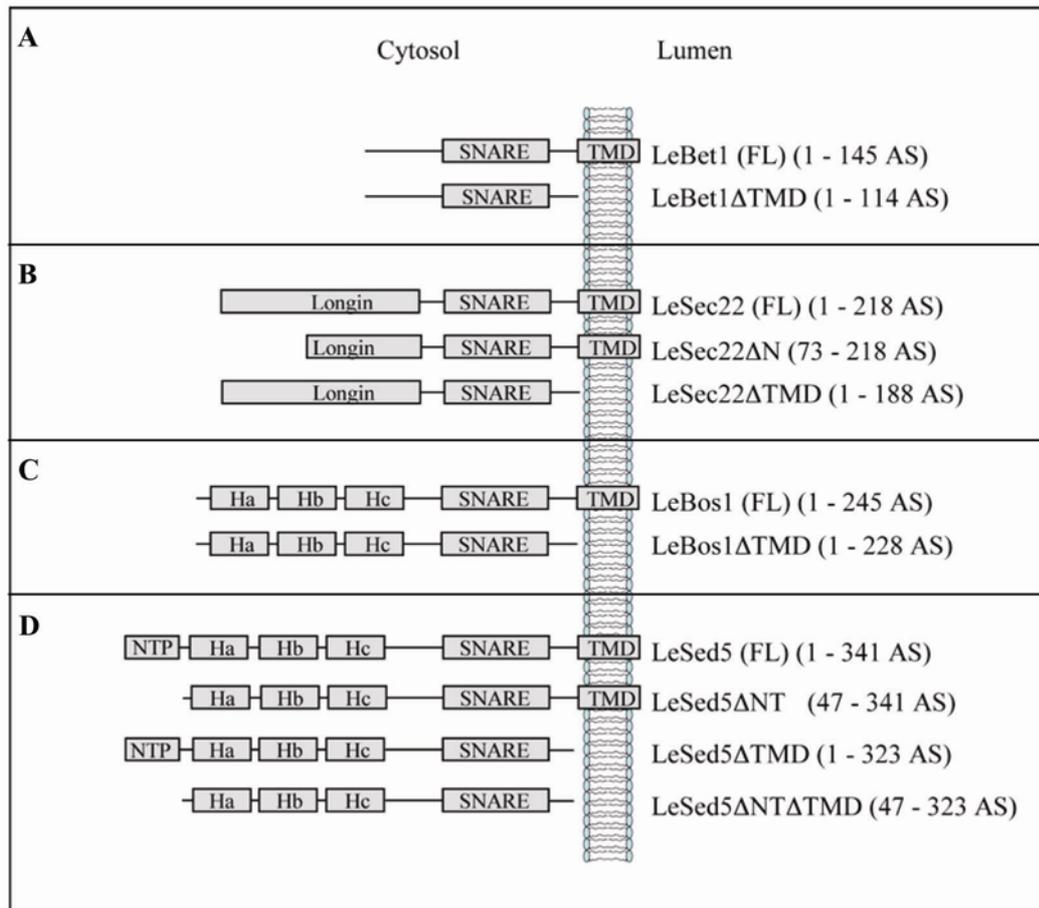


Abb. 2.3: Schematische Übersicht der ER-Golgi-SNARE-Proteine und deren Deletionsmutanten. **A** Darstellung der Domänenstruktur des Qc-SNAREs LeBet1, bestehend aus 145 Aminosäuren, und dessen cytosolische Mutante LeBet1ΔTMD, ohne die Transmembrandomäne. **B** Darstellung des aus 218 Aminosäuren bestehende R-SNAREs LeSec22 und dessen Derivate. Die Longin-Domäne von LeSec22ΔN wurde um den N-terminalen Teil der Longin-Domäne verkürzt. Beim cytosolischen Protein LeSec22ΔTMD wurde auf die Transmembrandomäne (TMD) verzichtet. **C** Dargestellt sind das Qb-SNARE LeBos1, mit einer Länge von 341 Aminosäuren, und dessen cytosolisches Derivat LeBos1ΔTMD. **D** Übersicht über die verschiedenen Proteine des Qa-SNAREs LeSed5. Das Wildtyp-Protein LeSed5 besteht aus 241 Aminosäuren, das Protein LeSed5ΔNT wurde N-terminal um 46 Aminosäuren verkürzt. Bei den beiden cytosolischen Mutanten LeSed5ΔTMD und LeSed5ΔNTΔTMD wurde auf die C-terminale Transmembrandomäne bzw. auf das N-terminale Peptid verzichtet. (SNARE = SNARE-Motiv; TMD = Transmembrandomäne; Longin = Longin-Domäne; NTP = N-terminales Peptid; AS = Aminosäure)

Das Qc-SNARE LeBet1 ist mit 145 Aminosäuren das kleinste ER-Golgi-SNARE. In Hefen fungiert Bet1p als v-SNARE, enthält eine Sec24-Bindungsstelle, wird somit in COPII Vesikel verpackt (Mossesso et al., 2003) und ist als Monomer vollständig unstrukturiert (Fiebig et al., 1999). Zur Expression des Wildtyp-SNARE-Proteins und dessen cytosolischen Derivats wurden jeweils die Konstrukte LeBet1 (FL) und LeBet1ΔTMD hergestellt (Abb. 2.3 A).

Das als Qb-SNARE klassifizierte LeBos1 weist N-terminal eine globuläre Habc-ähnliche Domäne auf. Das homologe Protein aus Hefe (Bos1p) dient als leichte Kette innerhalb des

t-SNARE-Komplexes, welcher *cis*-Golgi lokalisiert ist. Es beinhaltet keine COPII-Bindungsstelle und wird daher vermutlich als Teil des t-SNARE-Komplexes zusammen mit Sec22p und Sed5p, welche dagegen jeweils Sec24-Bindungsstellen aufweisen, aus dem ER exportiert (Miller et al., 2002; Mossessoova et al., 2003). Auch hierzu wurde jeweils das Wildtyp-Protein LeBos1 (FL) und das cytosolische Derivat LeBos1 Δ TMD angefertigt (Abb. 2.3 C). Alle R-SNAREs in Pflanzen werden auch als so genannte „Longins“ bezeichnet und bestehen aus einem verlängerten N-terminalen Bereich, der Longin-Domäne. Diese Domäne kann, basierend auf Daten von humanen R-SNAREs, in die subzelluläre Lokalisation und SNARE-Komplex-Formation involviert sein, wie zum Beispiel durch Interaktion mit regulatorischen Polypeptiden (Martinez-Arca et al., 2003; Uemura et al., 2004). In Hefen agiert das R-SNARE Sec22p sowohl im anterograden als auch im retrograden Transport und zyklisiert zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. Über die biologische Rolle des pflanzlichen Homologs von Sec22 ist bis dato noch wenig bekannt. Es wurde auch kein Phänotyp in *Arabidopsis*-Sec22-Mutanten gefunden, was darauf hindeutet, dass dieses SNARE-Protein zumindest teilweise redundant interagiert (Lipka et al., 2007). Der N-Terminus des R-SNAREs LeSec22 besteht ebenfalls aus einer Longin-Domäne. In dieser Arbeit wurden sowohl das Wildtyp SNARE-Protein LeSec22 (FL), als auch deren N- und C-terminalen Deletionsmutanten LeSec22 Δ N und LeSec22 Δ TMD untersucht (Abb. 2.3 B).

Das Syntaxin LeSed5 ist mit 341 Aminosäuren das größte SNARE-Protein des am ER-Golgi-Transport beteiligten SNARE-Komplexes in *L. esculentum*. Ebenso wie in Hefen und Säugern gehören die Syntaxine zu den am meisten untersuchten pflanzlichen SNARE-Proteinen. Das Syntaxin-SNARE, welches bei der Fusion von COPII-Vesikeln mit der *cis*-Golgi-Membran in Hefen bzw. Säugern eine wichtige Rolle spielt, ist das Qa-SNARE Sed5p bzw. Syntaxin 5 (Hardwick and Pelham, 1992; Dascher and Balch, 1996). Die große cytosolische N-terminale Region dieser SNARE-Proteine hat regulatorische Funktionen inne. Sly1, ein Vertreter der Sec1/Munc18 (SM) Proteinfamilie, bindet an das konservierte N-terminale Peptid von Sed5p bzw. Syntaxin 5 und stimuliert dadurch die Interaktion des SNAREs zur Ausbildung des *trans*-SNARE-Komplexes am *cis*-Golgi (Peng and Gallwitz, 2002; Yamaguchi et al., 2002). Auch die Transmembrandomäne (TMD) der SNARE-Proteine scheint eine wichtige Rolle beim Fusionsprozess einzunehmen. Wird diese ersetzt oder ein kurzer Peptid-Linker zwischen das SNARE-Motiv und die TMD inseriert, kann der finale Schritt der Membranfusion blockiert oder negativ beeinträchtigt werden (McNew et al., 1999; McNew et al., 2000). Daher wurden zur Expression des Wildtyp SNARE-Proteins und dessen cytosolischem Fragment die jeweiligen Konstrukte LeSNARE (FL) und LeSNARE Δ TMD hergestellt. Zur Expression N-terminaler Deletionsmutanten von LeSed5 wurden die Konstrukte LeSed5 Δ NT und LeSed5 Δ NT Δ TMD hergestellt (Abb. 2.3 D).

2.3. Die Überexpression des v-SNAREs LeBet1 hat keinen Effekt auf den sekretorischen Weg

Mittels transients Genexpressionsstudien in Tabak-Protoplasten wurde der Einfluss der Überproduktion von LeBet1 und dessen cytosolischer Mutante auf die Sekretion von α -Amylase untersucht. Nach Fluoreszenzstudien von Uemura et al. (2004) in Protoplasten von *A. thaliana* Zellsuspensionskulturen ist das homologe SNARE-Protein aus *A. thaliana* AtBS14a *trans*-Golgi lokalisiert. Um die genaue Lokalisierung von LeBet1 festzustellen, wurden sowohl Tabak-Protoplasten als auch BY-2 Zellsuspensionskulturen mit YFP-LeBet1 transfiziert.

2.3.1. Funktionsnachweis mittels quantitativen Tests (α -Amylase)

Im Zuge der transienten Genexpression in Tabak-Protoplasten zur quantitativen Analyse der Sekretion von α -Amylase wurden eine konstante Menge an α -Amylase kodierenden Plasmids sowie steigende Konzentrationen von 1-20 μ g der HA-LeBet1 kodierenden Plasmide in Protoplasten koelektroporiert. Als Kontrolle diente eine Transfektion mit dem α -Amylase kodierendem Plasmid alleine. Nach 24 h Inkubation bei 25°C wurden die α -Amylase-Aktivitäten des Kulturmediums und der Zellen analysiert und photometrisch bestimmt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. Zur Überprüfung der Expression von HA-LeBet1 und HA-LeBet1 Δ TMD wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen der Protoplasten mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper durchgeführt.

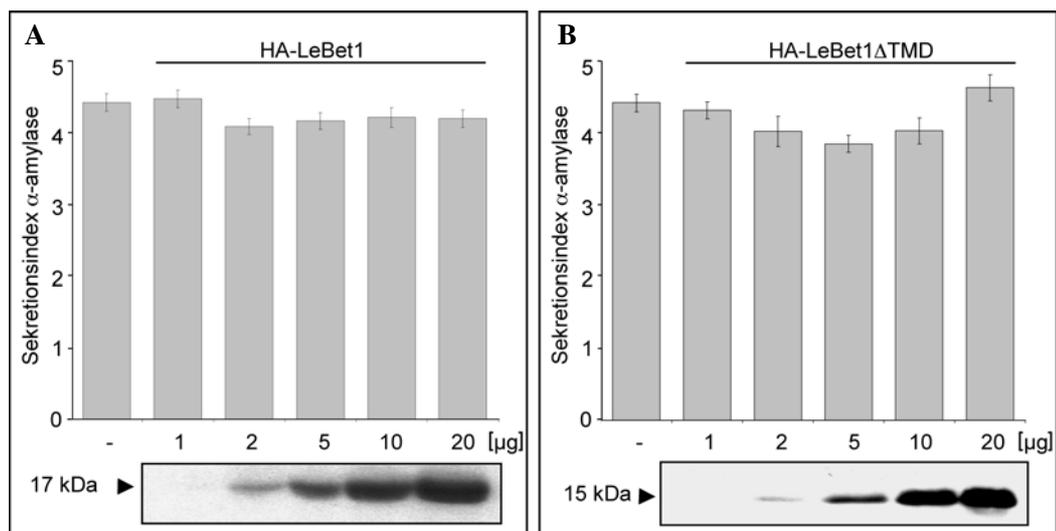


Abb. 2.4: Einfluss von HA-LeBet1 (A) und HA-LeBet1 Δ TMD (B) auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das HA-LeBet1 bzw. HA-LeBet1 Δ TMD kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g HA-LeBet1 bzw. HA-LeBet1 Δ TMD Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-6). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h

Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper dokumentieren die Expression der Proteine HA-LeBet1 und HA-LeBet1 Δ TMD.

Wie die Abbildungen 2.4 A und B zeigen hat weder die Koexpression von HA-LeBet1 noch die der cytosolischen Mutante (HA-LeBet1 Δ TMD) einen Einfluss auf die Sekretion der α -Amylase. Auch bei Einsatz höherer Konzentrationen der SNARE kodierenden Plasmide bleibt die Sekretion von α -Amylase konstant. Der in Abbildung 2.5 A und B dargestellte Vergleich der Aktivität von α -Amylase im Kulturmedium und den Zellen zeigt, dass die Koexpression beider LeBet1-Proteine keine dosisabhängige Veränderung der enzymatischen Aktivität des Reporterproteins im Medium und Zellen erzeugt. Das Absinken der Aktivität von α -Amylase sowohl im Medium als auch in den Zellen bei 20 μ g eingesetzter Menge an Plasmid DNA deutet auf ein Absterben der Tabak-Protoplasten hin, was aber keinen Einfluss auf die Sekretion an sich hatte, wie der Sekretionsindex in Abbildung 2.4 zeigt.

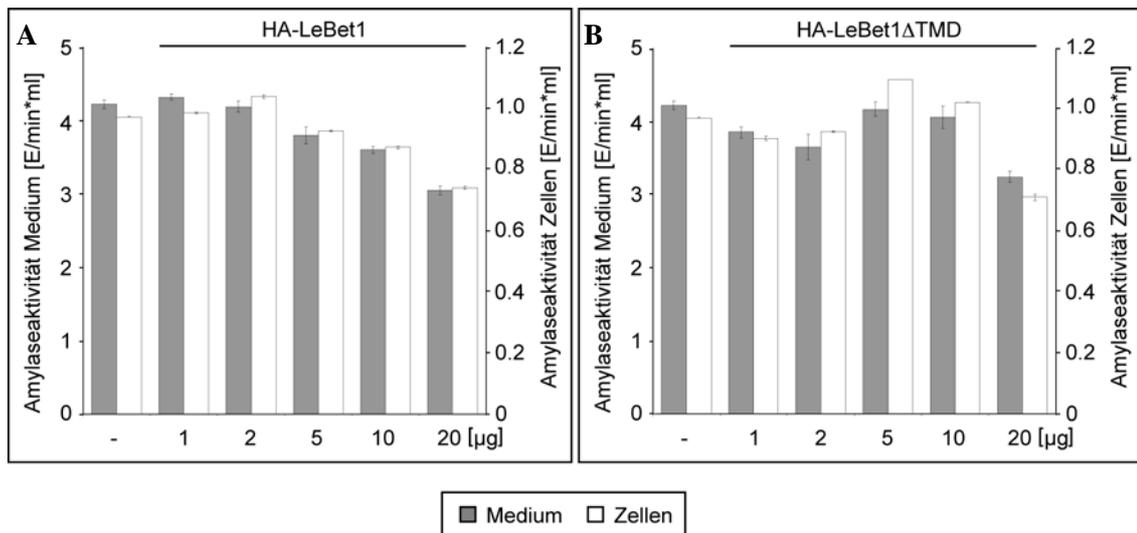


Abb. 2.5: Aktivität von α -Amylase im Kulturmedium und in den Zellen bei Kotransformation von HA-LeBet1 (A) bzw. HA-LeBet1 Δ TMD (B). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Aktivität durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Das erste Säulenpaar dient als Positivkontrolle und zeigt die Aktivität von α -Amylase nach Einsatz von 5 μ g Amylase Plasmid zur Transformation. In den folgenden Säulenpaaren ist die Aktivität von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g HA-LeBet1 bzw. HA-LeBet1 Δ TMD Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-6). Die α -Amylase Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt.

Um sicherzustellen, dass das HA-Epitop am N-Terminus des Proteins keinen Einfluss auf die Funktionalität des SNARE-Proteins hat, wurden transiente Expressionsstudien mit dem Wildtyp-Protein LeBet1 (wt LeBet1) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung zweier unabhängiger Versuche. Anschließend wurden der Sekretionsindex von α -Amylase

(Abb. 2.6 A) und die Gesamtaktivität des Enzyms im Kulturmedium und der Zellen ermittelt (Abb. 2.6 B).

Die Expression des Wildtyp-Proteins LeBet1 hat keinen Einfluss auf die Sekretion der α -Amylase. Wie in Abbildung 2.6 A dargestellt, ist der Sekretionsindex sogar leicht erhöht bei Koexpression von wt LeBet1, zeigt aber keinen dosisabhängigen Effekt. Die Gesamtaktivität (Abb. 2.6 B) von α -Amylase stellt die Aktivität der α -Amylase im Kulturmedium und den Zellen dar. Diese ist bei Koexpression von LeBet1 leicht erhöht. Die *de novo* Synthese von α -Amylase wird daher nicht beeinträchtigt. Es wurde sogar etwas mehr α -Amylase synthetisiert, daher wird mehr α -Amylase durch den sekretorischen Weg transportiert und der Sekretionsindex ist leicht erhöht.

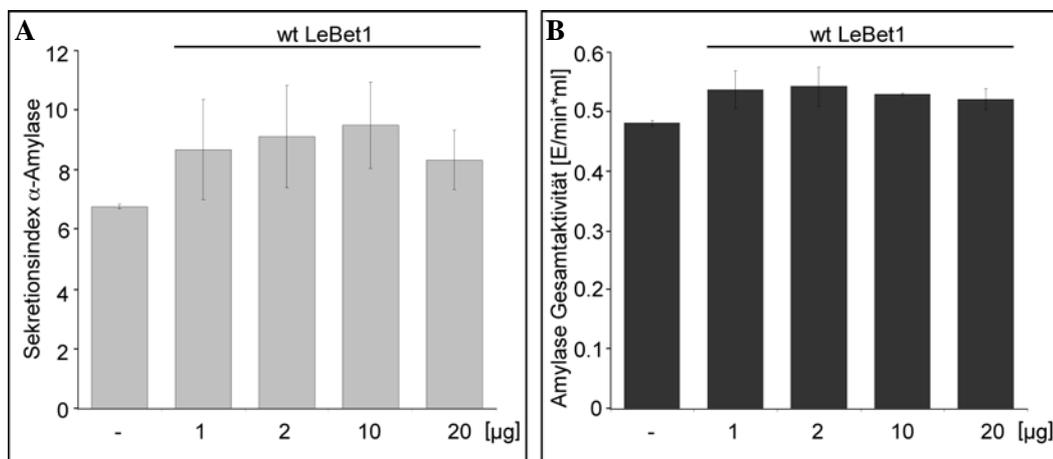


Abb. 2.6: Einfluss von wt LeBet1 auf die Sekretion (A) bzw. die Gesamtaktivität (B) von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das wt LeBet1 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex (A) bzw. die Gesamtaktivität (B) von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g wt LeBet1 Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt.

2.3.2. Lokalisierungsstudien von LeBet1 am CLSM

Um einen ersten Überblick über die Lokalisation von LeBet1 in der Zelle zu erhalten, eignet sich die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM). Das YFP-LeBet1 codierende Plasmid pJB33 wurde für die transienten Expressionsstudien zur Lokalisation in Tabak-Protoplasten verwendet.

Um zu gewährleisten, dass das YFP-LeBet1 Fusionsprotein keinen Verlust auf funktioneller Ebene aufweist, wurden zunächst transiente Genexpressionsstudien wie bereits am Beispiel von HA-LeBet1 und wt LeBet1 durchgeführt und der Sekretionsindex ermittelt (Abb. 2.7). Die Messungen wurden als Doppelproben durchgeführt und das Experiment drei Mal wiederholt.

Die Sekretion der α -Amylase wird durch die Koexpression von YFP-LeBet1 nicht inhibiert. Auch beim Einsatz von sehr hohen Mengen an Plasmid DNA (20 μ g) wird der sekretorische Weg nicht gestört. Die Fusion von YFP an den N-Terminus des SNARE-Proteins nimmt keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins. Zur Überprüfung der Expression des Fusionsproteins wurden Western-Blot-Analysen der Protoplasten mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper durchgeführt (Abb. 2.7).

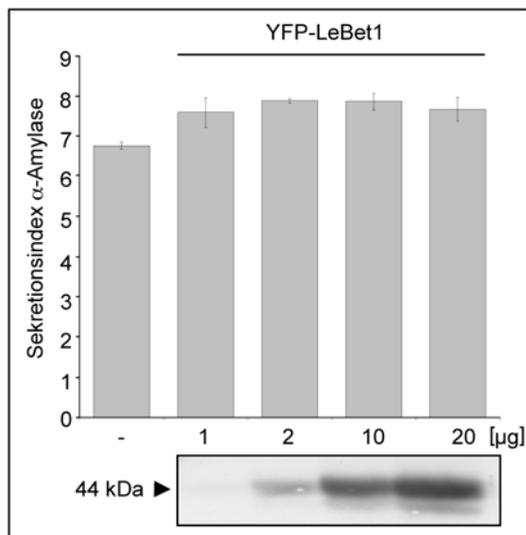


Abb. 2.7: Einfluss von YFP-LeBet1 auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das YFP-LeBet1 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g YFP-LeBet1 Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot Analyse mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper dokumentiert die Expression des Fusionsproteins.

Zur Aufklärung der intrazellulären Lokalisierung von YFP-LeBet1 wurden Koexpressionsstudien von YFP-LeBet1 mit dem *cis*-Golgi-Marker ManI-RFP (Yang et al., 2005) durchgeführt. Hierzu wurden die Protoplasten mit jeweils 5 μ g Plasmid DNA von YFP-LeBet1 und ManI-RFP elektroporiert, 8 Stunden bei 25°C inkubiert und am CLSM untersucht. Beide Markierungen zeigen punktförmige Signale gleicher Größe von circa 0,5 – 0,8 μ m, was der Größe des Golgi-Apparates in höheren Pflanzen entspricht (Langhans et al., 2007). Die Aufnahmen zeigen eine punktförmige Verteilung des YFP-Signals und eine eindeutige Kolo-kalisierung von YFP-LeBet1 mit dem *cis*-Golgi-Marker ManI-RFP (siehe Abb. 2.8). Aufnahmen von Zeitreihen (x/y/t-timeseries) zeigen, dass die Fluoreszenzsignale mobil sind.

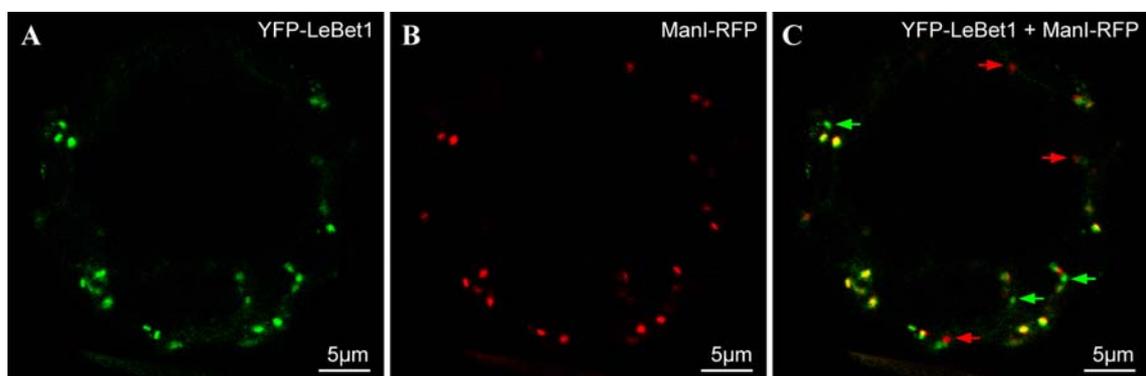


Abb. 2.8: Koexpression von YFP-LeBet1 mit dem Golgi-Marker ManI-RFP in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 8 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 5 μ g Plasmid DNA von YFP-LeBet1 und ManI-RFP eingesetzt. Das YFP-Signal ist grün (A), das

RFP-Signal rot (B) und der Merge gelb (C) dargestellt. Einzelbildaufnahmen einer Ebene des Protoplasten von YFP-LeBet1 (A), ManI-RFP (B) und dem Overlay von A und B (C).

Das SNARE-Fusionsprotein YFP-LeBet1 scheint laut CLSM-Studien keinen Einfluss auf die Endlokalisierung des Golgi-Markers in der Zelle zu nehmen, was aufgrund der quantitativen Daten des α -Amylase Enzymtests bereits anzunehmen war. Die Koloalysierung des Markers mit YFP-LeBet1 ist allerdings nicht vollständig. Wie in Abbildung 2.8 C weisen nicht alle ManI-RFP Signale eine Koloalysierung mit dem YFP-Signal auf (durch rote Pfeile gekennzeichnet) und umgekehrt (durch grüne Pfeile dargestellt).

Um sicherzustellen, dass diese Strukturen dem Golgi-Apparat zugeordnet werden können, wurden die Protoplasten mit Brefeldin A inkubiert. Mit Hilfe des makrozyklischen Laktons Brefeldin A (BFA) ist es möglich den frühen sekretorischen Weg zu inhibieren (Klausner et al., 1992; Satiat-Jeunemaitre et al., 1996; Sciaky et al., 1997; Nebenfuhr et al., 2002). BFA übt einen unmittelbaren Einfluss auf den retrograden Transport aus, indem es primär an Sec7-ähnliche Guannukleotid-Austausch Faktoren (GEFs), welche die GTPase Arf1 katalysieren, bindet und somit die Rekrutierung von COPI-Hüllproteinen inhibiert. Somit wird die Bildung des COPI-Coatomers in tierischen und in pflanzlichen Zellen verhindert (Scheel et al., 1997; Jackson and Casanova, 2000; Ritzenthaler et al., 2002; Renault et al., 2003). Des Weiteren bewirkt BFA sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen die Resorption der Golgi-Zisternen und der Golgienzime in das ER (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Boevink et al., 1998; Ritzenthaler et al., 2002), was aufgrund einer Umverteilung und Anreicherung von SNARE-Proteinen und einer daraufhin unspezifischen Fusion von ER und Golgimembranen zu erklären ist (Nebenfuhr et al., 2002). Dieser Effekt trifft auf die *cis* und *medianen* Zisternen des Golgi-Apparates zu, nicht aber auf den *trans*-Golgi und das Transgolginetzwerk (TGN). Diese lösen sich, vesikulieren und aggregieren mit endosomalen Membranen, das als BFA-Kompartiment bezeichnet wird (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Wood et al., 1991; Satiat-Jeunemaitre, 1992; Boevink et al., 1998).

Nach Elektroporation der Tabak-Protoplasten mit 5 μ g YFP-LeBet1 kodierenden Plasmids (pJB33) wurden diese zunächst nach 15 Stunden Inkubation am CLSM untersucht. In der Teilabbildung 2.9 A sind Strukturen als punktförmige Fluoreszenzsignale mit einer Größe von ungefähr 0,5 – 0,8 μ m zu erkennen. Weitere Studien zeigten, dass die Fluoreszenzsignale mobil sind. Anschließend wurden die Protoplasten für 2 Stunden mit 10 μ g/ml BFA behandelt. Diese Dosis wurde bereits erfolgreich an verschiedenen Tabakzellen getestet (Ritzenthaler et al., 2002; Langhans et al., 2007).

In Abbildung 2.9 B und C ist der Effekt von BFA auf die Lokalisation des YFP-LeBet1 Signals dargestellt. Es konnten zwei Effekte beobachtet werden. In beiden Aufnahmen ist eine klare Umverteilung des YFP-Signals in das ER zu beobachten, was darauf hindeutet, dass YFP-LeBet1 tatsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert ist. Allerdings sind in Abbildung 2.9 B außer-

dem noch größere punktförmige YFP-Signale zu beobachten. Dieses sind mobile Strukturen und stellen höchstwahrscheinlich Akkumulationen mehrerer Golgi-Apparate dar (durch Pfeile gekennzeichnet). In Abbildung 2.9 C hingegen ist das YFP-Signal hauptsächlich auf tubuläre Strukturen des ER-Netzwerks und auf kleine punktförmige Strukturen entlang des ERs beschränkt.

Als Kontrolle der Umverteilung von Golgi lokalisierten Proteinen nach BFA-Behandlung in Tabak-Protoplasten wurden diese mit ManI-RFP codierender Plasmid-DNA elektroporiert, 15 Stunden inkubiert und ebenfalls für 2 Stunden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ BFA behandelt. Das punktförmige RFP-Signal des *cis*-Golgi-Markers verschwindet nach der Behandlung mit BFA vollständig und reichert sich im ER an (Abb. 2.9 D – F).

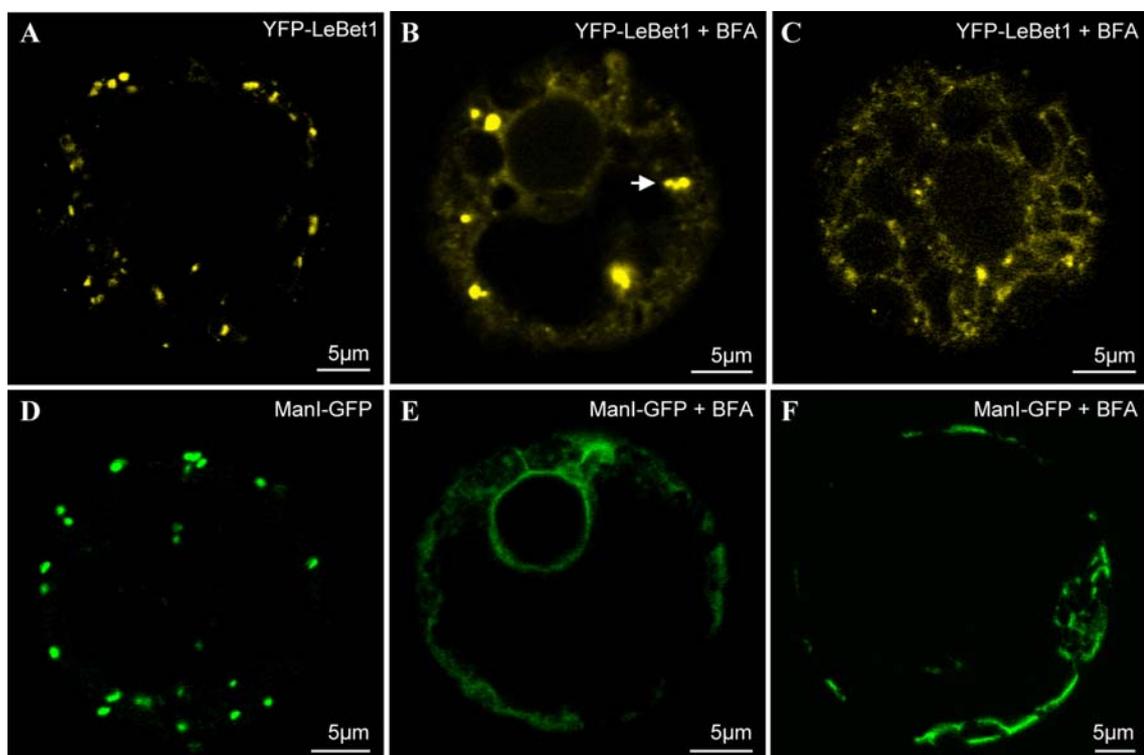


Abb. 2.9: Lokalisierung von YFP-LeBet1 in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 5 μg Plasmid DNA eingesetzt. **A** Einzelbildaufnahme einer Ebene des Protoplasten, transformiert mit YFP-LeBet1 nach 15 h Inkubation. **B** und **C** stellen Aufnahmen einer Ebene zweier Protoplasten, transformiert mit 5 μg YFP-LeBet1 Plasmid, dar. Nach 15 h Inkubation wurde 10 $\mu\text{g/ml}$ BFA zugegeben und bis zu 2 h inkubiert. Das YFP-Signal in (A) – (C) ist gelb dargestellt. **D** Aufnahme einer Ebene des Protoplasten, transformiert mit 5 μg ManI-GFP Plasmid-DNA nach 15 h Inkubation. **E** und **F** Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ BFA. Protoplasten wurden mit 5 μg ManI-RFP Plasmid-DNA elektroporiert, 15 h inkubiert und für 2 h mit BFA versetzt. Das GFP-Signal in (D) – (F) ist grün dargestellt.

2.3.3. Gewebeabhängigkeit der Expression von LeBet1

Es wurden weitere Kollokalisierungsstudien von YFP-LeBet1 mit dem Golgi-Marker ManI-RFP in Tabak BY-2 Wurzelzellensuspensionskulturen durchgeführt. Diese wurden mittels Partikelbeschuss mit jeweils 2,5 µg Plasmid-DNA transfiziert, 15 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert und anschließend am CLSM untersucht. Auch hier waren beide Markierungen als punktförmige Strukturen zu detektieren (Abb. 2.10). Zusätzliche Zeitaufnahmen zeigten, dass die Fluoreszenzsignale mobil sind (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisierung des Golgi-Markers wurde durch die Koexpression des YFP-LeBet1 nicht beeinträchtigt. Das Overlay beider Signale zeigt eine komplette Kollokalisierung des Golgi-Markers ManI-RFP mit dem SNARE-Protein YFP-LeBet1 (Abb. 2.10 C und D).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die transiente Überexpression von YFP-LeBet1 sowohl in Mesophyll-Protoplasten als auch in Wurzelsuspensionszellen keinen Einfluss auf den Transportweg vom ER zum Golgi hat und dass das SNARE-Protein LeBet1 höchstwahrscheinlich am *cis*-Golgi lokalisiert ist.

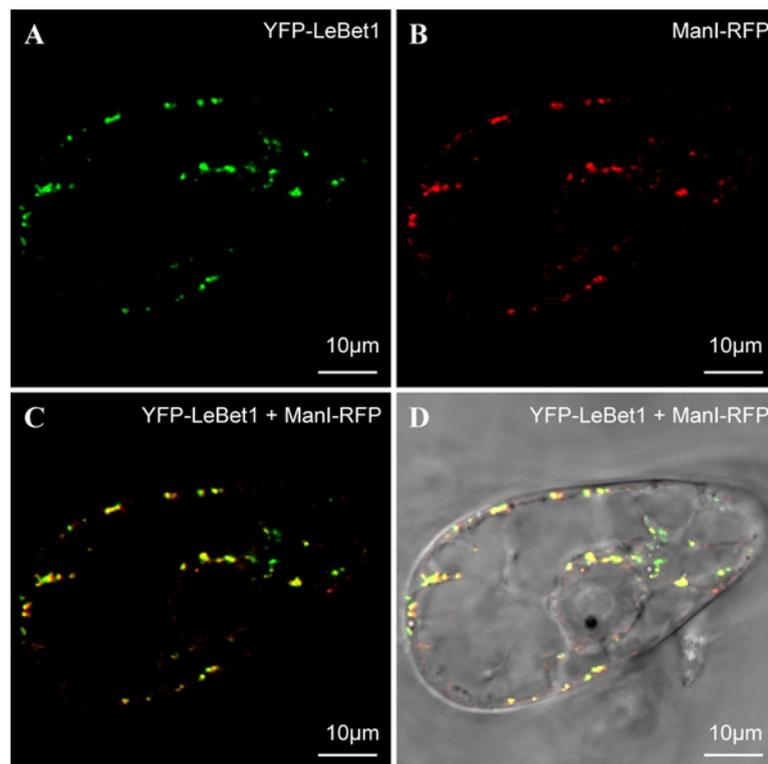


Abb. 2.10: Transiente Koexpression von YFP-LeBet1 und ManI-RFP in Tabak Wurzelzellensuspensionskulturen (BY-2). Die transformierten BY-2 Zellen wurden nach 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2,5 µg Plasmid DNA von YFP-LeBet1 und ManI-RFP eingesetzt. Das YFP-Signal ist grün (A), das RFP-Signal rot (B) dargestellt. Einzelbildaufnahmen einer Ebene der BY-2 Zelle von YFP-LeBet1 (A), ManI-RFP (B), dem Overlay von YFP-LeBet1 und ManI-RFP (C) und dem Overlay von YFP-LeBet1 und ManI-RFP mit Durchlicht (D).

2.4. Die Überexpression des R-SNAREs LeSec22 zeigt keinen Effekt auf den sekretorischen Weg

Lokalisierungsstudien von Uemura et al. (2004) in Protoplasten von *A. thaliana* Zellsuspensionskulturen und Chatre et al. (2005) in Epidermiszellen von Tabakblättern zeigten, dass sich das Signal des Fluoreszenz getaggen AtSec22 sowohl im ER als auch am *cis*-Golgi befindet. In transienten Überexpressionsstudien in Tabak-Epidermiszellen wurde festgestellt, dass bei Koexpression von AtSec22 mit einem Golgi-Marker dieser in das ER kollabiert (Chatre et al., 2005). Diese Ergebnisse basieren ausschließlich auf mikroskopischen Studien. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Überproduktion von LeSec22 und dessen Mutanten LeSec22 Δ TMD und LeSec22 Δ N mittels transients Genexpressionsstudien in Tabakprotoplasten untersucht und quantitativ bestimmt. Zusätzlich zu diesen funktionellen Studien wurden zur genauen Lokalisierung von LeSec22 sowohl Tabak-Protoplasten als auch BY-2 Zellsuspensionskulturen mit YFP-LeSec22 transfiziert.

2.4.1. Funktionsnachweis mittels quantitativen Enzymtests

Zur quantitativen Analyse der Sekretion von α -Amylase wurden eine konstante Menge an α -Amylase kodierenden Plasmids sowie steigende Konzentrationen von 1-20 μ g des HA-LeSec22 kodierenden Plasmids in Tabak-Protoplasten koelektroporiert. Eine Transfektion der Protoplasten mit dem α -Amylase kodierenden Plasmid alleine diente als Kontrolle. Nach der Elektroporation wurden die Protoplasten 24 h bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die α -Amylase-Aktivitäten des Kulturmediums und der Zellen wurden anschließend analysiert und photometrisch bestimmt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. Zur Überprüfung der Expression von HA-LeSec22 wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen der Protoplasten mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper durchgeführt.

Wie die Abbildung 2.11 A zeigt, hat die Koexpression von HA-LeSec22 keinen Effekt auf die Sekretion der α -Amylase. Anhand des Western-Blots kann man erkennen, dass das Protein in hohem Maße exprimiert wurde, was aber keinen Einfluss auf den COPII abhängigen Transport vom ER zum Golgi nimmt. Die Aktivität der α -Amylase im Kulturmedium und in den Zellen bleibt ebenfalls konstant (Abb. 2.11 B), was darauf hindeutet, dass selbst bei hoher Expressionsrate des R-SNAREs der Metabolismus der Zelle nicht beeinträchtigt wird.

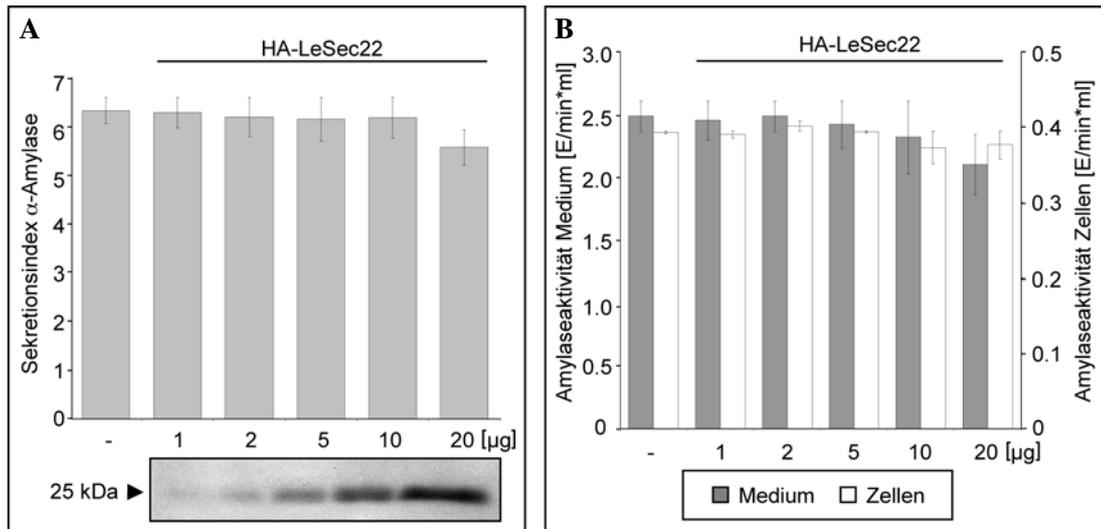


Abb. 2.11: Einfluss von HA-LeSec22 auf die Sekretion von α -Amylase (**A**) bzw. Aktivität von α -Amylase in Kulturmedium und Zellen bei Kotransformation von HA-LeSec22 (**B**). Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das HA-LeSec22 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex (**A**) bzw. die Aktivität (**B**) von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g HA-LeSec22 Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-6). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper dokumentiert die Expression des Proteins HA-LeSec22 (**A**). Die α -Amylase Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt (**B**).

Da der N-terminalen Longin-Domäne regulatorische Funktionen zugesprochen werden, wurden transiente Koexpressionen mit der N-terminalen Deletionsmutante HA-LeSec22 Δ N durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss der cytosolischen Domäne von LeSec22 auf die Sekretion von α -Amylase untersucht. Beide Experimente wurden wie bereits erläutert unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Auch hier wurden alle Messungen als Doppelproben ausgeführt und das Experiment jeweils dreimal wiederholt. Die α -Amylase Sekretion ist auch bei Expression dieser Deletionsmutanten nicht beeinflusst (Abb. 2.12 A und B).

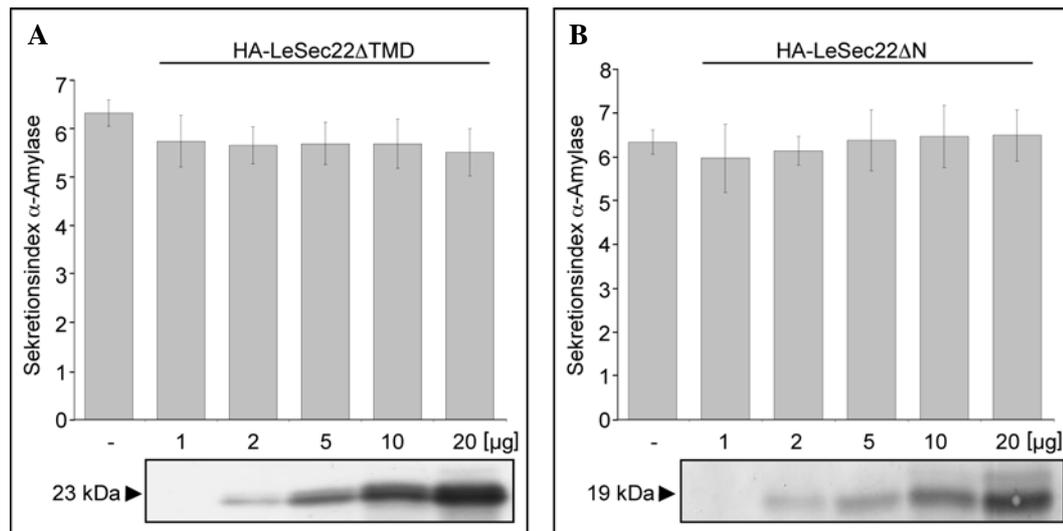


Abb. 2.12: Einfluss von HA-LeSec22ΔTMD (**A**) und HA-LeSec22ΔN (**B**) auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das HA-LeSec22ΔTMD bzw. HA-LeSec22ΔN kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g LeSec22ΔTMD bzw. HA-LeSec22ΔN Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-6). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase-Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper dokumentieren die Expression der Proteine HA-LeSec22ΔTMD (**A**) und HA-LeSec22ΔN (**B**).

Alle drei HA-LeSec22 Fusionsproteine haben keinen Einfluss auf die Sekretion des Reporterproteins α -Amylase. Um auszuschließen, dass das HA-Epitop die Funktionalität des SNARE-Proteins LeSec22 negativ beeinflusst, wurden transiente Expressionsstudien mit dem Wildtyp-Protein LeSec22 (wt LeSec22) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Da dieses SNARE-Protein sowohl im anterograden als auch im retrograden Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat agiert, wurde α -AmylaseHDEL als Reporter eingesetzt. Dieses Protein eignet sich sehr gut als Reporter des retrograden COPI-abhängigen Transports, da es sowohl dem anterograden als auch dem retrograden Transportweg zwischen dem ER und dem *cis*-Golgi folgt (Pimpl et al., 2000; Phillipson et al., 2001). Es zyklisiert demnach zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. Bei einer hohen Expressionsrate von α -AmylaseHDEL kommt es zu einer Sättigung des HDEL-Rezeptors am *cis*-Golgi und somit wird ein geringer Teil von α -AmylaseHDEL ins Medium sekretiert. Der Anteil an sekretiertem α -AmylaseHDEL ist allerdings um ein Vielfaches geringer als der Anteil an sekretierter α -Amylase (Phillipson et al., 2001).

Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. Der Sekretionsindex von α -Amylase bei Überexpression von wt LeSec22 ist in Abbildung 2.13 A und der Sekretionsindex von α -AmylaseHDEL in Abbildung 2.13 B dargestellt.

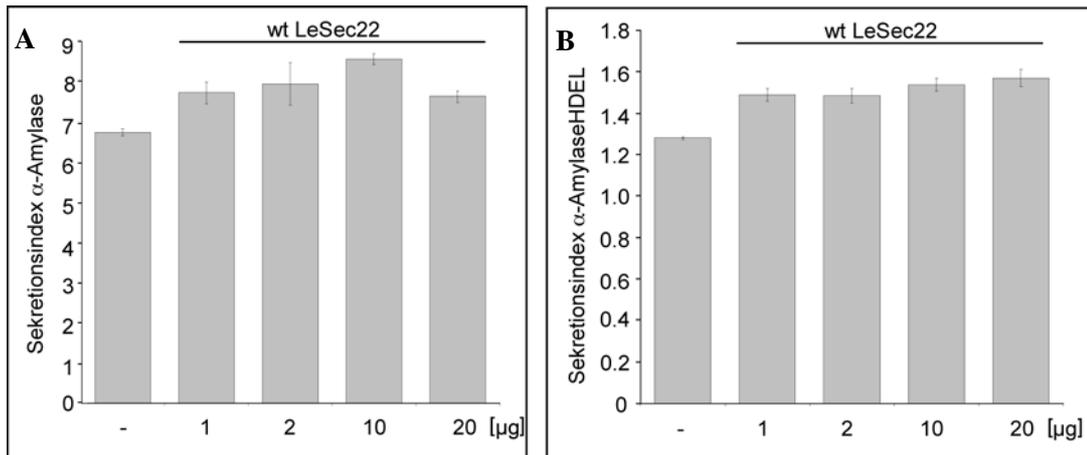


Abb. 2.13: Einfluss von wt LeSec22 auf die Sekretion von α -Amylase (A) und α -AmylaseHDEL (B). Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase bzw. α -AmylaseHDEL kodierenden Plasmids ohne das wt LeSec22 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (siehe jeweils Säule 1). In den folgenden Säulen ist jeweils der Sekretionsindex von α -Amylase (A) bzw. α -AmylaseHDEL (B) bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g wt LeSec22 Plasmid DNA gezeigt (siehe jeweils Säule 2-5). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt.

Die Sekretion sowohl von α -Amylase als Reporter für den COPII-abhängigen Transport, als auch α -AmylaseHDEL als Reporter des retrograden Transports zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat wird bei Koexpression des R-SNAREs LeSec22 nicht beeinflusst. Selbst bei Einsatz hoher Mengen an Plasmid-DNA (20 μ g) bleibt die Sekretion beider Reporterproteine konstant. Es ist kein dosisabhängiger Effekt zu beobachten (Abb. 2.13 A und B).

2.4.2. Lokalisierungsstudien von LeSec22 am CLSM

Das YFP-LeSec22 codierende Plasmid pJB32 wurde für die transienten Expressionsstudien zur Lokalisation in Tabak-Protoplasten verwendet. Wie in Abbildung 2.14 dargestellt, veränderte auch die Expression des Fusionsproteins YFP-LeSec22 in Tabak-Protoplasten die Sekretionsrate von α -Amylase nicht. Die Fusion des YFP-Proteins an den N-Terminus von LeSec22 führt daher nicht zu einem Funktionsverlust des SNAREs. Auch in diesem Versuch wurden alle Messungen als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung zweier unabhängiger Versuche. Die Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper gegen das 52 kDa Fusionsprotein YFP-LeSec22 zeigt eine klare dosisabhängige Expression des SNARE-Proteins (Abb. 2.14). Da das Fusionsprotein YFP-LeSec22 keinen funktionellen Verlust aufweist, konnte dieses für Lokalisierungsstudien in Tabak-Protoplasten und BY-2 Suspensionszellen am Konfokalmikroskop verwendet werden.

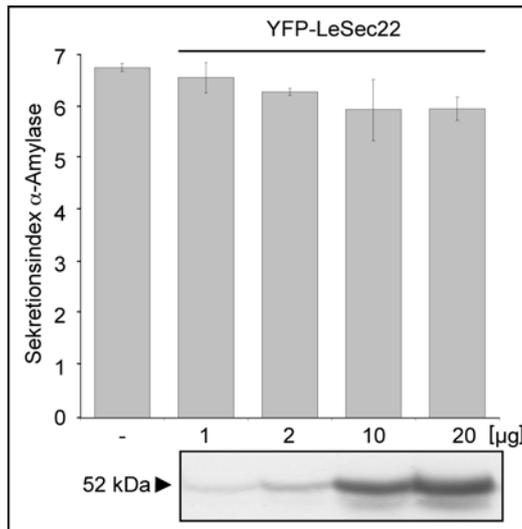


Abb. 2.14: Einfluss von YFP-LeSec22 auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das YFP-LeSec22 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g wt YFP-LeSec22 Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper dokumentiert die Expression des Fusionsproteins YFP-LeSec22.

Die Protoplasten wurden jeweils mit 5 μ g Plasmid-DNA elektroporiert und 7 – 15 Stunden bei 25°C inkubiert. In den Abbildungen 2.15 A, D und G ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal je nach „steady state“ als punktförmige und tubuläre Strukturen auftritt. Die Protoplasten wurden nach 7 Stunden (Abb. 2.15 D) und nach 15 Stunden (Abb. 2.15 A und G) Inkubation am CLSM untersucht. Die Expression von YFP-LeSec22 bleibt auch bei längerer Inkubationszeit stets auf die punktförmigen und tubulären Strukturen beschränkt. Diese Strukturen stellen höchstwahrscheinlich den Golgi-Apparat und das ER dar. Um zu beweisen, dass die punktförmigen Strukturen eine Markierung des Golgi-Apparates darstellen, wurden die Protoplasten 15 Stunden nach Elektroporation für weitere 2 Stunden mit 10 μ g/ml BFA behandelt. In Abbildung 2.15 B und C ist der Effekt von BFA auf die Lokalisation des YFP-LeSec22 Signals in zwei verschiedenen Tabak-Protoplasten dargestellt. Die punktförmigen Strukturen verschwinden nach BFA-Behandlung vollständig und das YFP-Signal ist ausschließlich im ER lokalisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass YFP-LeSec22 am Golgi-Apparat und im ER lokalisiert ist.

Um die Lokalisation von YFP-LeSec22 am Golgi und im ER-Netzwerk zu bestätigen, wurden Koexpressionsstudien von YFP-LeSec22 mit dem *cis*-Golgi-Marker ManI-RFP (Yang et al., 2005) und dem ER-Marker GFP-HDEL (Brandizzi et al., 2003) in Tabak-Protoplasten durchgeführt (Abb. 2.15 D – F und G – I). Das R-SNARE YFP-LeSec22 kolokalisiert sowohl mit dem Golgi-Marker ManI-RFP (Abb. 2.15 D – F) als auch mit dem ER-Marker GFP-HDEL (Abb. 2.15 G – I). Die Lokalisierung beider Marker wird bei Koexpression mit YFP-LeSec22 nicht beeinflusst. Die Verteilung von LeSec22 zwischen dem ER und Golgi ist in jeder Zelle je nach physiologischem Zustand unterschiedlich, was sich zum Beispiel in den beiden Aufnahmen in Abbildung 2.15 D und G gut vergleichen lässt. In Abbildung 2.15 G ist das SNARE-Protein hauptsächlich im ER lokalisiert, wohingegen in Abbildung 2.15 D das Signal von YFP-LeSec22 gleichmäßig im ER und dem Golgi-Apparat verteilt ist. Beide Lokalisierungszustände lassen sich mit den Ergebnissen von Uemura et al. (2004) und Chatre et al. (2005) vereinbaren. Aller-

dings führte die Expression von LeSec22 in Tabak-Protoplasten nicht zu einer Umverteilung des Golgi-Markers in das ER, wie es von Chatre et al. (2005) dargestellt wurde. Die konfokalen Daten dieser Arbeit lassen sich aber eindeutig mittels der quantitativen Enzymtests (Kap. 2.4.1) belegen.

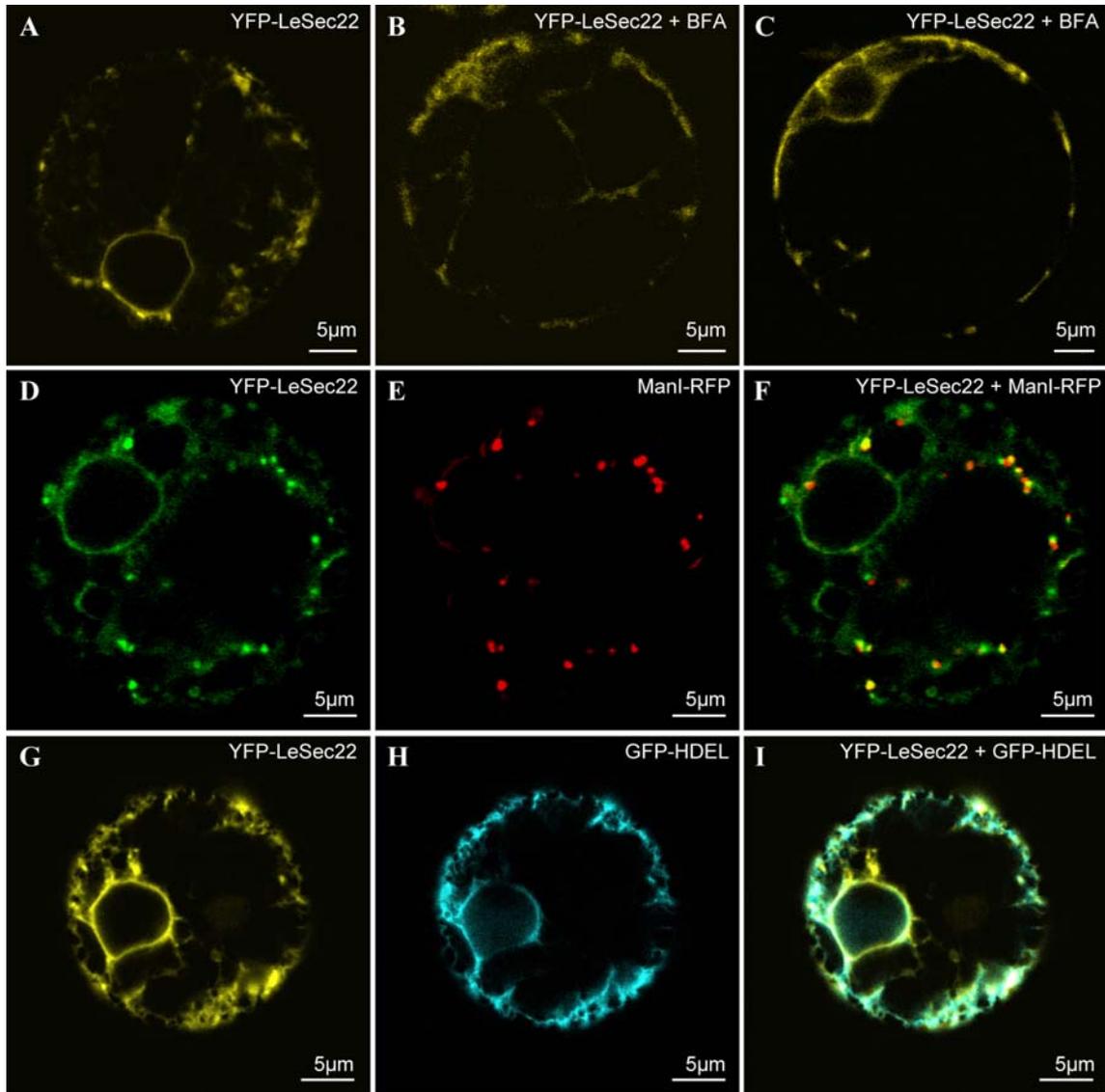


Abb. 2.15: Intrazelluläre Lokalisierung von YFP-LeSec22 in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 7 - 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. **A** Aufnahme einer Ebene des Protoplasten, transformiert mit 5 µg YFP-LeSec22 Plasmid-DNA nach 15 h Inkubation. **B** und **C** Zugabe von 10 µg/ml BFA. Protoplasten wurden mit 5 µg YFP-LeSec22 Plasmid DNA elektroporiert, 15 h inkubiert und für 2 h mit BFA versetzt. Es sind zwei verschiedene Protoplasten dargestellt. Das YFP-Signal in (A) – (C) ist gelb dargestellt. **D - F** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten, kotransformiert mit YFP-LeSec22 (D) und ManI-RFP (E), nach 7 h Inkubation. Das Overlay von YFP-LeSec22 und ManI-RFP ist in (F) dargestellt. Das YFP-Signal ist grün (D), das RFP-Signal rot (E) und der Merge gelb (F) dargestellt. **G - I** Aufnahmen einer Ebene eines Protoplasten, kotransformiert mit YFP-LeSec22 (G) und GFP-HDEL (H), nach 15 h Inkubation. Das Overlay von YFP-LeSec22 und GFP-HDEL ist in (I) dargestellt. Das YFP-Signal ist gelb (G), das GFP-Signal blau (H) und der Merge türkis (I) dargestellt.

2.4.3. Gewebeabhängigkeit der Expression von LeSec22

Um sicherzustellen, dass diese Lokalisierung von LeSec22 nicht nur auf einen Pflanzentyp zutrifft, wurden Kollokalisierungen mit YFP-LeSec22 und dem Golgi-Marker ManI-RFP in Wurzelzellsuspensionskulturen durchgeführt. Mittels Partikelbeschuss wurden Tabak BY-2 Zellen mit jeweils 2,5 µg Plasmid DNA transfiziert, 15 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert und anschließend am CLSM untersucht. Das YFP-Signal des SNAREs ist auch hier in beiden Kompartimenten, dem ER und Golgi, zu beobachten. Die mobilen punktförmigen YFP-Signale kollokalisieren mit dem RFP-Signal des Golgi-Markers. Die Lokalisierung des Golgi-Markers ist durch die Koexpression mit YFP-LeSec22 nicht beeinträchtigt (Abb. 2.16 C und D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die transiente Überexpression von YFP-LeSec22 sowohl in Mesophyll-Protoplasten als auch in Wurzelsuspensionszellen keinen Einfluss auf den Transportweg vom ER zum Golgi-Apparat hat und dass das SNARE-Protein LeSec22 am *cis*-Golgi und im ER lokalisiert ist.

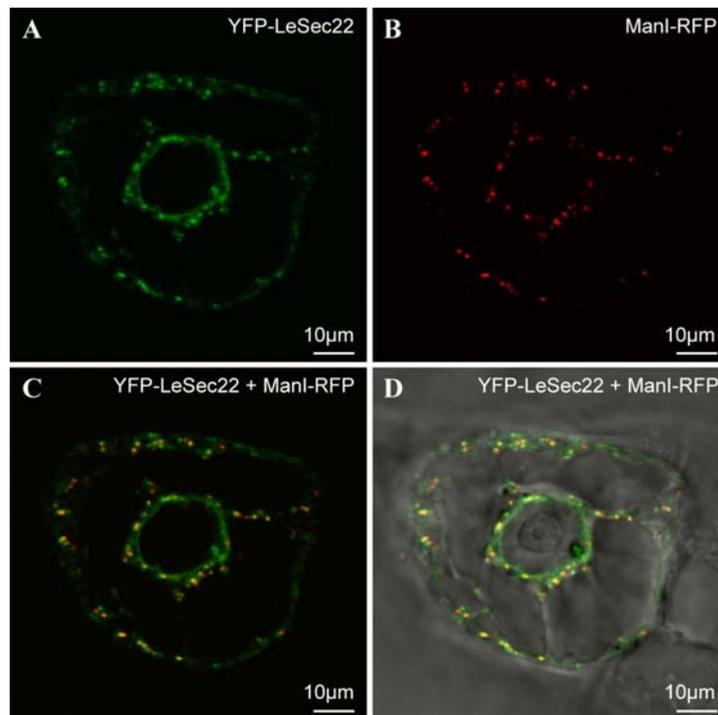


Abb. 2.16: Transiente Koexpression von YFP-LeSec22 und ManI-RFP in Tabak Wurzelzellsuspensionskulturen (BY-2). Die transformierten BY-2 Zellen wurden nach 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2,5 µg Plasmid-DNA von YFP-LeSec22 und ManI-RFP eingesetzt. Das YFP-Signal ist grün (A), das RFP-Signal rot (B) dargestellt. Einzelbildaufnahmen einer Ebene der BY-2 Zelle von YFP-LeSec22 (A), ManI-RFP (B), des Overlays von YFP-LeSec22 und ManI-RFP (C) und des Overlays von YFP-LeSec22 und ManI-RFP mit Durchlicht (D).

2.5. Die Überexpression des „light chain“ SNAREs LeBos1 zeigt einen inhibitorischen Effekt auf den sekretorischen Weg

In Protoplasten von *A. thaliana* Zellsuspensionskulturen wurde das homologe Qb-SNARE-Protein AtMEMB11 aus *A. thaliana* mittels Fluoreszenzstudien von Uemura et al. (2004) am *cis*-Golgi lokalisiert. Die transiente Überexpression von AtMEMB11 in Epidermiszellen von Tabak-Blättern führte zu einer Retention der sekretorischen Form von YFP in das ER als auch zum Kollaps des Golgi-Apparates in das ER, dargestellt mit Hilfe der Golgi-Marker ERD2-CFP und ST-YFP (Chatre et al., 2005). In Hefen nimmt man an, dass das „light chain“ Qb-SNARE Bos1p zusammen mit dem „heavy chain“ Qa-SNARE Sed5p und dem R-SNARE Sec22p den trimeren t-SNARE Komplex am *cis*-Golgi ausbildet (Newman et al., 1990; Sacher et al., 1997; Parlati et al., 2000). Um die Relevanz des Qb-SNAREs LeBos1 aus *L. esculentum* innerhalb des sekretorischen Wegs zu testen, wurde zunächst die Sekretion von α -Amylase mittels transients Koexpressionsstudien von α -Amylase und LeBos1 bzw. dessen cytosolischer Mutante LeBos1 Δ TMD in Tabak-Protoplasten untersucht. Zur Aufklärung der intrazellulären Lokalisierung von LeBos1, wurden sowohl Tabak-Mesophyll-Protoplasten als auch BY-2 Zellsuspensionskulturen mit YFP-LeBos1 transfiziert und am CLSM untersucht.

2.5.1. Funktionsnachweis anhand quantitativer Enzymtests

Wie bereits beschrieben wurde zur quantitativen Analyse der Sekretion von α -Amylase eine konstante Menge an α -Amylase kodierenden Plasmids sowie steigende Konzentrationen von 1-20 μ g des HA-LeBos1 bzw. des cytosolischen Derivats HA-LeBos1 Δ TMD kodierenden Plasmids in Tabak-Protoplasten koelektroporiert. Als Kontrolle diente eine Transfektion der Protoplasten mit dem α -Amylase kodierenden Plasmid alleine. Nach der Elektroporation wurden die Protoplasten 24 h bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die α -Amylase-Aktivitäten des Kulturmediums und der Zellen wurden anschließend analysiert und photometrisch bestimmt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 2.17 A mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper diente der Überprüfung der Expression von HA-LeBos1 (28 kDa). Das SNARE-Protein konnte eindeutig nachgewiesen werden und zeigt entsprechend dem Einsatz von Plasmid-DNA eine zunehmende Expression in den Protoplasten. Der Sekretionsindex in Abbildung 2.17 A zeigt, dass die Sekretion des Reporterproteins α -Amylase bei Koexpression mit dem SNARE-Protein HA-LeBos1 inhibiert wird. Diese Inhibition ist dosisabhängig, das heißt je mehr HA-LeBos1 Protein exprimiert wird desto niedriger ist die Sekretion von α -Amylase. Der Vergleich der Aktivität von α -Amylase im Kulturmedium und in den Zellen, wie in Abbildung 2.17 B dargestellt, zeigt eindeutig, dass das Absinken der

Aktivität von α -Amylase im Medium mit dem Anstieg der α -Amylase-Aktivität in den Zellen korreliert. Bei Einsatz von 20 μg HA-LeBos1 codierenden Plasmid-DNA sinkt der Sekretionsindex von α -Amylase auf 35% ab. Die Aktivität von α -Amylase in den Zellen steigt um mehr als die Hälfte vom Kontrollwert an, wohingegen die α -Amylase-Aktivität im Kulturmedium um ein Drittel absinkt.

Die Transmembrandomäne dieses SNARE-Proteins scheint eine entscheidende funktionelle Rolle zu spielen, da die Koexpression des cytosolischen Derivats, HA-LeBos1 Δ TMD, keine inhibitorische Wirkung auf die Sekretion der α -Amylase hat (Abb. 2.17 C). Selbst bei Einsatz hoher Mengen an Plasmid-DNA bleibt der Sekretionsindex von α -Amylase konstant.

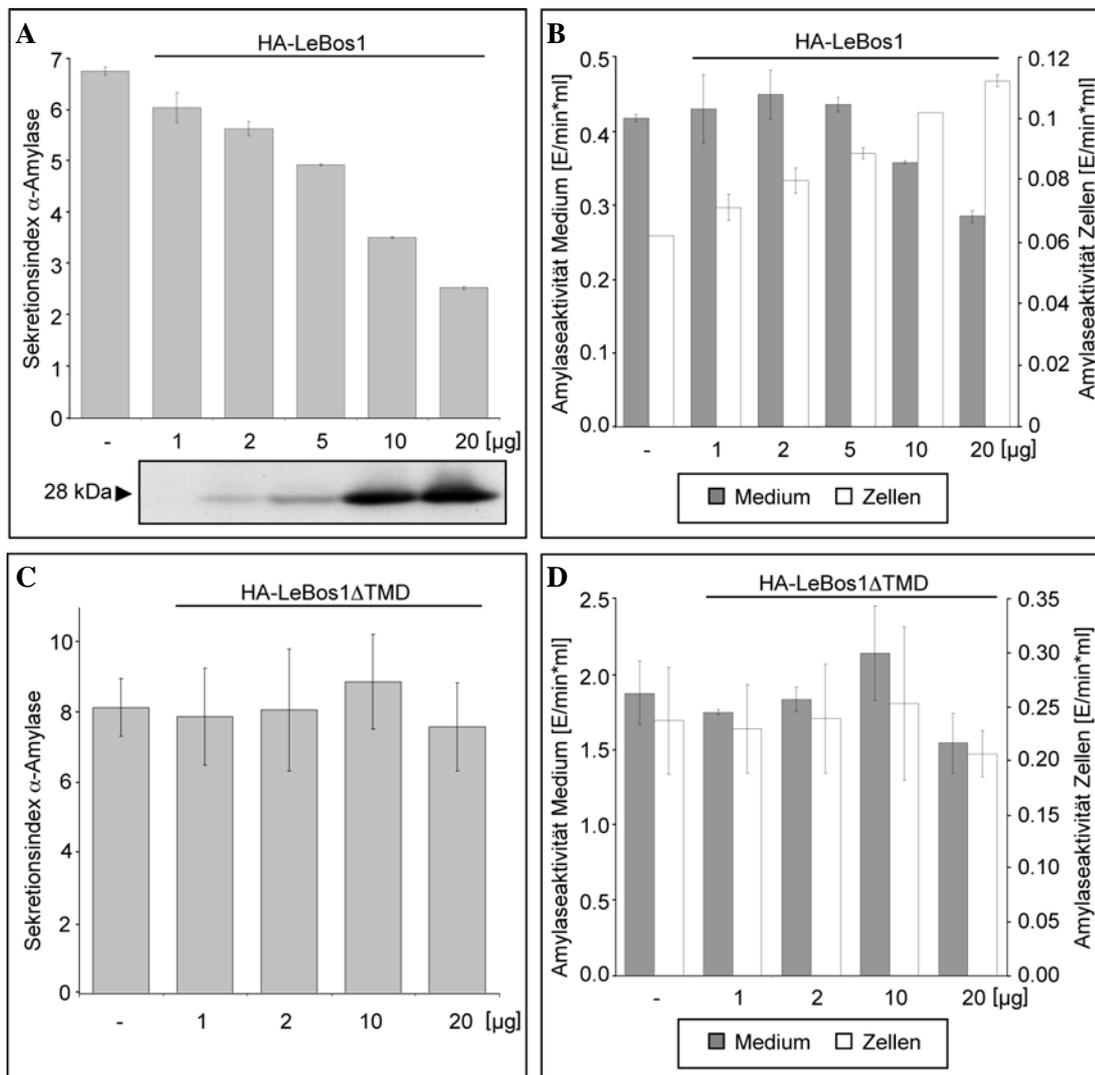


Abb. 2.17: Einfluss von HA-LeBos1 (A) und HA-LeBos1 Δ TMD (C) auf die Sekretion von α -Amylase bzw. Aktivität von α -Amylase in Kulturmedium und Zellen bei Kotransformation von HA-LeBos1 (B) und HA-LeBos1 Δ TMD (D). Transiente Genexpression von je 5 μg des α -Amylase codierenden Plasmids ohne das HA-LeBos1 bzw. HA-LeBos1 Δ TMD codierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex (A) bzw. die Aktivität (B) von α -Amylase bei Koexpression von 1 μg , 2 μg , 5 μg , 10 μg und 20 μg HA-LeBos1 Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-6). In den Teilabbildungen C und D ist der Sekretionsindex (C) und die Aktivität (D) von α -Amylase bei Koexpression

von 1 μg , 2 μg , 10 μg und 20 μg HA-LeBos1 Δ TMD Plasmid-DNA dargestellt (Säule 2-5). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper dokumentiert die Expression des Proteins HA-LeBos1 (A). Die α -Amylase-Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase-Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt (B und D).

Um auch hier sicherzustellen, dass der Effekt nicht durch die Anwesenheit des HA-Epitops am N-Terminus des Proteins verursacht wird, wurden transiente Expressionsstudien mit dem Wildtyp-Protein LeBos1 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Des Weiteren wurde zur Lokalisation des SNARE-Proteins ein YFP-Fusionsprotein (YFP-LeBos1) hergestellt, das ebenfalls auf seine Funktionalität mittels transients Koexpressionsstudien getestet wurde. In diesen Versuchen wurden alle Messungen jeweils als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. Die Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper gegen das 55 kDa Fusionsprotein YFP-LeBos1 zeigt eine klare dosisabhängige Expression des SNARE-Proteins (Abb. 2.18 B). Das Wildtyp-Protein (wt LeBos1) zeigt eine dosisabhängige Inhibition der Sekretion der α -Amylase. Der Sekretionsindex von α -Amylase sinkt je mehr LeBos1 kodierende Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Bei Einsatz von 20 μg Plasmid-DNA fällt der Sekretionsindex auf 14% des Kontrollwertes ab (Abb. 2.18 A). Der Einfluss des Fusionsproteins YFP-LeBos1 auf die Sekretionsrate von α -Amylase ist vergleichbar mit dem des Wildtyp-Proteins LeBos1. Auch hier sinkt der Index auf ungefähr 14% des Kontrollwertes ab, was in Abbildung 2.18 B dargestellt ist. Somit kann man annehmen, dass die Fusion des YFP-Proteins an den N-Terminus des SNAREs zu keinem Funktionsverlust des Fusionsproteins im Vergleich zum Wildtyp-Protein LeBos1 führt.

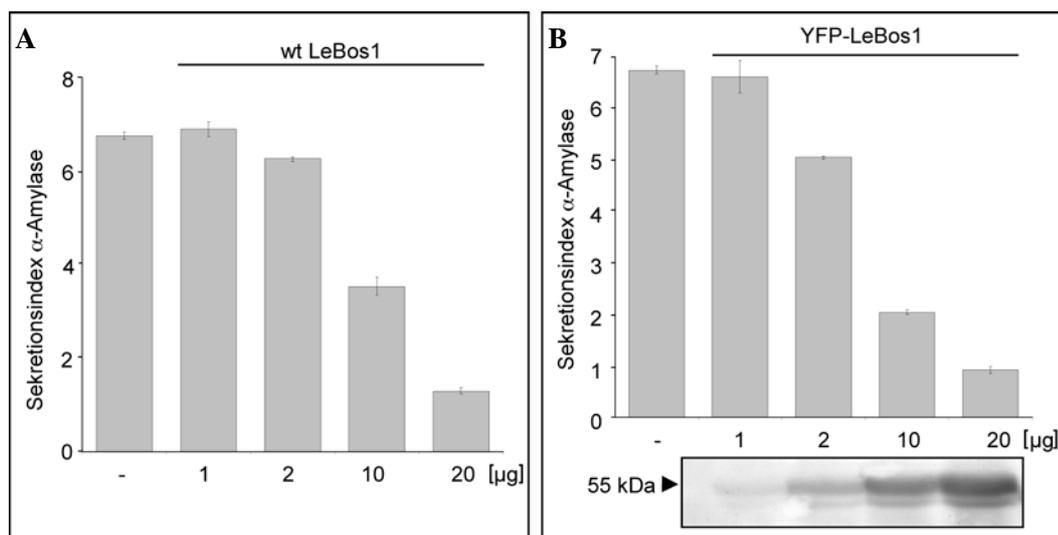


Abb. 2.18: Einfluss von wt LeBos1 (A) und YFP-LeBos1 (B) auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μg des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das wt LeBos1 bzw. YFP-LeBos1 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μg , 2 μg , 10 μg und 20 μg wt LeBos1 bzw.

YFP-LeBos1 Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper dokumentiert die Expression des Fusionsproteins YFP-LeBos1 (B).

2.5.2. Das Qb-SNARE LeBos1 ist am Golgi-Apparat lokalisiert

Zur Lokalisierung von YFP-LeBos1 in Tabak-Protoplasten wurden jeweils 2 μ g Plasmid-DNA des YFP-LeBos1 codierenden Plasmids pJB31 für die Genexpression eingesetzt und 7 – 15 Stunden bei 25°C inkubiert. Bei Einsatz dieser Menge an Plasmid-DNA war die Inhibition der Sekretion des Reporters α -Amylase bereits detektierbar (Abb. 2.18 B), führte aber nicht zu einem drastischen Absinken der Sekretion, sodass man davon ausgehen kann, dass das Transportsystem des Protoplasten noch überwiegend intakt war. Zur Überprüfung der Lokalisierung von YFP-LeBos1 wurden Koexpressionen mit YFP-LeBos1 und ManI-RFP kodierender Plasmid DNA in Tabak-Protoplasten durchgeführt. In Abbildung 2.19 A – C ist die Verteilung beider Signale nach nur 7 Stunden Inkubation dargestellt. Das YFP-Signal weist eine punktförmige Verteilung auf (Abb. 2.19 A). Das RFP-Signal des Golgi-Markers ManI-RFP ist im Gegensatz zur Kontrolle (Abb. 2.9 D) sowohl in tubulären Strukturen des ERs als auch auf vergrößerte punktförmige Strukturen verteilt (Abb. 2.19 B). Wie in Abbildung 2.19 C zu erkennen, gibt es eine gute Kolokalisation der vergrößerten punktförmigen Strukturen zwischen YFP-LeBos1 und dem Golgi-Marker. Es ist aber keine komplette Kolokalisierung der beiden punktförmigen Signale zu beobachten. Die weißen Pfeile in Abbildung 2.19 C deuten zusätzlich auf eine Einzelmarkierung des RFP-Signals hin. Vermutet wird, dass die Expression des SNARE-Proteins teilweise zu einer Umverteilung des Golgi-Markers in die tubulären Strukturen des ERs führt, was in Abbildung 2.19 B und C deutlich zu beobachten ist (weißer Pfeilkopf). Die Lokalisation des Golgi-Markers ManI-RFP wird bereits bei Koexpression von geringen Mengen YFP-LeBos1 beeinträchtigt, sodass der Golgi-Marker auch im ER und in Aggregaten zu beobachten ist.

In Abbildung 2.19 D ist die Expression von YFP-LeBos1 nach 15 Stunden Inkubation nach Elektroporation dargestellt. Das punktförmige YFP-Signal deutet auf eine punktförmige Golgi-Lokalisation hin. Nach Behandlung mit BFA fand eine Umverteilung des YFP-Signals in das ER statt. Allerdings verschwanden die punktförmigen YFP-Signale nicht komplett (Abb. 2.19 E und F), sodass ein ER-Golgi-Muster entstand.

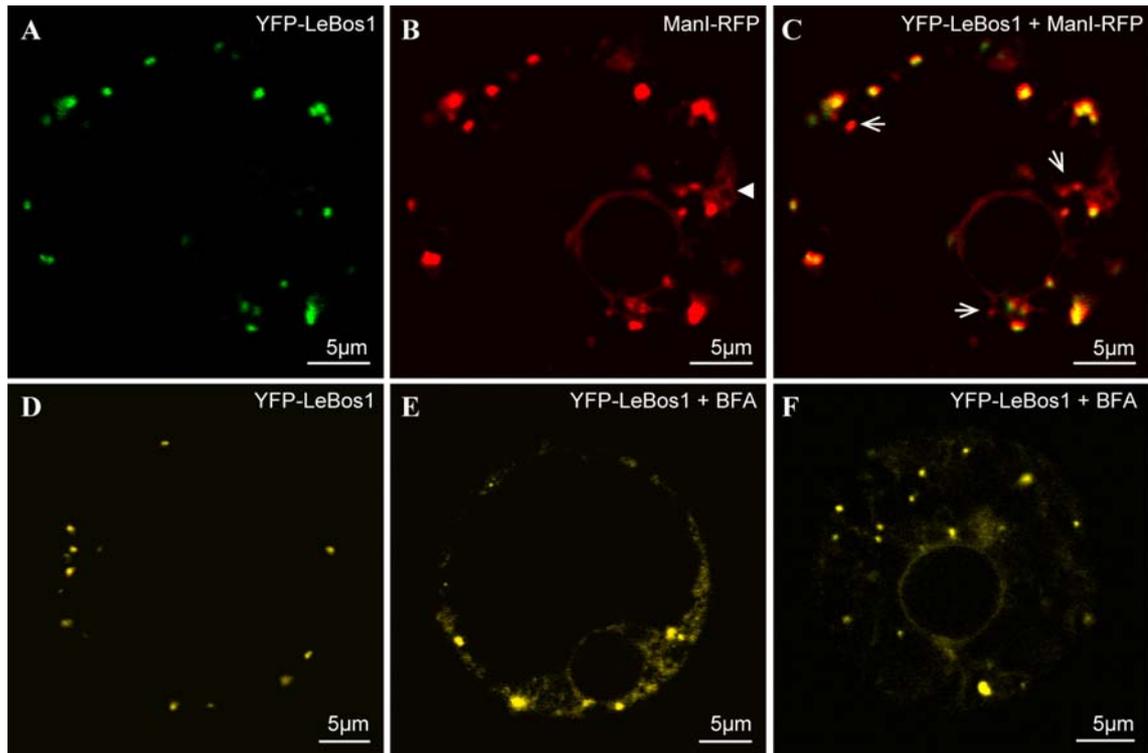


Abb. 2.19: Intrazelluläre Lokalisierung von YFP-LeBos1 in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 7 h (A – C) bzw. 15 h (D – F) Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 μg Plasmid-DNA eingesetzt. **A - C** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten, kotransformiert mit YFP-LeBos1 (A) und ManI-RFP (B). Das Overlay von YFP-LeBos1 und ManI-RFP ist in (C) dargestellt. Das YFP-Signal ist grün (A), das RFP-Signal rot (B) und der Merge gelb (C) dargestellt. **D** Aufnahme einer Ebene des Protoplasten, transformiert mit 2 μg YFP-LeBos1 Plasmid-DNA. **E** und **F** Zugabe von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BFA. Protoplasten wurden mit 2 μg YFP-LeBos1 Plasmid-DNA elektroporiert, 15 h inkubiert und weitere 2 h mit BFA versetzt. Es sind zwei verschiedene Protoplasten dargestellt. Das YFP-Signal in (D) – (F) ist gelb dargestellt.

2.5.3. Gewebeabhängigkeit der Expression von LeBos1

Auch hier wurden weitere Lokalisierungsstudien mittels Partikelbeschuss in Tabak BY-2 Zellsuspensionskulturzellen durchgeführt. Dazu wurden ebenfalls 2 μg YFP-LeBos1 und ManI-RFP kodierende Plasmid-DNA verwendet und die transfizierten BY-2 Zellen nach 15 Stunden Inkubation am CLSM untersucht (Abb. 2.20). Das YFP-Signal des SNARE-Proteins markiert mobile punktförmige Strukturen (Abb. 2.20 A), wohingegen das RFP-Signal des Golgi-Markers sowohl punktförmig, aber auch im ER zu beobachten ist (Abb. 2.20 B). Die punktförmigen Strukturen des ManI-RFP sind teilweise mit dem YFP-LeBos1 kolokalisiert (siehe Pfeile in Abb. 2.20 C), aber ein großer Teil des Golgi-Markers bleibt im ER zurück. Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Qb-SNARE bei Überexpression den Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat beeinflusst.

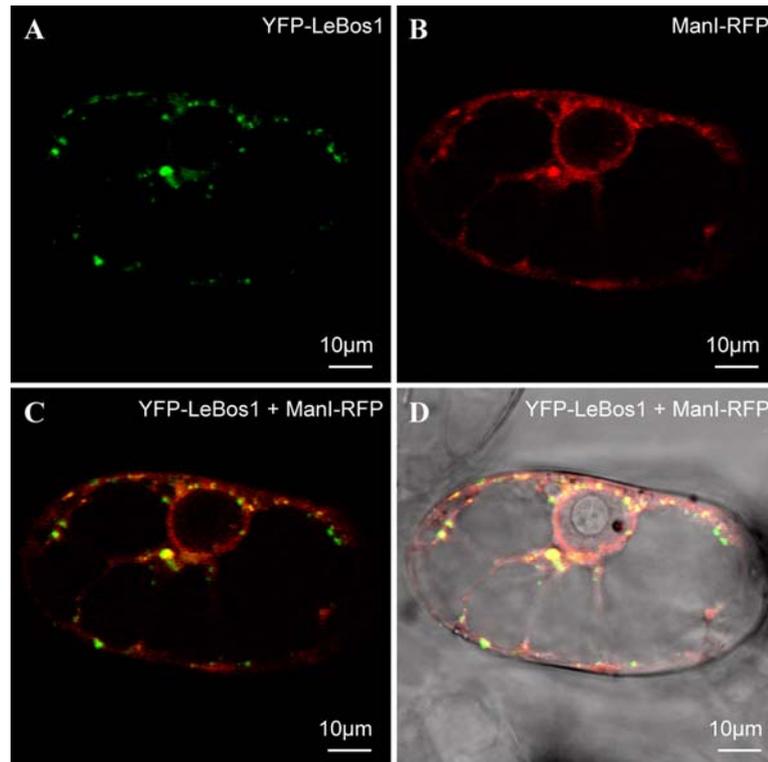


Abb. 2.20: Transiente Koexpression von YFP-LeBos1 und ManI-RFP in Tabak Wurzelzellsuspensionskulturen (BY-2). Die transformierten BY-2 Zellen wurden nach 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2,5 µg Plasmid-DNA von YFP-LeBos1 und ManI-RFP eingesetzt. Das YFP-Signal ist grün (A), das RFP-Signal rot (B) und der Merge gelb (C) dargestellt. Einzelbildaufnahmen einer Ebene der BY-2 Zelle von YFP-LeBos1 (A), ManI-RFP (B), des Overlays von YFP-LeBos1 und ManI-RFP (C) und des Overlays von YFP-LeBos1 und ManI-RFP mitsamt Durchlicht (D).

2.6. Die Überexpression des Syntaxins LeSed5 zeigt einen starken inhibitorischen Effekt auf den sekretorischen Weg

Ebenso wie in Hefen und Säugern gehören die Syntaxine zu den am meisten untersuchten pflanzlichen SNARE-Proteinen. Die große cytosolische N-terminale Region dieser SNARE-Proteine hat regulatorische Funktionen inne. Sly1, ein Vertreter der Sec1/Munc18 (SM) Proteinfamilie, bindet an das konservierte N-terminale Peptid von Sed5p bzw. Syntaxin 5 und stimuliert dadurch die Interaktion des SNAREs zur Ausbildung des *trans*-SNARE Komplexes am *cis*-Golgi (Peng and Gallwitz, 2002; Yamaguchi et al., 2002). Auch die Transmembrandomäne (TMD) der SNARE-Proteine scheint eine wichtige Rolle beim Fusionsprozess einzunehmen. Wird diese ersetzt oder ein kurzer Peptid-Linker zwischen das SNARE-Motiv und die TMD inseriert, kann der finale Schritt der Membranfusion blockiert oder negativ beeinträchtigt werden (McNew et al., 1999; McNew et al., 2000). Die Überproduktion von Sed5p in Hefen führt zur Inhibition des Zellwachstums und verlangsamt den ER-Golgi Transport sowohl anterograd als auch retrograd (Hardwick and Pelham, 1992; Wooding and Pelham, 1998; McNew et al.,

2000; Weinberger et al., 2005). Der Knockout des SNAREs in Hefen kann bis zur Letalität führen.

Um festzustellen, ob LeSed5 eine ebenso wichtige Rolle im ER-Golgi Transport einnimmt wie zum Beispiel das homologe Sed5p in Hefen wurden transiente Koexpressionen in Tabak-Protoplasten durchgeführt. Es wurde sowohl der Einfluss von LeSed5 als auch dessen N- und C-terminaler Deletionsmutanten HA-LeSed5 Δ NT, HA-LeSed5 Δ TMD und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD (Abb. 2.3) auf die Sekretion von α -Amylase untersucht. Des Weiteren wurden zur Lokalisierung des Syntaxins LeSed5 und dessen Deletionsmutanten transiente Expressionsstudien in Tabak-Protoplasten, BY-2 Suspensionszellen und Tabak-Epidermiszellen durchgeführt.

2.6.1. Funktionsnachweis mittels quantitativem Enzymtest

2.6.1.1. Funktion der einzelnen Domänen

Zur Überprüfung der Funktion der verschiedenen Domänen des Syntaxins, wie das N-terminale Peptid (NT) und die Transmembrandomäne (TMD), wurden neben dem HA-LeSed5 auch die N- und C-terminalen Deletionskonstrukte HA-LeSed5 Δ NT, HA-LeSed5 Δ TMD und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD verwendet (Abb. 2.3 D). Die quantitative Analyse der Sekretion von α -Amylase wurde mit einer konstanten Menge α -Amylase kodierenden Plasmids sowie steigenden Konzentrationen von Plasmid-DNA durchgeführt. Als Kontrolle diente eine Transfektion der Protoplasten mit dem α -Amylase kodierenden Plasmid alleine. Anschließend wurde jeweils 1-20 μ g Plasmid-DNA koelektroporiert. Nach 24 h Inkubation bei 25°C wurden die α -Amylase-Aktivitäten des Kulturmediums und der Zellen analysiert und photometrisch bestimmt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung vier unabhängiger Versuche. Zur Überprüfung der Expression von HA-LeSed5, HA-LeSed5 Δ NT, HA-LeSed5 Δ TMD und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD wurden Western-Blot-Analysen der Protoplasten mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper durchgeführt (Abb. 2.21 A-D).

Die Expression von HA-LeSed5 ist hoch effektiv und zeigt eine starke dosisabhängige Inhibition der Sekretion von α -Amylase. Der Western-Blot bestätigt die ebenfalls dosisabhängige Expression des 39 kDa Proteins. Bei Expression von 20 μ g Plasmid-DNA sinkt der Sekretionsindex auf ein Drittel des Ausgangswertes ab (Abb. 2.21 A). Ebenfalls inhibitorisch auf die α -Amylase-Sekretion wirkt die Überexpression der Deletionsmutante, der N-terminal 40 Aminosäuren und somit die Sly1-Bindungsstelle fehlen (Abb. 2.21 B). Der inhibitorische Effekt dieser Mutante erscheint sogar geringfügig stärker, was man anhand der Expressionsrate des Proteins (37 kDa) im Western-Blot erklären kann. Die Mutante HA-LeSed5 Δ NT wurde im Vergleich zu HA-LeSed5 stärker exprimiert. Schon bei Expression von 1 μ g HA-LeSed5 Δ NT kodier-

render Plasmid-DNA konnte das Protein im Western-Blot nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von HA-LeSed5 erst bei Einsatz von 5 μg Plasmid-DNA detektierbar war. Wie in Abbildung 2.21 C und D dargestellt, wird die Sekretion von α -Amylase durch die Überexpression beider cytosolischer Proteine, HA-LeSed5 Δ TMD und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD, nicht beeinträchtigt. Die Expressionsrate beider Proteine ist mit der von HA-LeSed5 vergleichbar, wie man anhand der Western-Blot-Analysen in Abbildung 2.21 A, C und D erkennen kann. Somit scheint die TMD eine wichtige Rolle im Fusionsprozess des SNARE-Proteins zu spielen. Diese Eigenschaft besitzt auch das Syntaxin des Prävakuolären Kompartiments (PVC) At-SYP21 (Foresti et al., 2006), wohingegen das Plasmamembran Syntaxin NtSYP121 aus Tabak dieses Charakteristikum nicht teilt (Geelen et al., 2002).

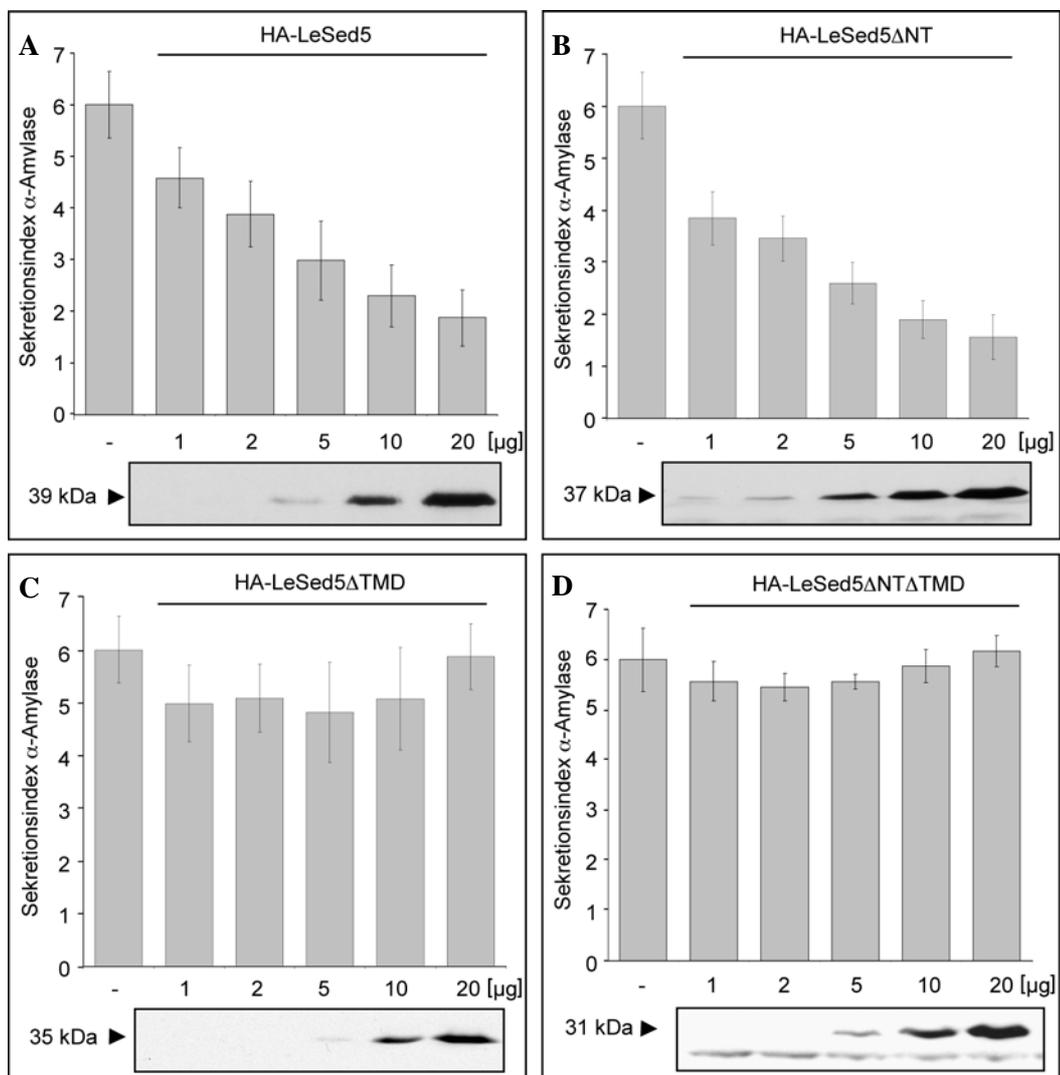


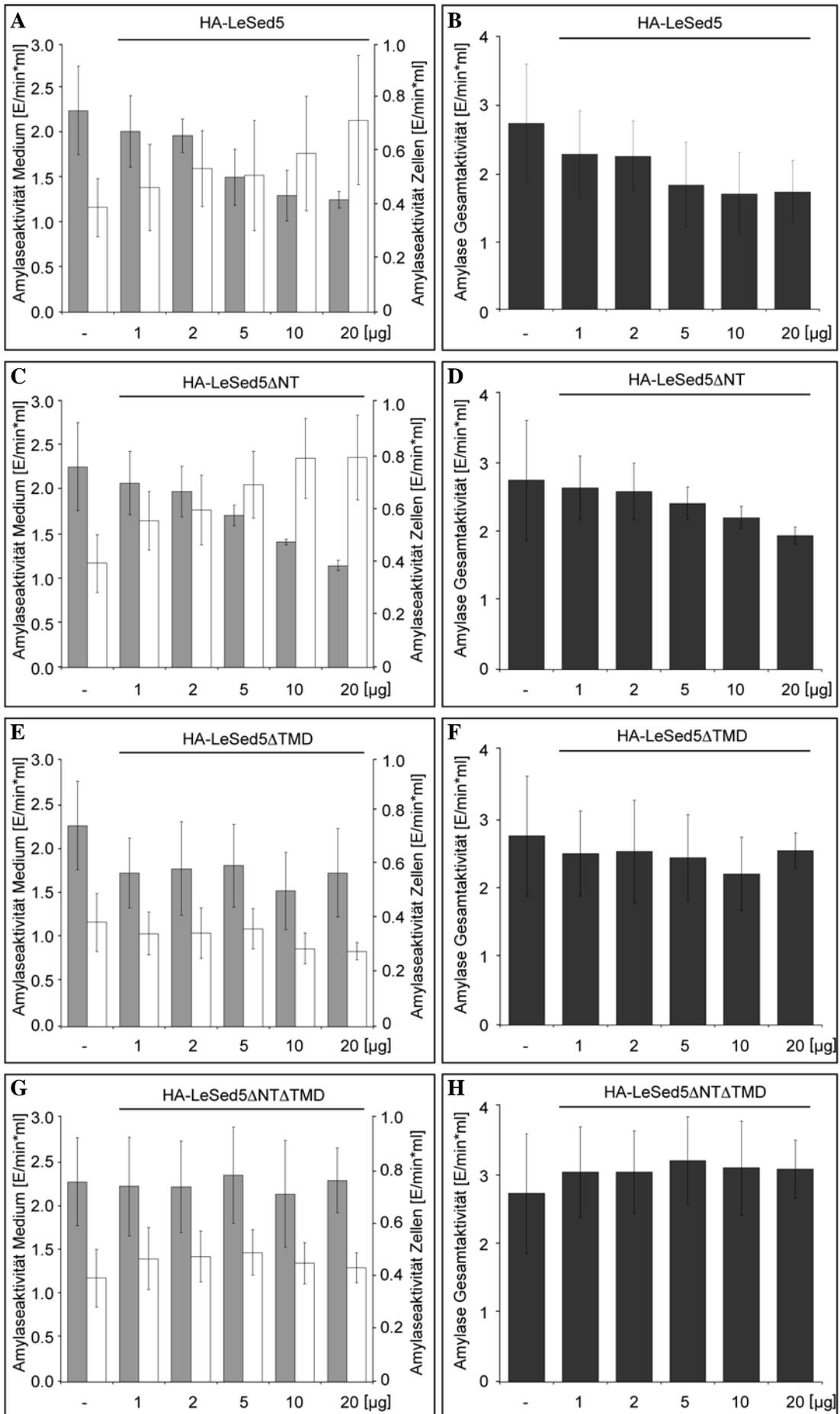
Abb. 2.21: Einfluss von HA-LeSed5 (A), HA-LeSed5 Δ NT (B), HA-LeSed5 Δ TMD (C) und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD (D) auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μg des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das HA-LeSed5, HA-LeSed5 Δ NT, HA-LeSed5 Δ TMD bzw. HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μg , 2 μg , 5 μg , 10 μg und 20 μg HA-LeSed5 (A), HA-LeSed5 Δ NT (B), HA-LeSed5 Δ TMD (C) bzw. HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD (D) Plasmid-DNA ge-

zeigt (Säule 2-6). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analysen mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper dokumentieren die Expression der Proteine.

Die zusätzliche Darstellung der Aktivität von α -Amylase im Kulturmedium und in den Zellen bei Koexpression der einzelnen HA-LeSed5 Derivate (Abb. 2.22 A, C, E + G) zeigt den Effekt der Umverteilung des Reporterproteins deutlich auf.

Nur bei Koexpression der beiden Membranproteine HA-LeSed5 und HA-LeSed5 Δ NT mit der α -Amylase ist ein Anstieg der α -Amylase-Aktivität in den Zellen (weiße Säulen) und ein Absinken der α -Amylase-Aktivität im Medium (graue Säulen) zu beobachten (Abb. 2.22 A und C). Anhand der Gesamtaktivitäten in Abbildung 2.22 B, D, F und H lässt sich feststellen, dass die Syntheserate von α -Amylase bei Koexpression der cytosolischen Proteine HA-LeSed5 Δ TMD und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD nicht beeinträchtigt wird, diese aber bei Expression der Membranproteine dosisabhängig reduziert wird. Bei Einsatz von 20 μ g HA-LeSed5 und HA-LeSed5 Δ NT kodierender Plasmid-DNA sinkt die Neusynthese von α -Amylase um ein Drittel ab.

Abb. 2.22: Einfluss von HA-LeSed5 (**A**), HA-LeSed5 Δ NT (**C**), HA-LeSed5 Δ TMD (**E**) und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD (**G**) auf die Aktivität von α -Amylase in Kulturmedium und Zellen bzw. die Gesamtaktivität von α -Amylase bei Kotransformation von HA-LeSed5 (**B**), HA-LeSed5 Δ NT (**D**), HA-LeSed5 Δ TMD (**F**) und HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD (**H**). Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das HA-LeSed5, HA-LeSed5 Δ NT, HA-LeSed5 Δ TMD bzw. HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist die Aktivität in Medium und Zellen bzw. die Gesamtaktivität von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g HA-LeSed5 (**A** bzw. **B**), HA-LeSed5 Δ NT (**C** bzw. **D**), HA-LeSed5 Δ TMD (**E** bzw. **F**) bzw. HA-LeSed5 Δ NT Δ TMD (**G** bzw. **H**) Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-6). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die α -Amylase-Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase-Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt (**B**, **D**, **F** und **H**).



2.6.1.2. Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von LeSed5

Um festzustellen zu welchem Zeitpunkt der inhibitorische Effekt von HA-LeSed5 auf die Sekretion und die Neusynthese von α -Amylase eintritt und ob diese beiden Effekte miteinander korrelieren wurde die Sekretion des Reporterproteins mittels einer Zeitreihe untersucht. Dazu wurde ein Teil der Tabak-Protoplasten mit dem α -Amylase kodierenden Plasmid alleine und der andere Teil zusammen mit 5 μ g des für HA-LeSed5 kodierenden Plasmids zur Genexpression durch Elektroporation transfiziert. Wie in Abbildung 2.21 A dargestellt, sinkt die Sekretion von α -Amylase bei Einsatz von 5 μ g HA-LeSed5 Plasmid-DNA nach 24 Stunden Inkubation bis zu 50 Prozent ab und die Neusynthese von α -Amylase wird um ein Drittel reduziert (Abb. 2.22 B). Nach Inkubation von 0, 1, 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden wurden Protoplasten sowie Kulturmedium geerntet, die Aktivität der α -Amylase gemessen und die beiden Zeitkurven miteinander verglichen.

Wie in Abbildung 2.23 dargestellt, tritt die Inhibition der Sekretion von α -Amylase bei Überexpression von HA-LeSed5 bereits nach 1 Stunde Inkubation auf und setzt sich kontinuierlich fort. Anfangs scheint dieser Effekt ausschließlich eine Konsequenz der Inhibition des sekretorischen Weges im Protoplasten zu sein, da die Gesamtaktivität und damit die Synthese von α -Amylase nicht reduziert wurde. Erst nach 4 Stunden Inkubation findet eine Reduktion der Gesamtaktivität bzw. Synthese von α -Amylase statt. Ab diesem Zeitpunkt wirkt sich die Überproduktion des SNAREs toxisch auf die Protoplasten aus und die Inhibition der α -Amylase Sekretion ist sowohl auf die Blockade des sekretorischen Weges als auch auf die Toxizität des SNAREs an sich zurückzuführen. Über den gesamten Zeitraum hinweg wurden Proben zur anschließenden Western-Blot-Analyse entnommen und die Expression von HA-LeSed5 mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper detektiert. Bis zu einer Inkubation von 16 Stunden erhöht sich die Expressionsrate von HA-LeSed5 kontinuierlich, die Stärke der Bande nimmt zu, aber anschließend wird sie wieder schwächer und die Expression des SNAREs nimmt drastisch ab (Abb. 2.23 A). Diese Reduktion ist höchstwahrscheinlich auf die Toxizität des SNARE-Proteins auf den Transportweg und damit zusammenhängend auf den reduzierten Stoffwechsel der Protoplasten zurückzuführen.

Um den inhibitorischen Effekt von LeSed5 auf die Sekretion von löslichen Proteinen im Allgemeinen zu unterstreichen, wurde ein sekretorisches GFP als zusätzliches Reporterprotein verwendet. Das sekretorische GFP (secGFP) wurde bereits erfolgreich als Reporterprotein des sekretorischen Weges verwendet (Geelen et al., 2002; Brandizzi et al., 2003; Tyrrell et al., 2007) und kann mit anti-GFP Antikörpern in einem Western-Blot sehr effizient detektiert werden. Durch die Fusion des Signalpeptids von Sporamin an den N-terminus des GFP-Proteins wird dieses in das ER geschleust und anschließend als lösliches Protein mittels „bulk flow“ über den Golgi-Apparat und die Plasmamembran sekretiert (Brandizzi et al., 2003).

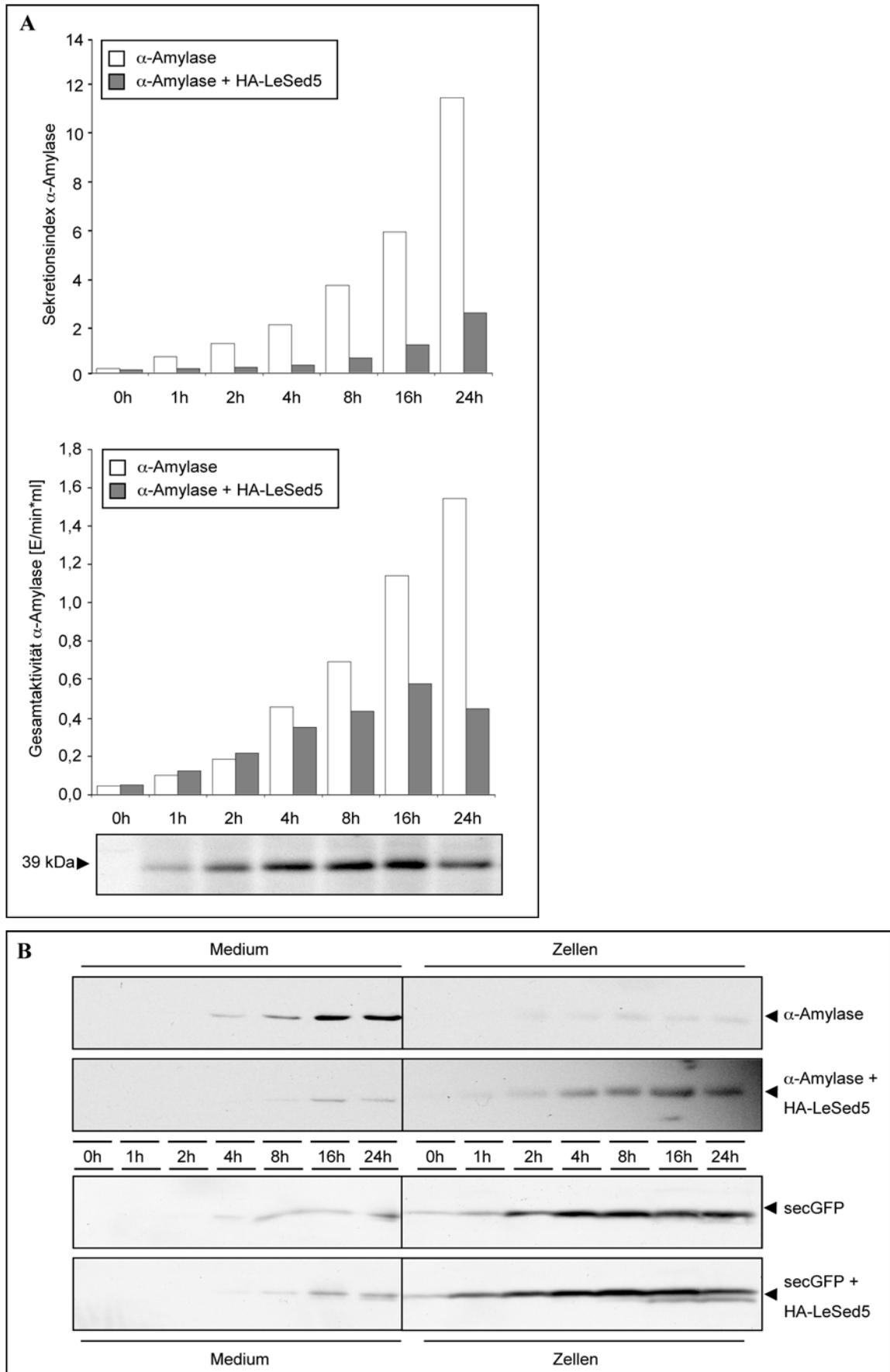


Abb. 2.23: Einfluss von HA-LeSed5 auf die Sekretion (A oben, B oben) bzw. die de novo Synthese von α -Amylase (A unten) sowie auf die Sekretion des sekretorischen GFP (secGFP) (B unten) in Tabak-

Protoplasten über einen Zeitraum von 24 h. **A** Transiente Genexpression von je 5 µg des α -Amylase kodierenden Plasmids alleine (weiße Säulen) oder zusammen mit 5 µg HA-LeSed5 kodierenden Plasmids (graue Säulen) in Protoplasten. Vergleichend dargestellt ist der Sekretionsindex von α -Amylase (oben) bzw. die Gesamtaktivität von α -Amylase in Medium und Zellen (unten) bei Expression mit und ohne HA-LeSed5. Zellen und Kulturmedium wurden jeweils nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen anti-HA Antikörper dokumentiert die Expression des Proteins HA-LeSed5 über den gesamten Zeitraum. **B** Vergleich der Proteinverteilung der Reporterproteine α -Amylase (oben) und sekretorischen GFP (unten) in Kulturmedium und Zellen mit und ohne Koexpression des Effektorproteins HA-LeSed5. Die Expression der Reporterproteine wurde mittels Western-Blot-Analysen mit den anti-Amylase bzw. anti-GFP Antikörpern überprüft und nachgewiesen.

In Abbildung 2.23 B ist der Verlauf der Sekretion sowohl der α -Amylase als auch des sekretorischen GFP als Reporterprotein mit und ohne Einfluss des Effektorproteins HA-LeSed5 mittels Western-Blot dargestellt. Parallel zu den beiden Zeitreihen der Expression der α -Amylase mit und ohne HA-LeSed5 (Abb. 2.23 A) wurden unter den gleichen Bedingungen ebenfalls zwei Zeitreihen der Expression des secGFP mit und ohne HA-LeSed5 in Tabak-Protoplasten durchgeführt. Die Proteine im Kulturmedium wurden mittels Ammoniumsulfat-Fällung 10fach konzentriert, sodass eine Detektion der Reporterproteine α -Amylase und secGFP gewährleistet wurde. Die jeweiligen Medien- und Zellproben aller vier Zeitreihen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die α -Amylase bzw. das secGFP mit anti- α -Amylase bzw. anti-GFP Antikörpern nachgewiesen. Ohne den Effektor HA-LeSed5 sind die beiden Reporterproteine bereits nach 4 Stunden im Medium zu detektieren, wohingegen bei Anwesenheit von HA-LeSed5 die Sekretion dieser Reporter verzögert wurde und weniger α -Amylase bzw. secGFP ins Medium gelangt. Im Umkehrschluss konnte bei Koexpression von HA-LeSed5 mehr Reporterprotein in den Zellen nachgewiesen werden, woraus man schließen kann, dass die Sekretion dieser Proteine inhibiert wurde und diese somit in den Zellen angereichert wurden.

2.6.1.3. Einfluss des Wildtyp-Proteins LeSed5 auf den gekoppelten ER-Golgi Transport

Um sicherzustellen, dass das HA-Epitop am N-Terminus von LeSed5 keinen Einfluss auf die Funktionalität des SNARE-Proteins hat, wurde das Wildtyp-Protein LeSed5 (wt LeSed5) transient in Tabak-Protoplasten exprimiert. Es wurden die gleichen Bedingungen wie bei der Expression von HA-LeSed5 gewählt (vergleiche Abb. 2.21 A). Nach der Elektroporation wurden die Protoplasten 24 h bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die α -Amylase-Aktivitäten des Kulturmediums und der Zellen wurden anschließend analysiert und photometrisch bestimmt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche.

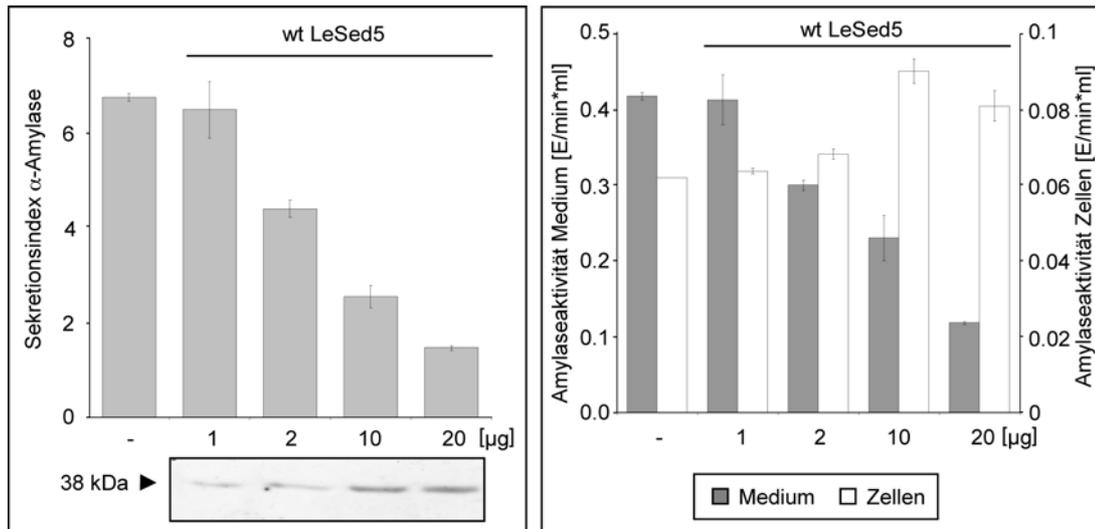


Abb. 2.24: Einfluss von wt LeSed5 auf die Sekretion von α -Amylase (A) bzw. Aktivität von α -Amylase in Kulturmedium und Zellen bei Kotransformation von wt LeSed5 (B). Transiente Genexpression von je 5 µg des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das wt LeSed5 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex (A) bzw. die Aktivität (B) von α -Amylase bei Koexpression von 1 µg, 2 µg, 10 µg und 20 µg wt LeSed5 Plasmid DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-AtSYP31 Antikörper dokumentiert die Expression des Wildtyp-Proteins LeSed5 (A). Die α -Amylase-Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase-Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt (B).

Das Wildtyp-Protein LeSed5 wirkt sich stark inhibitorisch auf die Sekretion von α -Amylase aus (Abb. 2.24 A). Auch hier ist es ein dosisabhängiger Effekt. Bei ansteigender Menge des Effektors LeSed5 sinkt die α -Amylase-Aktivität im Medium kontinuierlich ab, gleichzeitig erhöht sich die Aktivität in den Zellen und ansteigende Mengen an α -Amylase werden in den Zellen angereichert. Hohe Konzentrationen eingesetzter LeSed5 kodierender Plasmid-DNA (10 µg und 20 µg) führt zu einer verminderten *de novo* Synthese von α -Amylase (Abb. 2.24 B). Die Expression des Syntaxins aus *L. esculentum* (38 kDa) ließ sich mit dem Antikörper gegen das homologe AtSYP31 aus *A. thaliana* nachweisen (Abb. 2.24 A).

Es stellt sich nun die Frage bei welchem Schritt des sekretorischen Weges die Inhibition der Sekretion von α -Amylase bei Koexpression von LeSed5 stattfindet. Der Transport vom ER zum Golgi-Apparat und zurück ist ein sehr sensibles System. Wird der anterograde Transport vom ER zum Golgi inhibiert bricht auch der retrograde Transport vom Golgi zum ER zusammen, wie bereits am Beispiel des AtSar1 gezeigt werden konnte (Phillipson et al. 2001). Tritt die Inhibition erst innerhalb des Golgi-Apparates (intra-Golgi) oder gar post-Golgi auf, so sollte der retrograde Transport nur gering beeinflusst werden. Das Protein α -AmylaseHDEL eignet sich sehr gut als Reporter des retrograden COPI-abhängigen Transports, da es sowohl dem ante-

rograden als auch dem retrograden Transportweg zwischen dem ER und dem *cis*-Golgi folgt (Pimpl et al., 2000; Phillipson et al., 2001).

Unter gleichen Bedingungen wurden nun transiente Expressionsstudien mit dem Wildtyp-Protein LeSed5 (wt LeSed5) und α -Amylase bzw. α -AmylaseHDEL als Reporter durchgeführt. Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. In Abbildung 2.25 ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Überexpression von wt LeSed5 durch graue Säulen und der Sekretionsindex von α -AmylaseHDEL durch weiße Säulen dargestellt. Die dazugehörige Skala des Sekretionsindex der α -Amylase ist links und die Skala des Sekretionsindex von α -AmylaseHDEL ist rechts im Diagramm dargestellt.

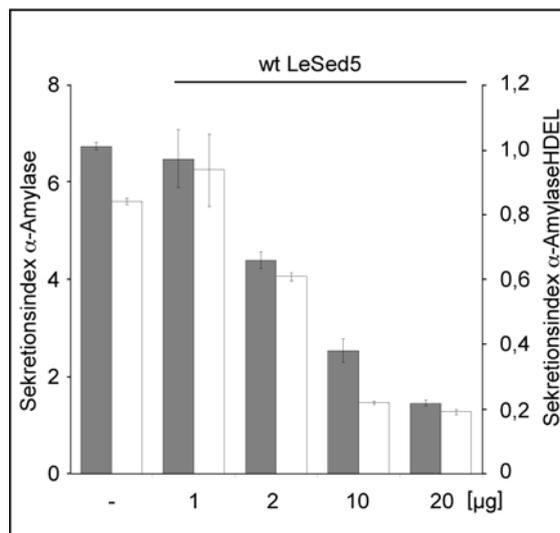


Abb. 2.25: Einfluss von wt LeSed5 auf die Sekretion von α -Amylase und α -Amylase-HDEL bei Kotransformation von wt LeSed5. Transiente Genexpression von 5 μ g α -Amylase bzw. α -Amylase-HDEL kodierenden Plasmids ohne das wt LeSed5 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bzw. α -Amylase-HDEL bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g wt LeSed5 Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Sekretion von α -Amylase bzw. α -Amylase-HDEL durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Der Sekretionsindex von α -Amylase ist durch graue Säulen, der Sekretionsindex von α -Amylase-HDEL durch weiße Säulen dargestellt.

Das Syntaxin LeSed5 beeinträchtigt beide Reporterproteine in gleicher Weise. Die Sekretionsindices beider Reporter zeigen eine starke dosisabhängige Inhibition bei Koexpression von LeSed5 (Abb. 2.25). Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Überproduktion von LeSed5 den anterograden COPII-abhängigen Transport vom ER zum *cis*-Golgi inhibiert.

Der Vergleich der Aktivität von sekretiertem α -AmylaseHDEL im Medium (graue Säulen) und der Aktivität in der Zelle (weiße Säulen), wie in Abbildung 2.26 dargestellt, macht deutlich, dass je mehr LeSed5 eingesetzt wird desto weniger α -AmylaseHDEL sekretiert wird. Allerdings findet hier keine Anreicherung von α -AmylaseHDEL in den Zellen statt. Zusammenfas-

send kann man daraus schließen, dass die Überproduktion des Syntaxins LeSed5 den ER-Golgi Transport nach 24 Stunden Inkubation fast vollständig zum Erliegen bringt.

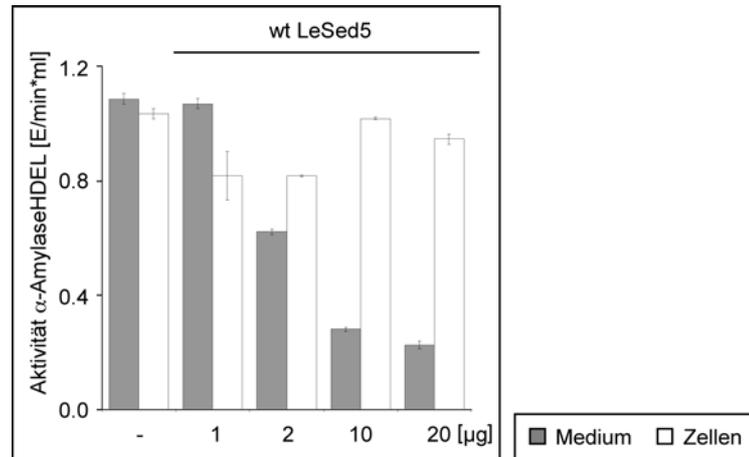


Abb. 2.26: Aktivität von α -AmylaseHDEL in Kulturmedium und in den Zellen bei Kotransformation von wt LeSed5. Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Aktivität durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Das erste Säulenpaar dient als Positivkontrolle und zeigt die Aktivität von α -Amylase-HDEL nach Einsatz von 5 μ g α -Amylase-HDEL Plasmid zur Transformation. In den folgenden Säulenpaaren ist die Aktivität von α -Amylase-HDEL bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g wt LeSed5 Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-5). Die α -Amylase-Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase-Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt.

2.6.2. Lokalisierungsstudien der LeSed5 Derivate

2.6.2.1. Funktionsnachweis der YFP-LeSed5-Fusionsproteine

Um Lokalisierungsstudien von LeSed5 und dessen Deletionsmutanten LeSed5 Δ NT und LeSed5 Δ TMD am CLSM durchführen zu können, wurde das Fluoreszenzprotein YFP über einen kurzen unstrukturierten Peptidlinker an den jeweiligen N-Terminus fusioniert. Alle drei Fusionsproteine wurden zunächst auf ihre Funktionalität mittels transients Koexpressionsstudien in Tabak-Protoplasten überprüft. Es wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie bei den Genexpressionsstudien der HA-LeSed5 Konstrukte. Die Messungen wurden jeweils als Doppelproben durchgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. Die dosisabhängige Expression aller drei YFP-Fusionsproteine in den Tabak-Protoplasten konnte mit Hilfe des polyklonalen anti-GFP Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 2.27 A - C).

Die Abbildung 2.27 zeigt, dass der N-terminale YFP-Tag die Funktion der Proteine nicht beeinflusst. Die beiden Fusionsproteine YFP-LeSed5 und YFP-LeSed5 Δ NT inhibieren die Sekretion von α -Amylase in gleicher Weise wie die HA-Fusionsproteine (Abb. 2.21 A und B) und das Wildtyp-Protein LeSed5 (Abb. 2.24 A). Die Koexpression des cytosolischen Deletionsproteins YFP-LeSed5 Δ TMD führt lediglich zu einer schwächeren Sekretionsrate von α -Amylase, wel-

che aber nicht dosisabhängig ist und daher die de novo Synthese von α -Amylase allgemein verlangsamt. Da aber kein Unterschied der α -Amylase-Sekretion bei Einsatz von 1 μ g oder 20 μ g Plasmid DNA zu erkennen ist, kann man hier einen inhibitorischen Effekt auf den sekretorischen Weg ausschließen.

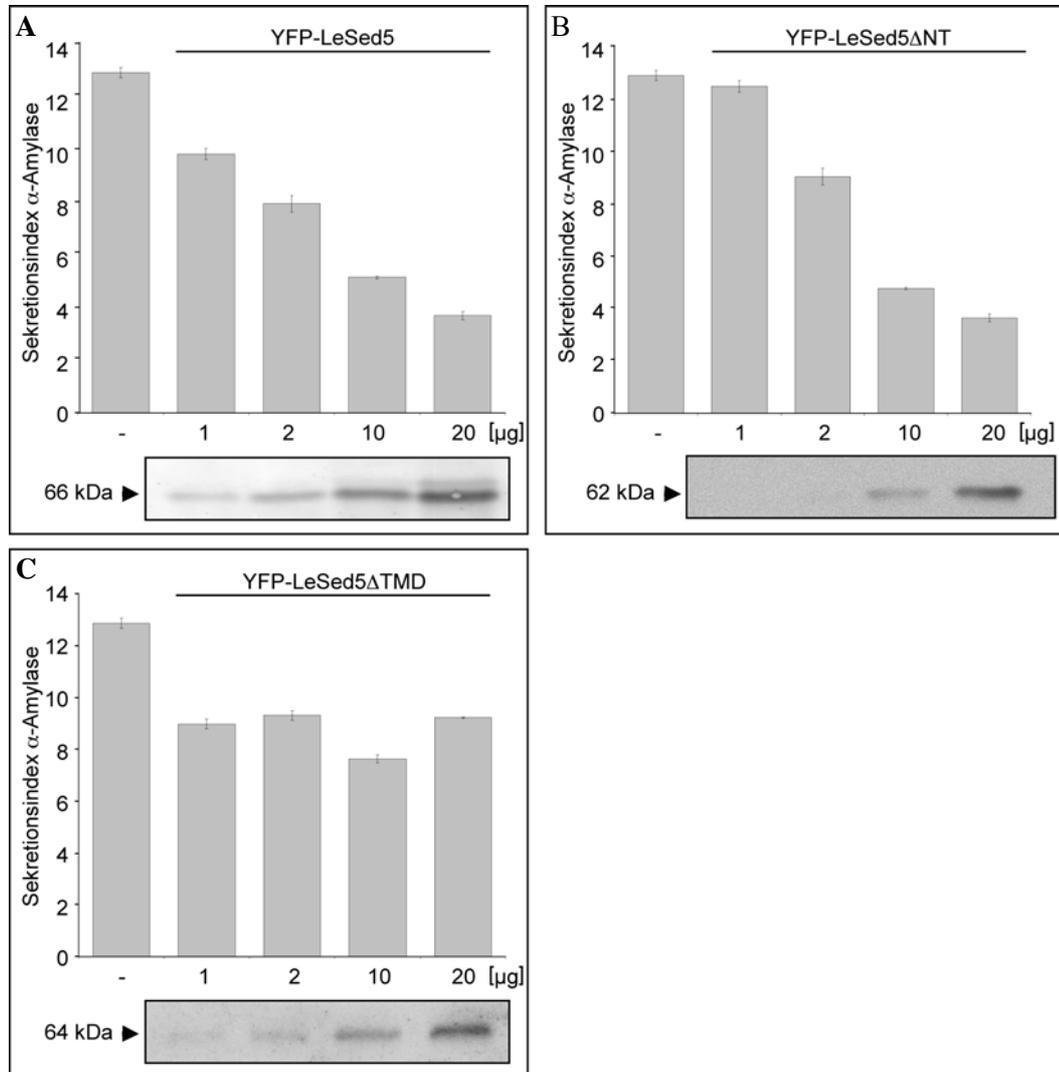


Abb. 2.27: Einfluss von YFP-LeSed5 (A), YFP-LeSed5 Δ NT (B) und YFP-LeSed5 Δ TMD (C) auf die Sekretion von α -Amylase. Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das YFP-LeSed5, YFP-LeSed5 Δ NT und YFP-LeSed5 Δ TMD kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 2 μ g, 10 μ g und 20 μ g YFP-LeSed5, YFP-LeSed5 Δ NT und YFP-LeSed5 Δ TMD Plasmid-DNA gezeigt (Säule 2-5). Zellen und Medium wurden nach 24 h Expression geerntet und die Aktivität der α -Amylase durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analysen mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper dokumentieren die Expression der Fusionsproteine YFP-LeSed5 (A), YFP-LeSed5 Δ NT (B) und YFP-LeSed5 Δ TMD (C).

2.6.2.2. Lokalisierungsstudien des Syntaxins in Tabak-Protoplasten

Zur Lokalisierung von LeSed5 und dessen Deletionsmutanten LeSed5 Δ NT und LeSed5 Δ TMD in Tabak-Protoplasten wurden zunächst transiente Koexpressionen der jeweiligen YFP-Fusionsproteine mit dem Golgi-Marker ManI-RFP durchgeführt. Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von YFP-LeSed5 und YFP-LeSed5 Δ NT auf den COPII-abhängigen Transport wurden für die Genexpression je 2 μ g Plasmid-DNA von pJB21 (YFP-LeSed5), pJB29 (YFP-LeSed5 Δ NT) und pJB28 (YFP-LeSed5 Δ TMD) eingesetzt und eine kurze Inkubationszeit gewählt. Bei Einsatz dieser Menge an Plasmid-DNA wird die Sekretion des Reporters α -Amylase ungefähr um ein Drittel verringert (Abb. 2.27 A und B). Die Protoplasten wurden daher jeweils mit 2 μ g Plasmid-DNA der YFP-LeSed5 codierenden Plasmide und mit 5 μ g ManI-RFP kodierender Plasmid-DNA koelektroporiert, bis zu 7 Stunden bei 25°C inkubiert und anschließend am CLSM untersucht (Abb. 2.28 A – I).

Die Überexpression von YFP-LeSed5 als auch von YFP-LeSed5 Δ NT führt bereits nach 7 Stunden Inkubation zur Lokalisation des Golgi-Markers in das ER (Abb. 2.28 A – F). Die YFP-Signale des „full length“ Proteins YFP-LeSed5 und der N-terminalen Deletionsmutante YFP-LeSed5 Δ NT sind punktförmig und variieren in der Größe zwischen 1 – 3 μ m. Diese Signale sind eindeutig größer als die typischen Signale des Golgi-Markers (Abb. 2.15 D). In weiteren Zeitstudien mit Protoplasten konnte gezeigt werden, dass die großen punktförmigen YFP-Signale keine Mobilität aufweisen (Daten nicht gezeigt). Da das Signal von ManI-RFP nicht mehr in den typischen Strukturen des Golgi-Apparates zu finden ist, kann man nicht feststellen, ob diese großen punktförmigen YFP-Signale vergrößerte oder aggregierte Golgi-Zisternen darstellen. Die Überexpression der C-terminalen Deletionsmutante YFP-LeSed5 Δ TMD stellt ein cytosolisches Signal dar und hat keinen Effekt auf das typisch punktierte Signal des Golgi-Markers (Abb. 2.28 G – I). Diese Fluoreszenzdaten bestätigen die Ergebnisse der quantitativen Enzymtests mit dem Reporterprotein α -Amylase.

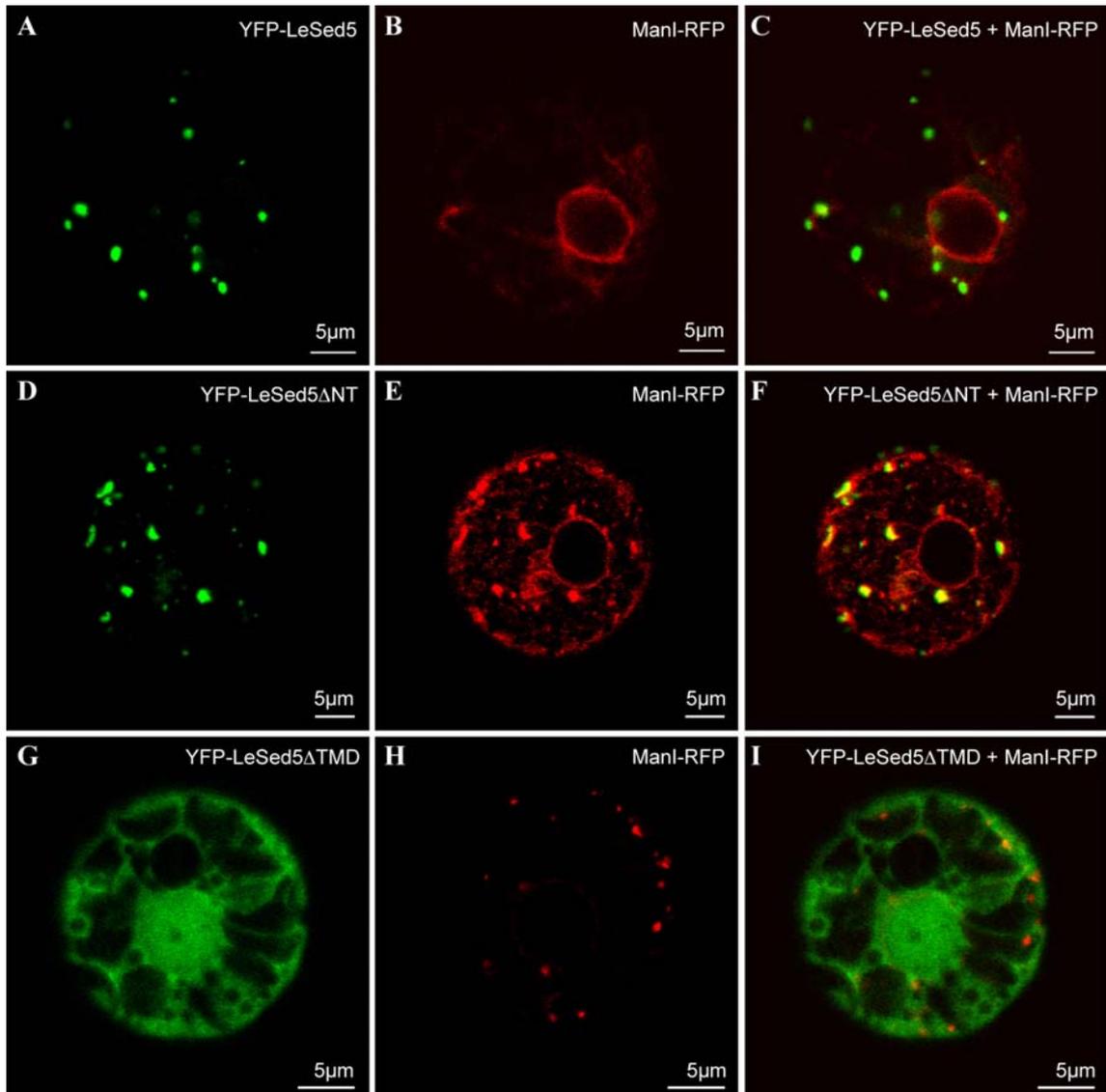
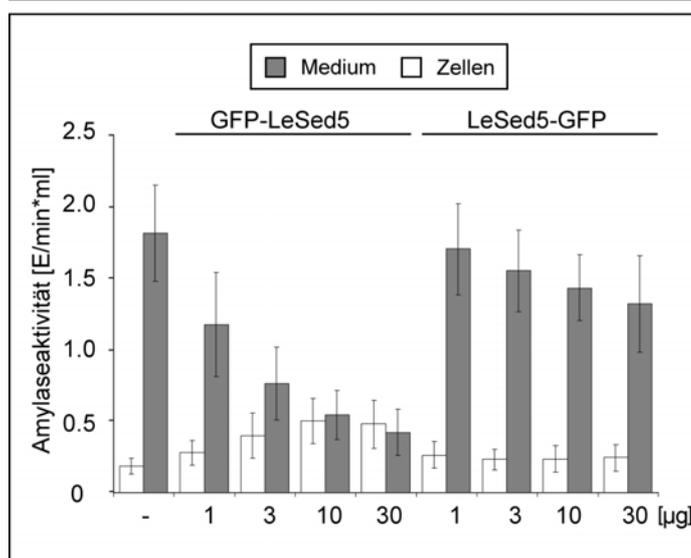
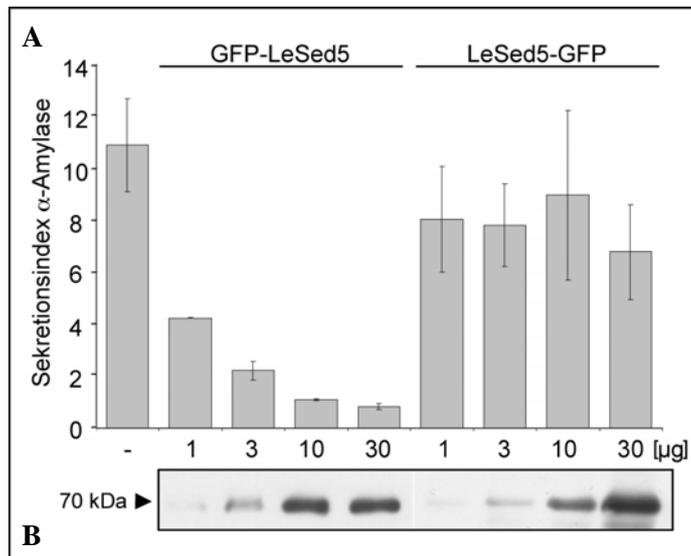


Abb. 2.28: Intrazelluläre Lokalisierung von YFP-LeSed5 (**A**), YFP-LeSed5ΔNT (**D**) und YFP-LeSed5ΔTMD (**G**) in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 7 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 μg Plasmid-DNA eingesetzt. **A - C** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten, kotransformiert mit YFP-LeSed5 (**A**) und ManI-RFP (**B**). Das Overlay von YFP-LeSed5 und ManI-RFP ist in (**C**) dargestellt. **D - F** Aufnahmen einer Ebene eines Protoplasten, kotransformiert mit YFP-LeSed5ΔNT (**D**) und ManI-RFP (**E**). Der Merge von YFP-LeSed5ΔNT und ManI-RFP ist in (**F**) abgebildet. **G - I** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten, kotransformiert mit YFP-LeSed5ΔTMD (**G**) und ManI-RFP (**H**). Das Overlay von YFP-LeSed5ΔTMD und ManI-RFP ist in (**I**) dargestellt. Das YFP-Signal ist jeweils grün (**A**, **D** und **G**), das RFP-Signal rot (**B**, **E** und **H**) und der Merge gelb (**C**, **F** und **I**) dargestellt.

2.6.2.3. N- und C-terminale XFP-Fusionen des LeSed5 SNARE-Proteins zeigen unterschiedliche Effekte auf die Sekretion

In dieser Arbeit wurden bis dato alle durchgeführten Versuche mit HA- oder XFP-fusionierten SNARE-Proteinen am N-Terminus durchgeführt. Viele funktionelle Studien über SNARE-Proteine, die in Hefen (Rayner and Pelham, 1997; Wooding and Pelham, 1998; Burri et al., 2003) und Säugern (Dascher and Balch, 1996; Nagahama et al., 1996) durchgeführt wurden, verwendeten verschiedene Tags am N-Terminus der jeweiligen SNARE-Proteine. In diesen Studien konnte kein Funktionsverlust aufgrund der Tags festgestellt werden. Aufgrund der Arbeiten von Chatre et al. (2005), bei denen das XFP-Protein jeweils an den C-Terminus der am CLSM untersuchten SNARE-Proteine fusioniert wurde, erschien es von Nöten quantitativ zu testen, ob die Position des XFP-Proteins von Bedeutung ist. Daher wurden transiente Koexpressionen von α -Amylase mit N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteinen von LeSed5 in Tabak-Protoplasten durchgeführt und die Sekretionsindices miteinander verglichen.



α -Amylase-Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die α -Amylase-Aktivität in den Zellen durch weiße Säulen dargestellt (B).

Abb. 2.29: Einfluss von GFP-LeSed5 und LeSed5-GFP auf die Sekretion von α -Amylase (A) bzw. Aktivität von α -Amylase in Kulturmedium und Zellen bei Kotransformation von GFP-LeSed5 und LeSed5-GFP (B). Transiente Genexpression von je 5 μ g des α -Amylase kodierenden Plasmids ohne das GFP-LeSed5 bzw. LeSed5-GFP kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule 1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex (A) bzw. die Aktivität (B) von α -Amylase bei Koexpression von 1 μ g, 3 μ g, 10 μ g und 30 μ g GFP-LeSed5 (Säule 2-5) bzw. LeSed5-GFP (Säule 6-9) Plasmid-DNA gezeigt. Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Western-Blot-Analysen mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper dokumentieren die Expression der Fusionsproteine GFP-LeSed5 und LeSed5-GFP (A). Die α -Amylase-Aktivität des Mediums ist durch graue Säulen, die

Wie in Abbildung 2.29 A dargestellt, weist das C-terminale GFP-Fusionsprotein (LeSed5-GFP) fast keinen Effekt auf die Sekretion von α -Amylase auf, auch wenn 30 μ g Plasmid DNA eingesetzt wurde. Die Western-Blot-Analysen mit dem anti-GFP Antikörper zeigen, dass die Expressionsrate beider Fusionsproteine vergleichbar ist. Des Weiteren zeigt die Analyse der α -Amylase Aktivitäten in Medium und Zellen (Abb. 2.29 B), dass das GFP-LeSed5 (N-terminal) wie schon bereits beschrieben die *de novo* Synthese von α -Amylase dosisabhängig reduziert, wohingegen das LeSed5-GFP (C-terminal) kaum Einfluss auf die Synthese des Reporterproteins nimmt. Dies legt nahe, dass das GFP-Protein am C-Terminus des SNAREs die Funktion des Syntaxins stört.

2.6.2.4. Lokalisierungsstudien der C- und N-terminalen XFP-LeSed5-Fusionsproteine

Um die Lokalisierung der beiden Fusionsproteine GFP-LeSed5 (N-terminal) und LeSed5-GFP (C-terminal) miteinander zu vergleichen, wurden transiente Genexpressionen von beiden Konstrukten in Tabak-Protoplasten durchgeführt. Es wurde dabei auch überprüft ob die Expressionsdauer einen Effekt auf die Lokalisation der beiden GFP-Fusionsproteine hat (Abb. 2.30). Die Protoplasten wurden mit 2 μ g GFP-LeSed5 codierender Plasmid-DNA (pJB12) oder mit 5 μ g LeSed5-GFP codierender Plasmid-DNA (pJB13) elektroporiert und 7 Stunden (Abb. 2.30 A und G), 15 Stunden (Abb. 2.30 B und H) bzw. 24 Stunden (Abb. 2.30 C und I) inkubiert. Bei der Expression von LeSed5-GFP markiert das GFP-Signal jeweils punktförmige Strukturen, die sich im Laufe der Expressionsdauer weder in Form, Größe, Zahl oder Verteilung verändern. Die Expression von LeSed5-GFP bleibt über den ganzen Zeitraum konstant (Abb. 2.30 G – I). Um zu überprüfen ob dieses GFP-Signal am Golgi-Apparat lokalisiert ist, wurden die Protoplasten nach 7 Stunden Inkubation nach Elektroporation für weitere 2 Stunden mit 10 μ g/ml BFA behandelt. Diese Behandlung führte zu einer teilweisen Umverteilung des GFP-Signals in das ER (Abb. 2.30 J – L). Im Vergleich dazu führte die Expression des N-terminalen Fusionsproteins GFP-LeSed5 nur in Kurzzeitstudien (7 Stunden) zu einer gleichmäßigen punktförmigen Signalverteilung. Bei andauernder Expressionszeit kommt es zur Bildung von großen Aggregaten des GFP-Signals (Abb. 2.30 A – C). Die BFA-Behandlung der Protoplasten nach 7 Stunden Expression von GFP-LeSed5, wie in Abbildung 2.30 D – F dargestellt, beeinflusst nur leicht das GFP-Signal. Es bilden sich vermehrt kleine Aggregationen (siehe grüne Pfeile), aber zu einer klaren Umverteilung des Signals in das ER, wie im Falle von LeSed5-GFP, kam es nicht.

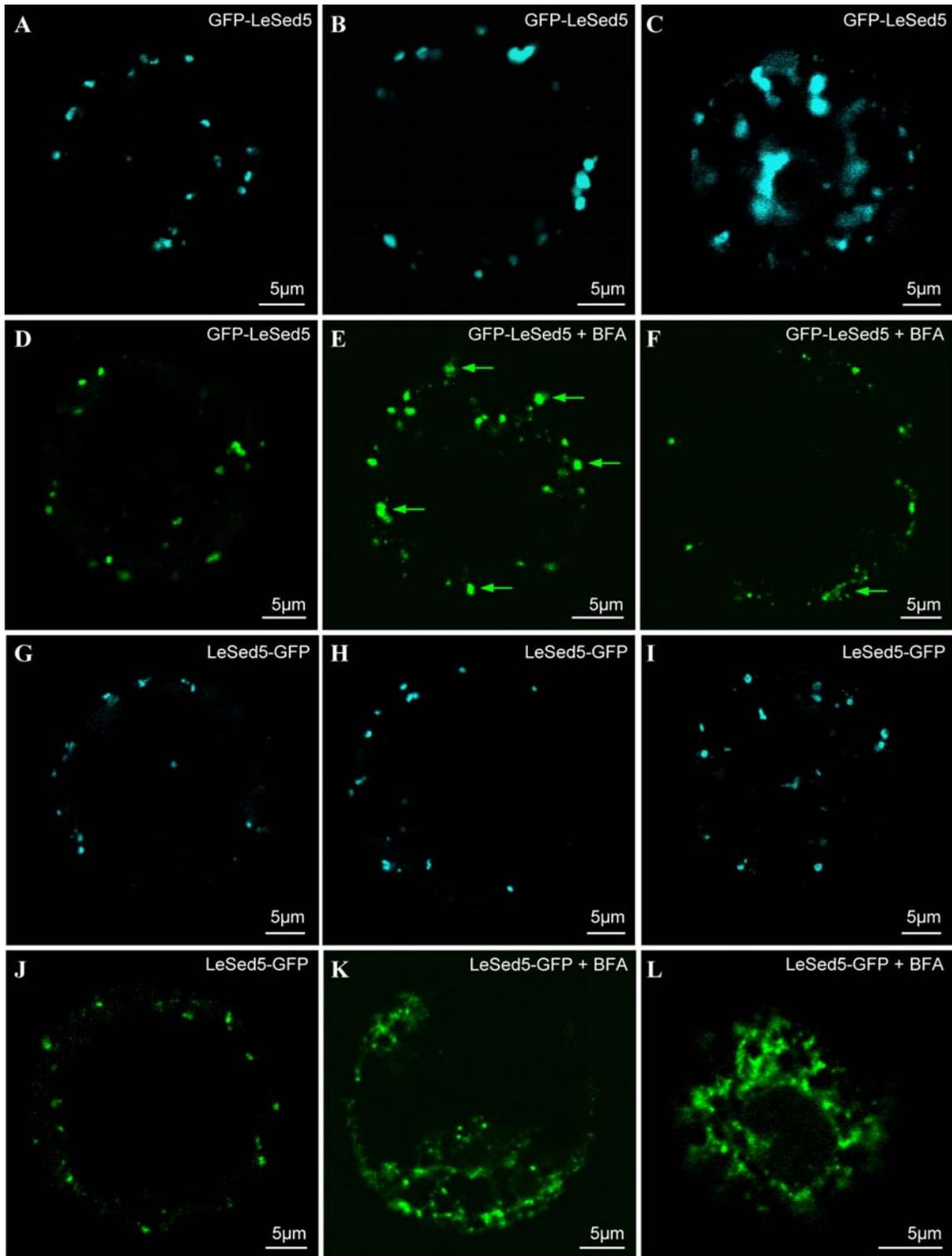


Abb. 2.30: Vergleich der Expression von GFP-LeSed5 (A - F) und LeSed5-GFP (G - L) in Tabak-Protoplasten. A - C Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten, transformiert mit 2 μ g GFP-LeSed5 Plasmid-DNA. Die Protoplasten wurden nach 7 h (A), 15 h (B) bzw. 24 h (C) Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Das GFP-Signal ist blau dargestellt. D - F Behandlung der transformierten Protoplasten mit BFA nach 7 h Expression. D Aufnahme einer Ebene des Protoplasten, transformiert mit 2 μ g GFP-LeSed5 Plasmid-DNA. E und F Zugabe von 10 μ g/ml BFA. Protoplasten wurden mit 2 μ g GFP-LeSed5 kodierender Plasmid-DNA elektroporiert, 7 h inkubiert und weitere 2 h mit BFA versetzt. Das GFP-Signal in (D) – (F) ist grün dargestellt. G - I Aufnahmen einer Ebene von Protoplasten, transformiert mit 5 μ g LeSed5-GFP kodierender Plasmid-DNA. Die Protoplasten wurden nach 7 h (G), 15 h

(H) bzw. 24 h (I) Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Das GFP-Signal ist blau dargestellt. **J – L** Behandlung der transformierten Protoplasten mit BFA nach 7 h Expression. **J** Aufnahme einer Ebene des Protoplasten, transformiert mit 5 µg LeSed5-GFP kodierender Plasmid-DNA. **K** und **L** Zugabe von 10 µg/ml BFA. Protoplasten wurden mit 5 µg LeSed5-GFP kodierender Plasmid-DNA elektroporiert, 7 h inkubiert und weitere 2 h mit BFA versetzt. Es sind zwei verschiedene Protoplasten dargestellt. Das GFP-Signal in (J) – (L) ist grün dargestellt.

Um den Funktionsverlust des Fusionsproteins LeSed5-GFP im direkten Vergleich mit dem inhibitorischen Fusionsprotein YFP-LeSed5 visuell zu untersuchen, wurden beide in Tabak-Protoplasten aus stabil transformierten Pflanzen, die den *trans*-Golgi-Marker ST-GFP oder ST-RFP (Wee et al., 1998) konstitutiv exprimieren, transient exprimiert. Des Weiteren wurden Koexpressionen der SNARE-Proteine und dem Plasmamembran-Marker RFP-TMD23 (Brandizzi et al., 2002) in Wildty-Tabak-Protoplasten durchgeführt. Es wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA der jeweiligen SNARE-Fusionsproteine für die Elektroporation der Tabak-Protoplasten eingesetzt. Nach 15 Stunden Inkubation bei 25°C wurden die Protoplasten am CLSM untersucht (Abb. 2.31 A – L).

Die Expression von YFP-LeSed5 verursachte eine Retention sowohl des konstitutiv exprimierten Golgi-Markers ST-GFP als auch des transient exprimierten Plasmamembran-Markers RFP-TMD23 in das ER-Netzwerk (Abb. 2.31 A – C bzw. D – F). Trotz des niedrigen Expressionsniveaus von YFP-LeSed5 in Abbildung 2.31 A ist das GFP-Signal des Golgi-Markers nur noch sehr vereinzelt in punktförmigen Strukturen zu finden. Das RFP-Signal des Plasmamembran-Markers kolokalisiert in den großen Aggregaten zusammen mit dem YFP-Signal des SNAREs, ist aber hauptsächlich in tubulären Strukturen des ERs lokalisiert (Abb. 2.31 E und F). Bei Expression des C-terminalen Fusionsproteins LeSed5-GFP in konstitutiven ST-RFP exprimierenden Protoplasten erhält man eine schöne Kolokalisierung beider Signale in punktförmigen Strukturen (Abb. 2.31 G – I). Weitere Zeitaufnahmen zeigten, dass diese Strukturen hoch mobil sind (Daten nicht gezeigt). Auch die Lokalisation des Plasmamembran-Markers RFP-TMD23 wurde bei Koexpression von LeSed5-GFP nicht beeinflusst; dieser konnte somit erfolgreich zur Plasmamembran transportiert werden (Abb. 2.31 J – L). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Fusionsprotein LeSed5-GFP am Golgi-Apparat lokalisiert ist, aber durch die Fusion des Fluoreszenzproteins an den C-Terminus seine Funktionalität einbüßt. Aufgrund dieser Tatsache wurden alle weiteren Expressionsstudien mit den funktionellen N-terminalen Fusionsproteinen YFP- und GFP-LeSed5 durchgeführt.

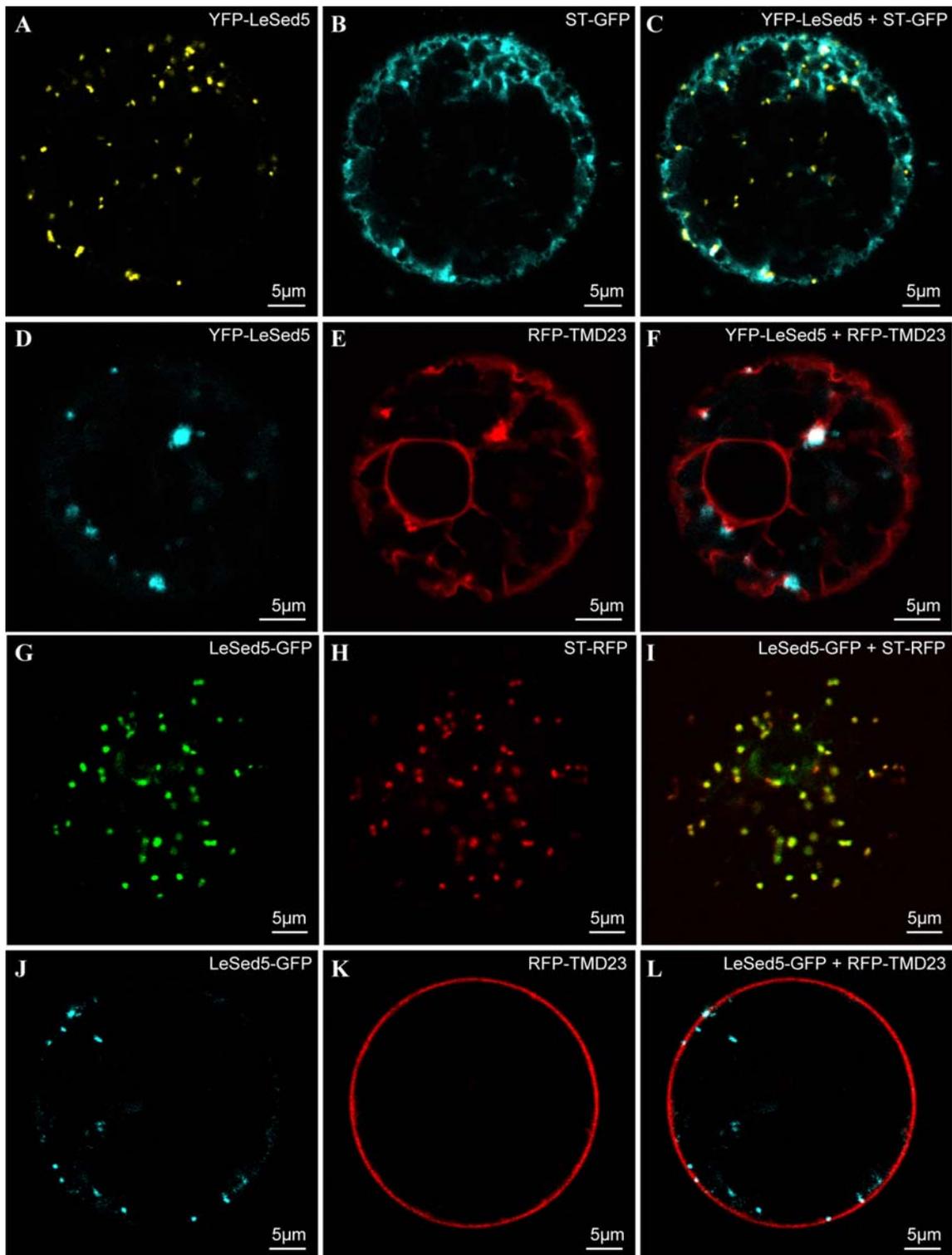


Abb. 2.31: Expressionen von YFP-LeSed5 (A – F) und LeSed5-GFP (G – L) mit etablierten Marker-Proteinen in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 μ g Plasmid-DNA eingesetzt. A - C Expression von YFP-LeSed5 in stabil transformierten ST-GFP Protoplasten von *N. tabacum*. Einzelbildaufnahmen einer Ebene eines konstitutiv exprimierenden Protoplasten (ST-GFP) (B), transformiert mit YFP-LeSed5 (A). Das Overlay von YFP-LeSed5 und ST-GFP ist in (C) abgebildet. Das YFP-Signal ist gelb (A), das GFP-Signal blau (B) und der Merge weiß (C) dargestellt. D – F Aufnahmen einer Ebene eines Protoplasten (wt), kotransformiert mit YFP-LeSed5 (D) und dem Plasmamembran-Marker RFP-TMD23 (E). Das Overlay von YFP-LeSed5 und RFP-TMD23 ist in (F) abgebildet. Das YFP-Signal ist blau (D), das RFP-

Signal rot (E) und der Merge weiß (F) dargestellt. **G - I** Expression von LeSed5-GFP in stabil transformierten ST-RFP Protoplasten von *N. tabacum*. Einzelbildaufnahmen einer Ebene eines konstitutiv exprimierenden Protoplasten (ST-RFP) (H), transformiert mit LeSed5-GFP (G). Das Overlay von LeSed5-GFP und ST-RFP ist in (I) abgebildet. Das GFP-Signal ist grün (G), das RFP-Signal rot (H) und der Merge gelb (I) dargestellt. **J - L** Aufnahmen einer Ebene eines Protoplasten, kotransformiert mit LeSed5-GFP (J) und dem Plasmamembran-Marker RFP-TMD23 (K). Das Overlay von LeSed5-GFP und RFP-TMD23 ist in (L) abgebildet. Das GFP-Signal ist blau (J), das RFP-Signal rot (K) und der Merge weiß (L) dargestellt.

2.6.2.5. Einfluss von YFP-LeSed5 auf COPI- bzw. COPII- Frachtmoleküle

Ein Reporterprotein für lösliche Proteine des sekretorischen Wegs stellt das sekretorische GFP (secGFP) dar. Ein weiteres Reporterprotein des retrograden ER-Golgi Transports, welches sich für die Fluoreszenz-Mikroskopie sehr gut eignet, ist das GFP-HDEL (Brandizzi et al., 2003). Dieses Fluoreszenzprotein wird im ER und in der Kernhülle angereichert. Um den quantitativ ermittelten inhibitorischen Effekt von LeSed5 auf die Sekretion löslicher Proteine visuell darzustellen, wurden Koexpressionen von YFP-LeSed5 mit den beiden GFP-Derivaten secGFP und GFP-HDEL in Wildty-Tabak-Protoplasten durchgeführt. Es wurden jeweils 2 µg DNA der für YFP-LeSed5 und secGFP bzw. GFP-HDEL kodierenden Plasmide für die Elektroporation der Tabak-Protoplasten eingesetzt. Nach 15 - 17 Stunden Inkubation bei 25°C wurden die Protoplasten am CLSM untersucht (Abb. 2.32 A - O und Abb. 2.33 A - O).

Die Expression von secGFP alleine resultierte in einer diffusen Verteilung des GFP-Signals, das im Cytosol und im Kernplasma des Tabak-Protoplasten zu liegen scheint (Abb. 2.32 A - C). Bereits in Arbeiten von Brandizzi et al. (2003) konnte diese Verteilung in Tabak-Protoplasten beobachtet werden. Zusätzlich sind in den Protoplasten (Abb. 2.32 A und B) einzelne punktförmige Signale zu erkennen, welche höchstwahrscheinlich den Golgi-Apparat markieren. Teilweise kann man das GFP-Signal auch in Konturen des ER-Netzwerks und der Kernhülle erkennen (Abb. 2.32 C). Die Diffusität der Verteilung des GFP-Signals ist eine Folge der Auflösungsgrenze (200 nm) des CLSM. Mögliche Vesikel (70 - 90 nm) in denen das secGFP transportiert wird, erscheinen deshalb als zusammenhängendes Signal und nicht als Einzelsignale im Cytosol des Protoplasten. Das Signal des secGFPs ist in allen Kompartimenten des klassischen sekretorischen Wegs, wie dem ER und dem Golgi-Apparat, gut zu detektieren (Abb. 2.32 C).

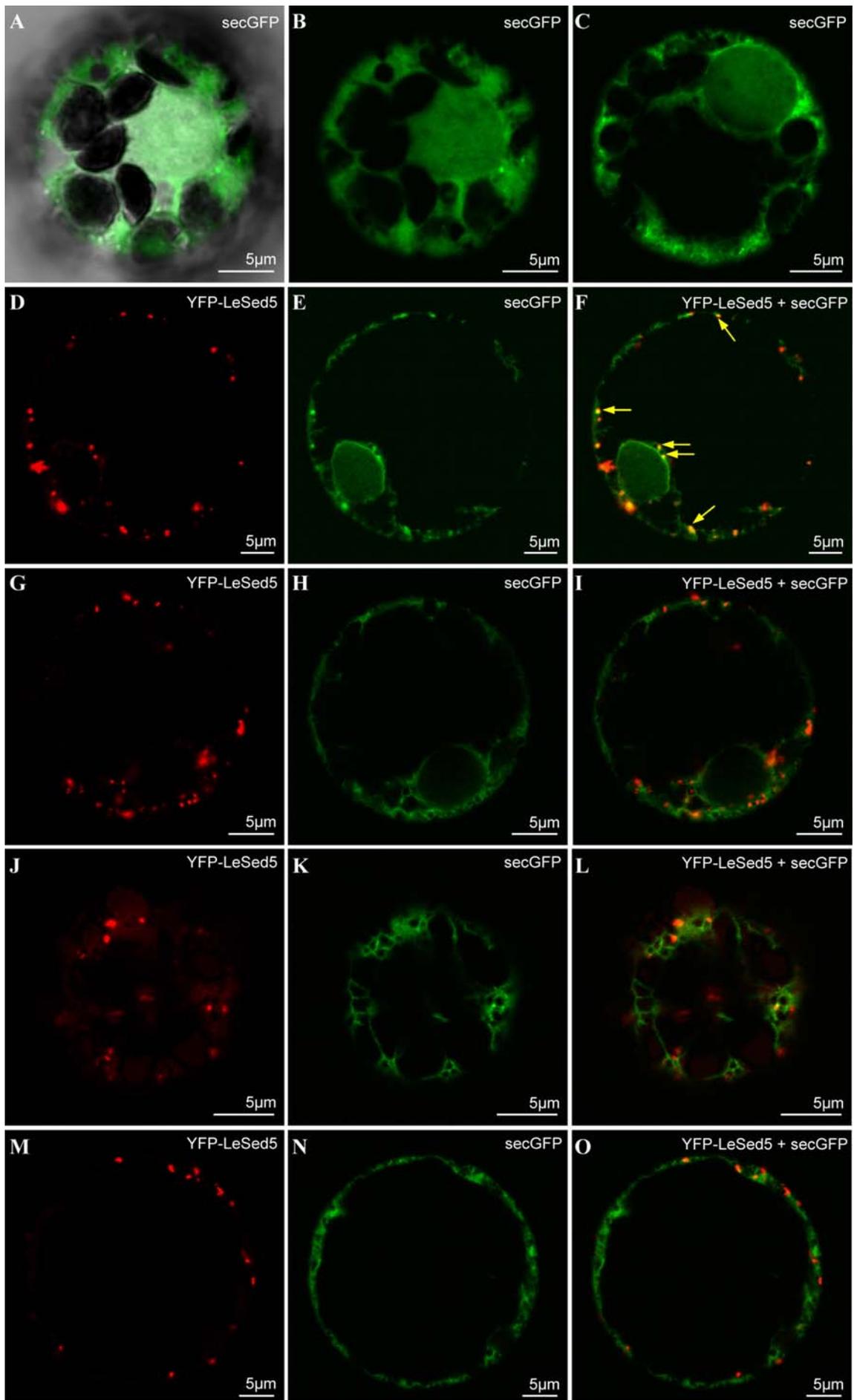


Abb. 2.32: Koexpression von YFP-LeSed5 mit sekretorischem GFP (secGFP) als lösliches Reporterprotein des sekretorischen Wegs in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 15 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. **A - C** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten transformiert mit secGFP. Das GFP-Signal ist grün dargestellt. **D - O** Aufnahmen einer Ebene von Protoplasten, jeweils kotransformiert mit YFP-LeSed5 (D, G, J und M) und secGFP (E, H, K und N). Das Overlay von YFP-LeSed5 und secGFP ist in F, I, L und O abgebildet. Das YFP-Signal ist rot (D, G, J und M), das GFP-Signal grün (E, H, K und N) und der Merge gelb (F, I, L und O) dargestellt.

Bei Koexpression von YFP-LeSed5 hingegen erscheint das Signal des sekretorischen Reporterproteins verstärkt sowohl im ER-Netzwerk, was in Abbildung 2.32 J – L besonders gut dargestellt ist, als auch in punktförmigen Strukturen und verschwindet fast ganz aus dem Cytosol. Die punktförmigen Signale des secGFPs sind mit denen von YFP-LeSed5 kolokalisiert, was vor allem im Beispiel von Abbildung 2.32 D – F gut zu erkennen ist (gelbe Pfeile). Die Koexpression von YFP-LeSed5 veränderte eindeutig das Verteilungsmuster von secGFP im Vergleich zur Kontrolle und führt zur Retention des GFP-Signals in die tubulären Strukturen des ERs und der Kernhülle und zur Kolokalisierung mit YFP-LeSed5 in punktförmigen Strukturen (Abb. 2.32 A – O).

Wie in Abbildung 2.33 dargestellt, scheint die Signalverteilung von GFP-HDEL bei Koexpression von YFP-LeSed5 hingegen nur zu einer schwachen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle zu führen. Bei schwacher Expression von YFP-LeSed5 konnte keine Veränderung des GFP-HDEL Signals festgestellt werden. Die punktförmigen Strukturen von YFP-LeSed5 kolokalisieren nicht mit dem GFP-HDEL Signal, welches in den feinen tubulären Strukturen des ER-Netzwerks lokalisiert ist (Abb. 2.33 D – F). Bei stärkerer Expression von YFP-LeSed5, was man anhand der erhöhten Aggregationsrate der YFP-Signale erkennen kann, konnten leichte Veränderungen des GFP-Signals im ER beobachtet werden. Es kam im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2.33 A – C) vermehrt zu aufgeblähten oder cisternalen Strukturen innerhalb des ER-Netzwerks (Abb. 2.33 G – I und M – O, grüne Pfeile). Es war auch zu beobachten, dass die Aggregate von YFP-LeSed5 teilweise mit dem GFP-HDEL Signal entlang des ERs kolokalisieren (Abb. 2.33 J – L, gelbe Pfeile).

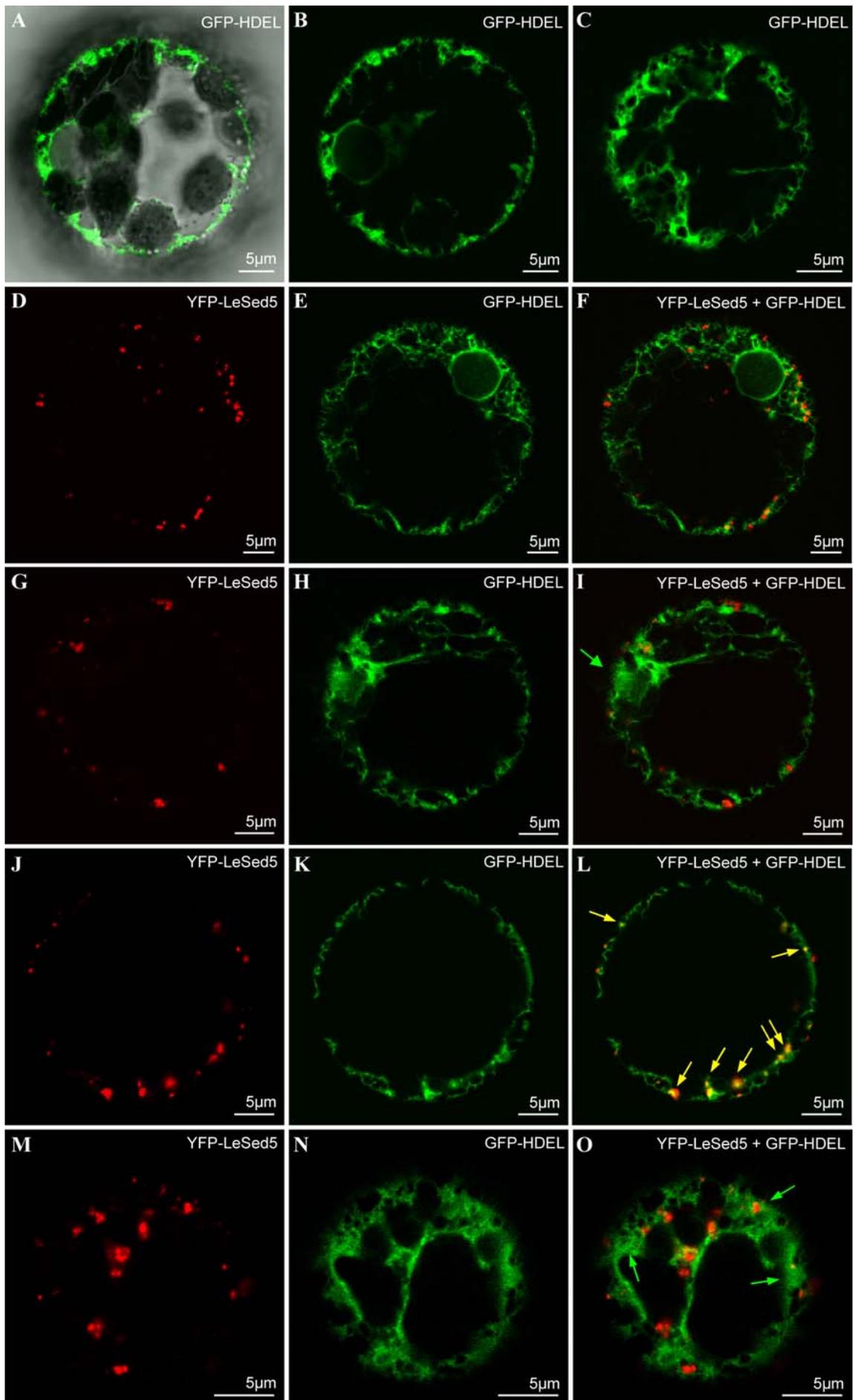


Abb. 2.33: Koexpression von YFP-LeSed5 mit dem ER-Marker GFP-HDEL in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 15 - 17 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. **A - C** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten transformiert mit GFP-HDEL. Das GFP-Signal ist grün dargestellt. **D - O** Aufnahmen einer Ebene von Protoplasten, jeweils kotransformiert mit YFP-LeSed5 (D, G, J und M) und GFP-HDEL (E, H, K und N). Das Overlay von YFP-LeSed5 und GFP-HDEL ist in F, I, L und O abgebildet. Das YFP-Signal ist rot (D, G, J und M), das GFP-Signal grün (E, H, K und N) und der Merge gelb (F, I, L und O) dargestellt.

2.6.2.6. Einfluss von LeSed5 auf die Lokalisation weiterer Syntaxine

Um zu testen, ob die Expression des Golgi-Syntaxins LeSed5 auch einen Einfluss auf die Lokalisierung weiterer Syntaxine nimmt, wurden transiente Koexpressionen des GFP-LeSed5 Fusionsproteins mit dem Plasmamembran-Syntaxin AtSYP121 oder mit dem Tonoplasten-Syntaxin AtVam3 in Tabak-Protoplasten durchgeführt. Bei Expression in Protoplasten markiert das Syntaxin AtSYP121 die Plasmamembran nachhaltig und erzeugt ein charakteristisches ringartiges Muster (Uemura et al., 2004; Foresti et al., 2006). Die Sekretion wird durch die Expression des Plasmamembran-SNAREs nicht beeinflusst (Geelen et al., 2002). AtVam3, auch AtSYP22 genannt, konnte in *A. thaliana* sowohl am Prävakuolären Kompartiment (PVC) als auch am Tonoplasten lokalisiert werden (Sato et al., 1997; Sanderfoot et al., 1999). Der SNARE-Komplex aus SYP22/AtVam3, VTI11 und SYP51 am Tonoplasten kontrolliert den Transport vom PVC zur Vakuole (Surpin et al., 2003; Yano et al., 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass die transiente Überexpression von AtVam3 den vakuolären Transport nicht beeinträchtigt und somit als Tonoplasten-Marker eingesetzt werden kann (Foresti et al., 2006). Für die Elektroporation der Tabak-Protoplasten wurden jeweils 2 µg DNA der für GFP-LeSed5 und YFP-Syp121 bzw. YFP-Vam3 kodierenden Plasmide eingesetzt. Nach 18 Stunden Inkubation bei 25°C wurden die Protoplasten am CLSM untersucht (Abb. 2.34 A - O und Abb. 2.35 A - L).

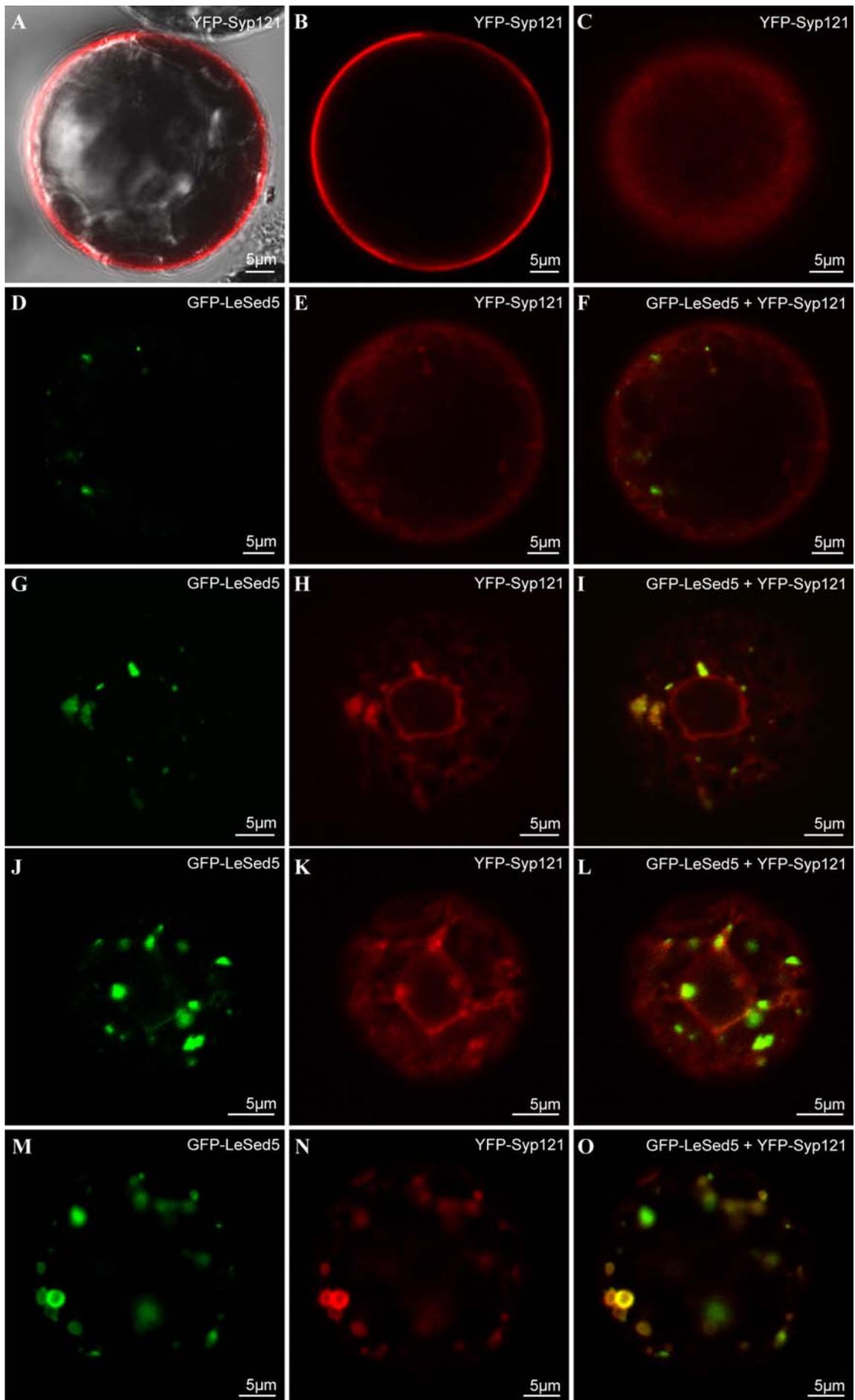
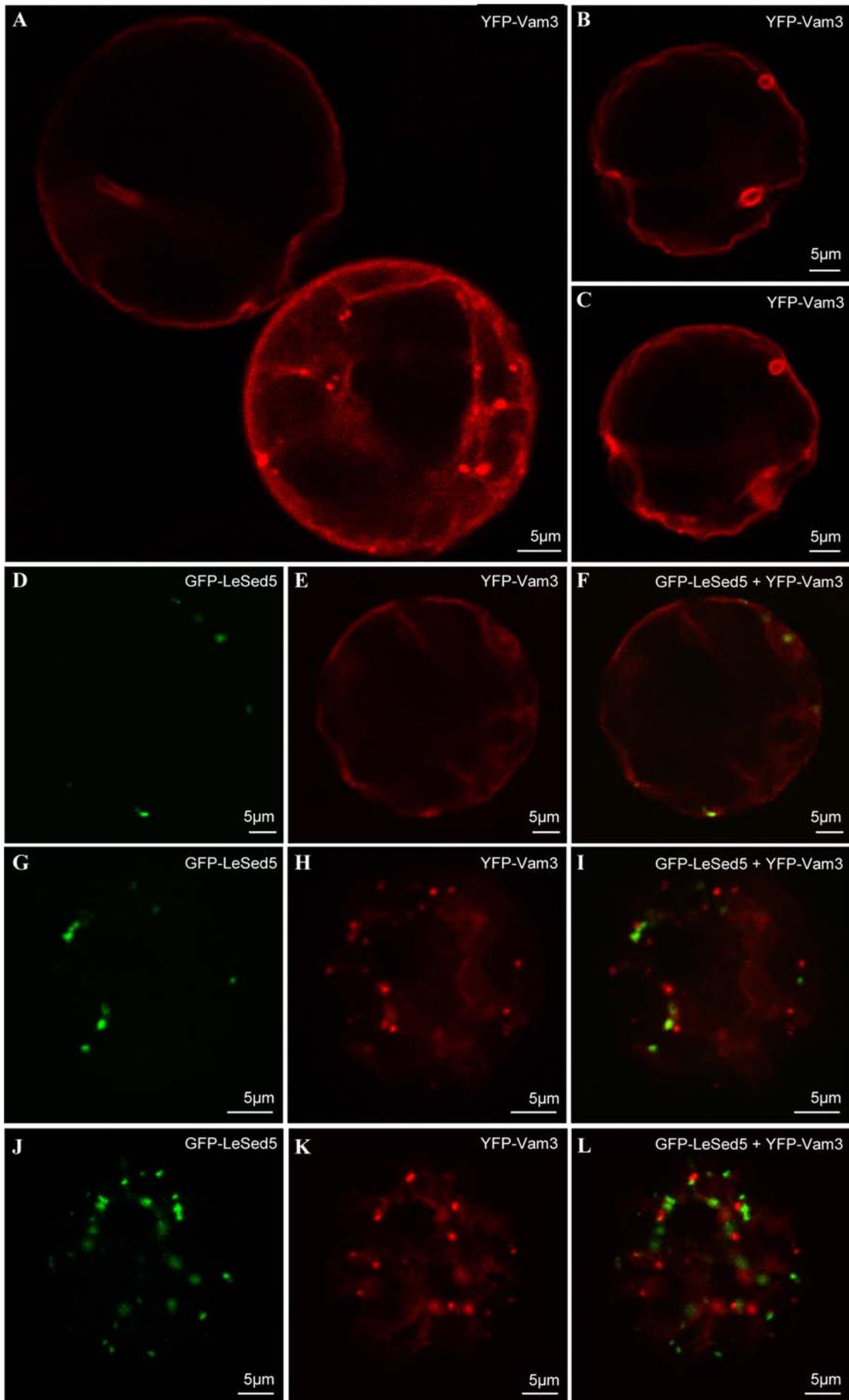


Abb. 2.34: Koexpression von GFP-LeSed5 mit dem Plasmamembran-Syntaxin YFP-Syp121 in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 18 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. **A - C** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten transformiert mit YFP-Syp121 Plasmid-DNA. Das YFP-Signal ist rot dargestellt. **D - O** Aufnahmen einer Ebene von Protoplasten, jeweils kotransformiert mit GFP-LeSed5 (D, G, J und M) und YFP-Syp121 (E, H, K und N). Das Overlay von GFP-LeSed5 und YFP-Syp121 ist in F, I, L und O abgebildet. Das GFP-Signal ist grün (D, G, J und M), das YFP-Signal rot (E, H, K und N) und der Merge gelb (F, I, L und O) dargestellt.

Die gleichmäßige ringförmige Verteilung des Plasmamembran-SNAREs Syp121 fusioniert mit YFP (Abb. 2.34 A - C), veränderte sich in Anwesenheit von GFP-LeSed5. Bereits eine schwache Expression von GFP-LeSed5 beeinflusste die gleichmäßige Markierung des YFP-Signals an der Plasmamembran (Abb. 2.34 D - F). Das Signal wurde diffuser und zeigte Anfänge einer ER-Markierung, ebenfalls erscheinen erste kleine Aggregate. Je stärker die Expression von GFP-LeSed5, desto deutlicher war die Umverteilung von YFP-Syp121 zu beobachten. Das YFP-Signal wurde vermehrt in punktförmigen Aggregaten gefunden, wo es mit dem GFP-Signal kolokalisierte. Des Weiteren führte die Koexpression von GFP-LeSed5 zu einer Retention des Plasmamembran-SNAREs in das ER (Abb. 2.34 G - L). Bei sehr starker Expression kam es zur vollständigen Kolokalisierung beider Signale innerhalb großer Aggregate im Protoplasten (Abb. 2.34 M - O).

Die Aufnahmen in Abbildung 2.35 A - C zeigen, dass das Syntaxin YFP-Vam3 je nach Expressionsstärke sowohl den Tonoplasten also auch punktierte Strukturen (PVC) markiert. Bei Koexpression von GFP-LeSed5 wurde das Verteilungsmuster von YFP-Vam3 nicht beeinflusst. Bei schwacher Expressionsrate von GFP-LeSed5 und YFP-Vam3 (Abb. 2.35 D - F) markierte das GFP-Signal punktförmige Strukturen und das YFP-Signal war am Tonoplasten lokalisiert. Ein Anstieg des Expressionsniveaus beider Fusionsproteine führte zu einer vermehrten Markierung punktförmiger Strukturen beider Signale, die aber nicht miteinander kolokalisierten (Abb. 2.35 G - I und J - L). Der inhibitorische Effekt von GFP-LeSed5 auf den COPII-abhängigen Transport hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung bzw. den Transport des Tonoplasten-Syntaxins YFP-Vam3 in Tabak-Protoplasten.

Abb. 2.35: Koexpression von GFP-LeSed5 mit dem Tonoplast-Syntaxin YFP-Vam3 in Tabak-Protoplasten. Die transformierten Protoplasten wurden nach 18 h Expression bei 25°C am CLSM untersucht. Es wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. **A - C** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von Protoplasten transformiert mit YFP-Vam3 Plasmid-DNA. Das YFP-Signal ist rot dargestellt. **D - L** Aufnahmen einer Ebene von Protoplasten, jeweils kotransformiert mit GFP-LeSed5 (D, G und J) und YFP-Vam3 (E, H und K). Das Overlay von GFP-LeSed5 und YFP-Vam3 ist in F, I und L abgebildet. Das GFP-Signal ist grün (D, G und J), das YFP-Signal rot (E, H und K) und der Merge gelb (F, I und L) dargestellt.



Um diesen Effekt quantitativ zu überprüfen wurden transiente Koexpressionsstudien mit dem Syntaxin HA-LeSed5 und α -Amylase-Sporamin (α -Amylase-spo) als Reporter in Tabak-Protoplasten durchgeführt und die Sekretion dieses vakuolären Markers mittels α -Amylase-Enzymtests überprüft. Das Protein α -Amylase-spo wurde bereits extensiv beschrieben und getestet (Pimpl et al., 2003; daSilva et al., 2006). Es stellt ein α -Amylase-Fusionsprotein dar, welches das Sequenz-spezifische vakuoläre Sortierungssignal von Sporamin (NPIRL), einem vakuolären Protein aus der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*), besitzt.

Alle Messungen wurden als Doppelproben ausgeführt und der Fehlerbalken entspricht der Mittelwertabweichung dreier unabhängiger Versuche. In Abbildung 2.36 ist der Sekretionsindex von α -Amylase-spo bei Überexpression von HA-LeSed5 durch graue Säulen, die Aktivität von sekretiertem α -Amylase-spo durch weiße Säulen und die Aktivität von α -Amylase-spo in den Zellen durch dunkelgraue Säulen dargestellt.

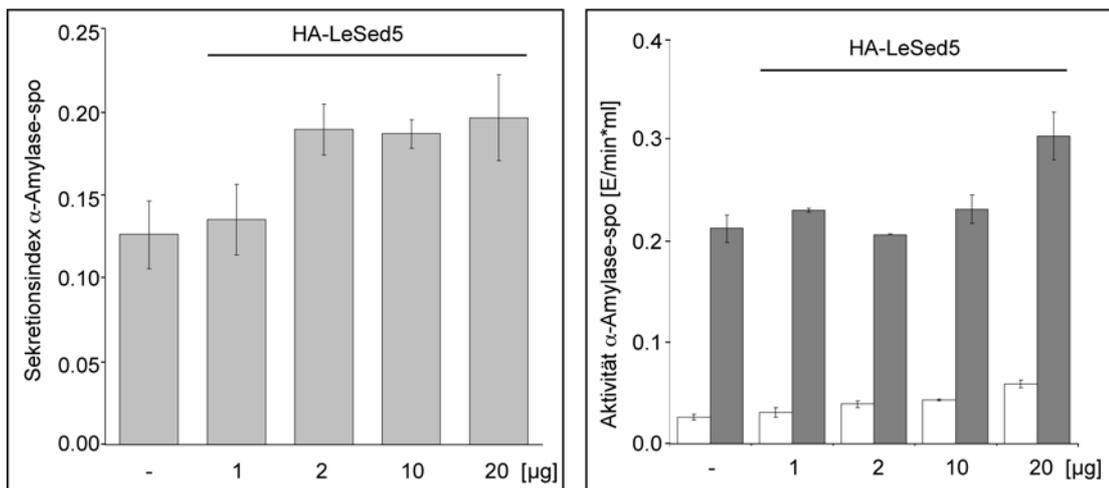


Abb. 2.36: Einfluss von HA-LeSed5 auf die Sekretion von α -Amylase-spo (A) bzw. Aktivität von α -Amylase-spo in Kulturmedium und Zellen bei Kotransformation von HA-LeSed5 (B). Transiente Genexpression von je 10 μg des α -Amylase-spo kodierenden Plasmids ohne das HA-LeSed5 kodierende Plasmid als Kontrolle der Sekretion (Säule1). In den folgenden Säulen ist der Sekretionsindex (A) bzw. die Aktivität (B) von α -Amylase-spo bei Koexpression von 1 μg , 2 μg , 10 μg und 20 μg HA-LeSed5 (Säule 2-5) Plasmid-DNA gezeigt. Zellen und Kulturmedium wurden nach 24 h Expression geerntet und die α -Amylase-spo Sekretion durch eine enzymatische Reaktion und anschließende photometrische Messung bestimmt. Die Aktivität von α -Amylase-spo des Mediums ist durch weiße Säulen, die Aktivität von α -Amylase-spo in den Zellen durch graue Säulen dargestellt (B).

Wie in Abbildung 2.36 A dargestellt, hat das Syntaxin HA-LeSed5 keinen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion von α -Amylase-spo. Es wird sogar vermehrt α -Amylase-spo synthetisiert und sekretiert. Die Analyse der α -Amylase-spo Aktivitäten in Medium und Zellen (Abb. 2.36 B) zeigt, dass das Koexpression von HA-LeSed5 die de novo Synthese von α -Amylase-spo nicht reduziert. Dieses Ergebnis legt eindeutig nahe, dass der Transport des vakuolären Reporterproteins α -Amylase-spo durch den inhibitorische Effekt von HA-LeSed5 auf den COPII-

abhängigen Transport nicht beeinflusst wird. Somit kann man schließen, dass der Transport sowohl des Tonoplasten-Syntaxins YFP-Vam3 als auch des luminalen Vakuolenmarkers α -Amylase-*spo* in Tabak-Protoplasten höchstwahrscheinlich COPII-unabhängig transportiert wird.

2.6.2.7. Gewebeabhängigkeit der Expression von LeSed5

Um zu überprüfen, dass der inhibitorische Effekt von LeSed5 auf den COPII-abhängigen Transport vom ER zum Golgi-Apparat kein zelltypischer Effekt ist, wurden transiente Genexpressionsstudien mit GFP-LeSed5 und dem Golgi-Marker ManI-RFP in BY-2 Wurzelzell-suspensionskulturen durchgeführt. Dazu wurden die BY-2 Zellen mittels Partikelbeschuss mit jeweils 2,5 μ g Plasmid-DNA transfiziert, bei 25°C im Dunkeln inkubiert und nach 5 - 24 Stunden am CLSM untersucht (Abb. 2.37 A – M). Bereits 5 Stunden nach der Kotransfektion veränderte GFP-LeSed5 das Verteilungsmuster von ManI-RFP. Anstelle der normalerweise distinkt punktförmigen Signale des Golgi-Markers (Abb. 2.37 A) war eine ER-ähnliche Verteilung mit großen punktförmigen Aggregationen der RFP-Signale zu beobachten (Abb. 2.37 B – E). In diesen punktförmigen Aggregaten war das GFP-LeSed5 und ManI-RFP Signal kolokalisiert (gelbe Pfeile in Abb. 2.37 D und H). Bei andauernder Inkubation wurden die Signale beider Fusionsproteine vermehrt in den Aggregaten, die sich auch entlang der Kernhülle befanden, gefunden. Nach einer Inkubation von 24 Stunden kam es zu einer kompletten Kolokalisation der GFP- und RFP-Signale in sehr großen punkt- und ringförmigen Aggregaten und in der Kernhülle (Abb. 2.37 J – M). Der inhibitorische Effekt von LeSed5 auf den frühen sekretorischen Weg konnte somit sowohl in Wurzelzellen als auch in Mesophyllzellen beobachtet werden.

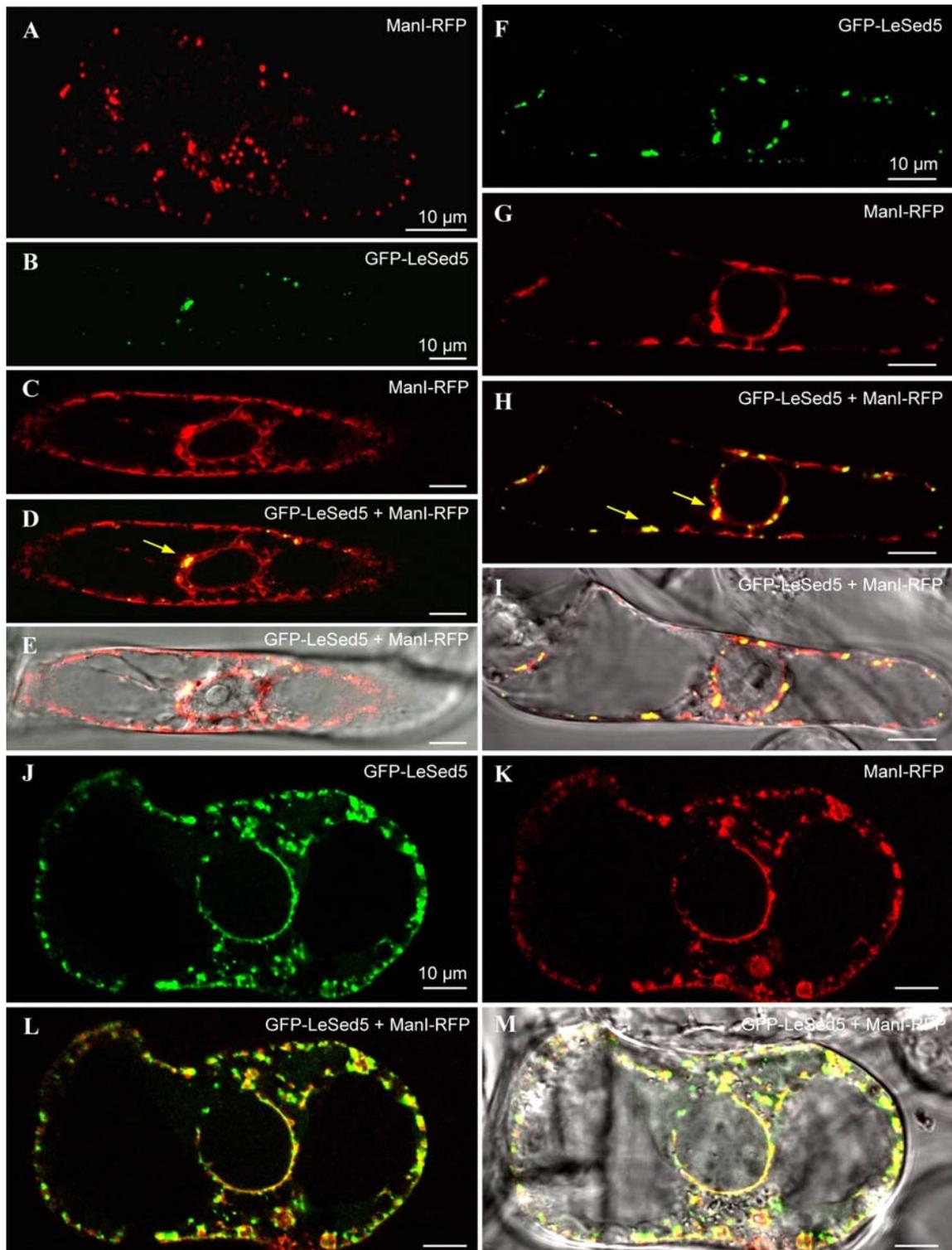


Abb. 2.37: Transiente Koexpression von GFP-LeSed5 und dem Golgi-Marker ManI-RFP in Tabak Wurzelzellensuspensionskulturen (BY-2). Es wurden jeweils 2,5 μ g Plasmid-DNA von GFP-LeSed5 und ManI-RFP eingesetzt. Das GFP-Signal ist grün (B, F und J), das RFP-Signal rot (A, C, G und K) und der Merge gelb (D, E, H, I, L und M) dargestellt. **A** Als Kontrolle wurden BY-2 Zellen mit 2,5 μ g ManI-RFP Plasmid-DNA alleine transfiziert und 24 h im Dunkeln bei 25°C inkubiert. **B – M** Einzelbildaufnahmen einer Ebene von BY-2 Zellen kotransformiert mit GFP-LeSed5 (B, F und J) und ManI-RFP (C, G und K). Die Overlays von GFP-LeSed5 und ManI-RFP sowie von GFP-LeSed5, ManI-RFP und Durchlicht sind in (D, H und L) bzw. in (E, I und M) dargestellt. Die transformierten BY-2 Zellen wurden jeweils nach 5 h (**B – E**), 15 h (**F – I**) oder 24 h (**J – M**) Expression im Dunkeln bei 25°C am CLSM untersucht. Maßstab = 10 μ m.

Aufgrund der hohen Expressionsraten sowohl in Tabak-Protoplasten als auch in BY-2 Zellen und der damit verbundene sehr schnelle Eintritt des inhibitorischen Effekts von LeSed5 auf den ER-Golgi Transport, war eine Kolokalisierung von LeSed5 mit einem Golgi-Marker auch nach sehr kurzer Inkubationszeiten nicht möglich, da dieser nicht mehr im Golgi-Apparat ankam. Um zu bestärken, dass die punktförmigen Strukturen von XFP-LeSed5 in der Tat den Golgi-Apparat darstellen, wurden Fluoreszenzaufnahmen von transient exprimiertem YFP-LeSed5 in Blättern von stabil transformierten ST-CFP Tabakpflanzen (*N. tabacum*), angefertigt. Der Vorteil von Expressionsstudien in Tabakblättern liegt in der variablen Expressionsrate. Niedrige Expressionsniveaus können aufgrund der stabilen Integration nur weniger T-DNA Kopien ins Genom erreicht werden. Um ein sehr geringes Expressionsniveau von YFP-LeSed5 zu untersuchen, wurden nach ca. 48 Stunden erste Analysen am CLSM vorgenommen.

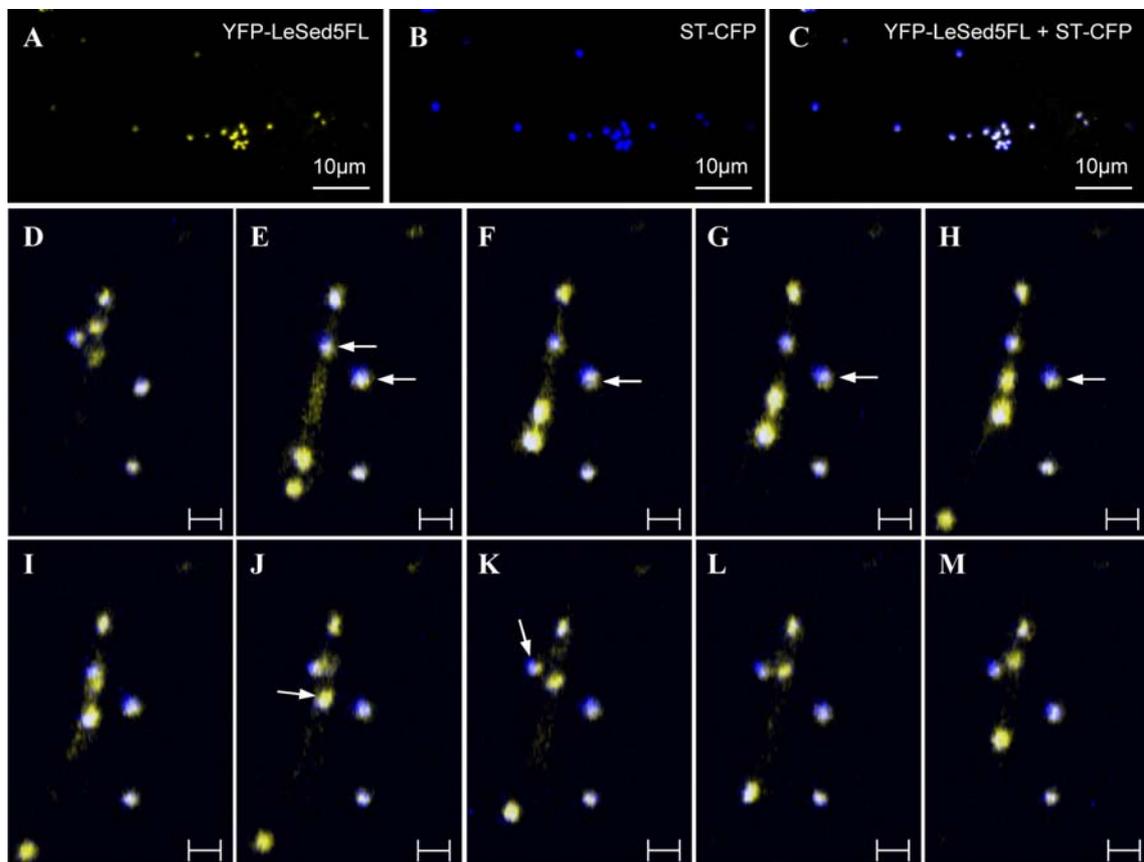


Abb. 2.38: Expression von YFP-LeSed5 in Epidermiszellen von stabil transformierten ST-CFP Tabakpflanzen. Nach 48 h Infektion der Blätter mit transformierten Agrobakterien wurden diese am CLSM analysiert. Zur Transformation wurde 2 μg YFP-LeSed5 Plasmid-DNA eingesetzt. Das YFP-Signal ist gelb (A), das CFP-Signal blau (B) und der Merge weiß (C – M) dargestellt. A – C Einzelbildaufnahmen einer Ebene durch eine Epidermiszelle transformiert mit YFP-LeSed5. D – M Aufnahme einer Zeitreihe einer Ebene die über einen Zeitraum von 4,94 sek aufgenommen wurden. Der Zeitabstand zwischen den abgebildeten Einzelaufnahmen beträgt 494 ms. Maßstab = 2 μm .

Wie in Abbildung 2.38 A – C dargestellt, war eine komplette Kolokalisierung des Signals von YFP-LeSed5 mit dem CFP-Signal des konstitutiv exprimierten Golgi-Markers ST-CFP in punktförmigen Strukturen zu beobachten. Zeitaufnahmen zeigten außerdem, dass diese Signale

einer starken Dynamik unterworfen sind und sich miteinander bewegen (Abb. 2.38 D – M). Des Weiteren kann man bei höherer Vergrößerung beobachten, dass die Signale sogar überlappen, da ein Übergang von gelb über weiß ins blau zu beobachten ist. Dieses Ergebnis lässt sich in Einklang bringen mit der Tatsache, dass man hier zwischen einer Lokalisierung des *cis*- und *trans*-Golgi unterscheiden kann. Höchstwahrscheinlich ist das YFP-LeSed5 am *cis*-Golgi lokalisiert, wohingegen die Sialyltransferase (ST) einen etablierten *trans*-Golgi-Marker darstellt (Wee et al., 1998).

2.6.2.8. Etablierung einer LeSed5-GFP exprimierenden BY-2 Zelllinie

Zur weiteren ultrastrukturellen Aufklärung der Lokalisierung des LeSed5 am Golgi-Apparat waren Immunogoldmarkierungen unter Einsatz der Elektronenmikroskopie geplant. Dazu sollten BY-2 Wurzelzelllinien hergestellt werden, die das LeSed5-GFP unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimieren. Nach Zugabe von Dexamethasone wurde die Expression von LeSed5-GFP am CLSM überprüft. Bereits nach 15 Stunden Inkubation exprimierten die BY-2 Zellen ausreichende Mengen an Fusionsprotein um mikroskopische Studien durchführen zu können. Das GFP-Signal markierte punktförmige Strukturen, die überall im Cytoplasma verteilt zu finden waren und eine Größe von ungefähr 1 µm aufwiesen (Abb. 2.39 A und B). Zeitaufnahmen zeigten, dass diese Strukturen eine hohe Dynamik aufweisen. Die Expression von LeSed5-GFP blieb über einen Zeitraum von über 2 Tagen stabil auf die punktförmigen Strukturen beschränkt (Daten nicht gezeigt). Zunächst wurde überprüft ob es sich bei diesen punktförmigen Strukturen tatsächlich um den Golgi-Apparat handelt, wurden die Zellen mit BFA behandelt und nach 15 – 60 Minuten am CLSM untersucht. Schon im frühen Stadium der BFA-Behandlung war eine Veränderung des Verteilungsmusters von LeSed5-GFP zu beobachten. Es bildeten sich Aggregationen (grüne Pfeile) der GFP-Signale aus, welche nur eine sehr niedrige Mobilität zeigten. Bei anhaltender Inkubationszeit kam es vermehrt zur Aggregatbildung, die sich vor allem in der Nähe des Zellkerns lokalisierten und die hoch beweglichen Signalpunkte verschwanden fast ausschließlich (Abb. 2.39 C – F).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die GFP-markierten Strukturen in den Zellen der LeSed5-GFP BY-2 Zellkulturen BFA sensitiv sind und daher den Golgi-Apparat darstellen.

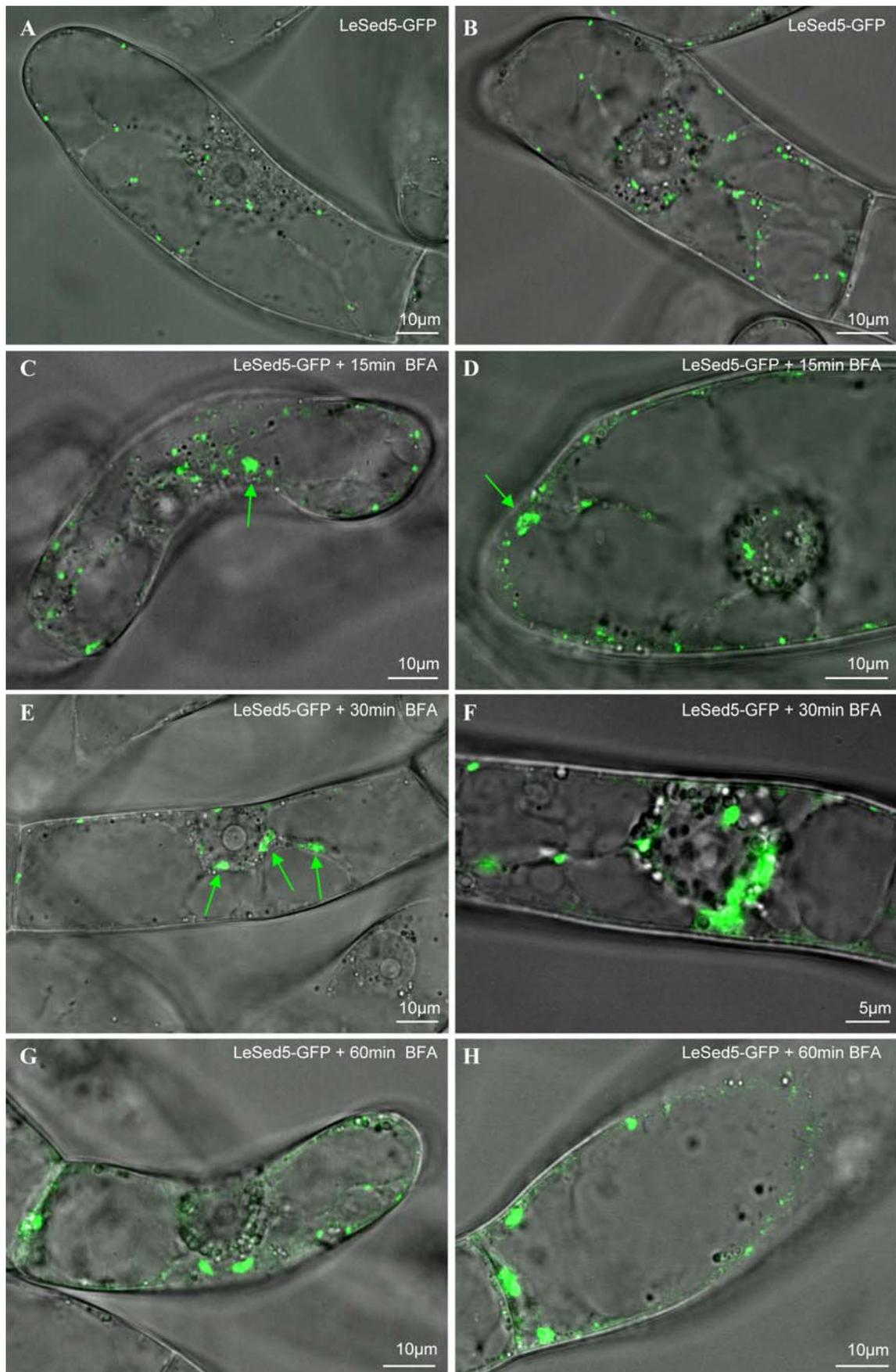


Abb. 2.39: Behandlung von BY-2 Zellen, stabil transformiert mit LeSed5-GFP unter der Kontrolle des induzierbaren Dexamthasone-Promotors (dex), mit BFA. **A + B** Einzelbildaufnahmen einer Ebene der BY-2 Zellen vor der Behandlung mit BFA. **C - H** Aufnahmen einer Ebene von BY-2 Zellen, nach 15 min

(C + D), 30 min (E + F) und 60 min (G + H) Inkubation mit 10 μ g/ml BFA. Dargestellt ist jeweils das Overlay von LeSed5-GFP mit dem Durchlichtkanal. Das GFP-Signal ist grün dargestellt. Maßstab = 10 μ m bzw. 5 μ m (F).

Parallel dazu wurden als Kontrolle BY-2 Zelllinien, die den *trans*-Golgi-Marker Gonst1-YFP (Tse et al., 2004) konsitutiv exprimieren ebenfalls mit BFA behandelt (siehe Abb. 2.40 A - C). Auch hier findet bereits nach 15 Minuten BFA-Behandlung eine Umverteilung des Gonst1-YFP-Signals in der Zelle statt. Es werden vermehrt Aggregate gebildet, die sich letztendlich um den Zellkern positionieren (Langhans and Robinson, 2007).

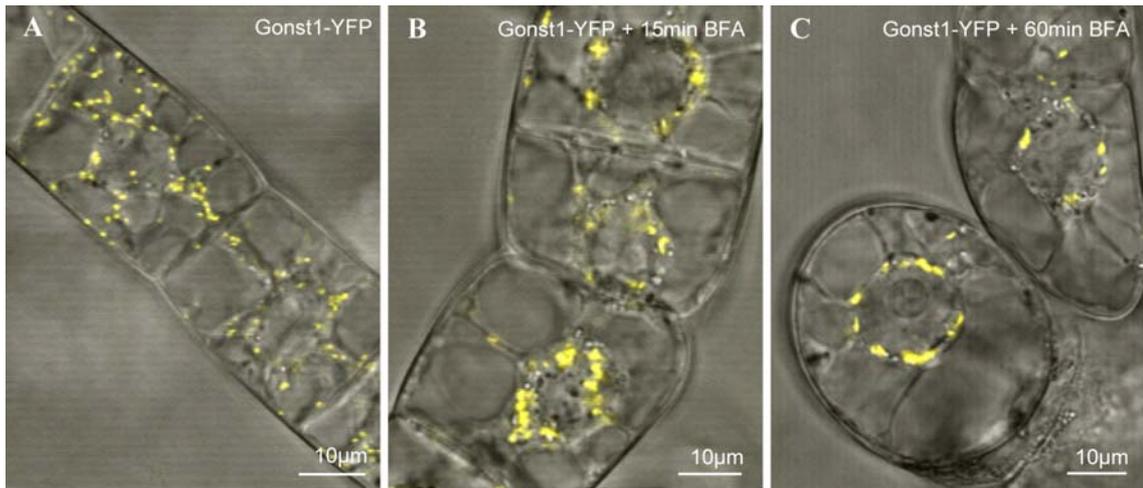


Abb. 2.40: Behandlung von BY-2 Zellen, stabil transformiert mit Gonst1-YFP mit BFA. **A** Einzelbildaufnahme einer Ebene der BY-2 Zellen vor der Behandlung mit BFA. **B + C** Aufnahmen einer Ebene von BY-2 Zellen, nach 15 min (B) und 60 min (C) Inkubation mit 10 μ g/ml BFA. Dargestellt ist jeweils das Overlay von Gonst1-YFP mit dem Durchlichtkanal. Das YFP-Signal ist gelb dargestellt.

2.6.3. Ultrastrukturelle Aufklärung am EM durch Immunogoldmarkierung

Zur weiteren Charakterisierung der Lokalisierung von LeSed5 innerhalb des Golgi-Apparates war es notwendig gegen das SNARE-Protein Antikörper herzustellen. Dazu wurde das Fusionsprotein GST-LeSed5 Δ C, welches nur das N-terminale Peptid und die Habc-Domäne der cytosolischen Domäne von LeSed5 enthält, hergestellt (siehe Abb. 2.41 A). Nach der Expression in *E. coli* (Abb. 2.41 B) wurde es direkt durch präparative SDS-Gelelektrophorese gereinigt. Die Elektrophorese wurde in 1 mm dicken Gelen durchgeführt und die gewünschten Banden anschließend mit Coomassie 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 aus Meerschweinchen verwendet. Polyclonale Antikörper wurden auf diese Weise gegen das rekombinante GST-Fusionsprotein von LeSed5 gewonnen.

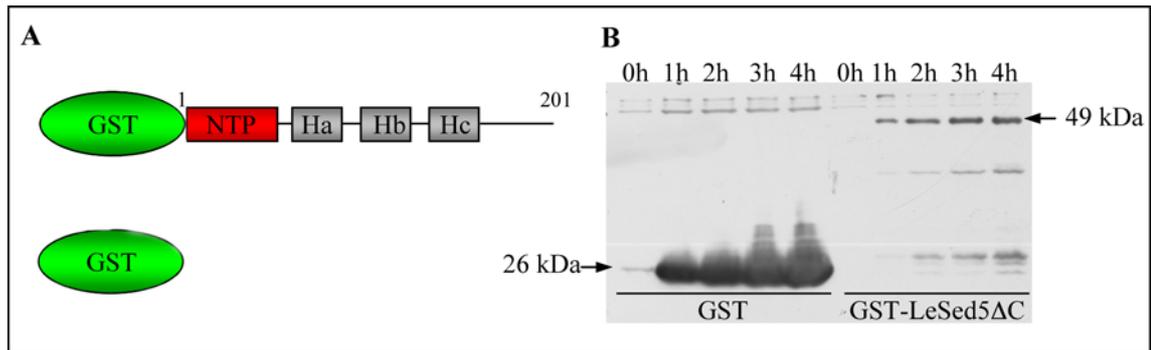


Abb. 2.41: **A** Schematische Darstellung des GST-LeSed5 Δ C-Fusionsproteins. Das Konstrukt GST-LeSed5 Δ C enthält das N-terminale Peptid (NTP; rot) und die drei Subdomänen Ha, Hb und Hc (grau). Der C-terminale Bereich mitsamt dem SNARE-Motiv und der Transmembrandomäne fehlen. **B** Überexpression von GST (26 kDa) und GST-LeSed5 Δ C (49 kDa) in *E.coli* BL21 über einen Zeitraum von 0, 1, 2, 3 und 4 Stunden. Dargestellt ist ein Western-Blot mit einem Antikörper gerichtet gegen ein GST-Fusionsprotein.

Um die Qualität des gewonnenen Antikörpers zu überprüfen, wurde das Serum der finalen Blutung an Zellextrakten von Tabak-Protoplasten, welche zuvor mit LeSed5 kodierender Plasmid-DNA elektroporiert worden waren, getestet (siehe Abb. 2.42). Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 2.42 zeigt, dass das LeSed5 mit einer theoretischen Molmasse von 38 kDa nur sehr schwach zu detektieren ist. Es trat zusätzlich eine starke unspezifische Bande bei etwa 30 kDa auf (Stern).

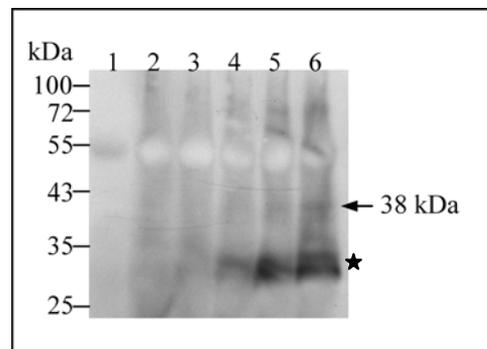


Abb. 2.42: Western-Blot-Analyse der Proteine aus einer zellulären Fraktion von Tabak-Protoplasten. Die Spuren 2 – 6 enthalten Proteine aus einer zellulären Fraktion von Tabak-Protoplasten, welche zur transienten Genexpression mit jeweils 1, 2, 5, 10 und 20 μ g LeSed5 Plasmid-DNA elektroporiert und 24 h bei 25°C inkubiert wurden. Als Kontrolle diente eine Fraktion aus wt Tabak-Protoplasten (Spur 1). Die Immunodetektion erfolgte mit dem 1:2000 verdünnten polyklonalen Antiserum gegen das SNARE-Protein LeSed5 (38 kDa). Es wurden jeweils 10 μ l des Gesamtzellextrakts der Tabak-Protoplasten aufgetragen.

Aufgrund dieses Ergebnisses wäre es notwendig eine Affinitätsreinigung des Antiserums mit dem Antigen LeSed5 Δ C durchzuführen um die Spezifität des Antikörpers zu gewährleisten. Wegen der sehr schwachen Expression des Antigens und des damit verbundenen großen Zeitaufwands konnte bereits die Immunisierung nur an einem Meerschweinchen durchgeführt wer-

den, eine weiter Aufreinigung des Antikörpers konnte somit nicht mehr in Betracht gezogen werden.

Es wurden daher Immunogoldmarkierungen alternativ mit anti-GFP Antikörpern verschiedener Fabrikate an den LeSed5-GFP exprimierenden BY-2 Zellen durchgeführt. Zum jetzigen Zeitpunkt kann aufgrund dieser ultrastrukturellen Untersuchungen keine eindeutige Aussage über die Lokalisierung von LeSed5 in der BY-2 Zelllinie gemacht werden.

3. Diskussion

3.1. Bedeutung und Funktion der SNARE-Proteine in Pflanzen

Das Genom von sowohl monokotylen als auch dikotylen Pflanzen kodiert im Vergleich zu anderen eukaryotischen Organismen für eine erstaunlich hohe Anzahl an SNARE-Proteinen und deren Isoformen. Diese große Diversität der SNARE-Proteine in Pflanzen reflektiert vermutlich den Bedarf an SNARE-Proteinen, die in pflanzenspezifischen biologischen Prozessen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel der Transport von Phytohormonen, Gravitropismus der Wurzel, Autophagie, Abwehr von Pathogenen und der pflanzenspezifischen Cytokinese (Sanderfoot et al., 2000; Jurgens, 2005; Lipka et al., 2007). Wie essentiell die Syntaxine (Qa-SNAREs) in *A. thaliana* tatsächlich für das Zellwachstum sind, zeigen eine Reihe von Studien. Ein „Knock-out“ bzw. „gene disruption“ in Syntaxinen ist letal (Sanderfoot et al., 2000; Sanderfoot et al., 2001; Lipka et al., 2007). Andererseits wurden bis heute keine Phänotypen in R- und Qc-SNARE-Mutanten von *A. thaliana* gefunden, was in Bezug auf diese beiden SNARE-Unterfamilien höchstwahrscheinlich auf partielle funktionelle Redundanz zurückzuführen ist (Lipka et al., 2007). Aufgrund dessen ist es schwierig deren Funktion in Pflanzen abzuleiten.

Obwohl die SNARE-vermittelte Fusion wichtig für die korrekte Ausführung der verschiedenen Transportvorgänge in Pflanzen wie in Tieren zu sein scheint, gibt es bis heute nur wenige Untersuchungen über die pflanzliche Fusionsmaschinerie des frühen sekretorischen Weges auf funktioneller Ebene. In Protoplasten von *A. thaliana* Zellsuspensionskulturen wurden systematische Lokalisierungsstudien aller SNARE-Proteine aus *A. thaliana* mittels transienter Überexpression durchgeführt (Uemura et al., 2004). Diese Studien zeigten, dass die vier SNARE-Proteine aus *A. thaliana* (SYP31, MEMB11, SEC22 und BS14a; Sanderfoot et al., 2000), welche als Homologe der ER-Golgi-SNAREs aus *S. cerevisiae* (Sed5p, Bos1p, Sec22p und Bet1p; Burri and Lithgow, 2004) bestimmt wurden, tatsächlich ER- bzw. Golgi-lokalisiert sind. In transienten Expressionsstudien in Epidermiszellen von Tabakblättern konnten die Lokalisation von BET1, MEMB11 und SYP31 am Golgi-Apparat bzw. SEC22 sowohl am ER als auch am Golgi-Apparat beobachtet werden (Chatre et al., 2005). Lediglich in dieser Veröffentlichung wurde von funktionellen Studien der ER-Golgi-SNAREs aus *A. thaliana* auf mikroskopischer Ebene berichtet. Bei Koexpressionen dieser SNARE-Proteine zusammen mit der sekretorischen Form des YFP-Proteins in Tabak-Epidermiszellen wurde das YFP-Protein vermehrt im ER detektiert. Des Weiteren führte die Überexpression von MEMB11 und SEC22 zu einer Umverteilung der koexprimierten Golgi-Marker in das ER. Diese Studien basieren ausschließlich auf mikroskopische Studien am CLSM. Dennoch weisen diese Daten auf die Bedeutung dieser SNARE-Proteine im Proteintransport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat hin.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels transienter Genexpressionsstudien erste Einblicke in die molekularen Abläufe der Prozesse im frühen sekretorischen Weg der Pflanzenzelle zu bekom-

men. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden in Mesophyll-Protoplasten aus *N. tabacum* und BY-2 Wurzelzellkulturen durchgeführt. Aus *N. tabacum* liegen bis zu diesem Zeitpunkt immer noch keine vollständigen Sequenzdaten über die SNARE-Proteine des frühen sekretorischen Weges vor. Um dennoch eine möglichst hohe Homologie der transient exprimierten SNARE-Proteine mit den endogenen SNARE-Proteinen zu gewährleisten, wurden die homologen SNARE-Proteine (LeSed5, LeBos1, LeBet1 und LeSec22) aus *L. esculentum* identifiziert und kloniert. Eine Untersuchung des intrazellulären Proteintransports erfordert unbedingt sekretorisch aktive Zellen. Diese Anforderung wird durch die Verwendung von Protoplasten und BY-2 Wurzelzellen als Versuchsmaterial erfüllt. BY-2 Zellen sind aufgrund ihrer hohen Zellteilungsrate durch einen intensiven intrazellulären Proteintransport gekennzeichnet und die Mesophyll-Protoplasten zeigen nach dem Verlust ihrer Zellwand ebenfalls erhöhte sekretorische Aktivität.

3.2. Identifizierung der ER-Golgi-SNAREs aus *L. esculentum*

Der *trans*-SNARE-Komplex an der *cis*-Golgi-Membran in *S. cerevisiae* setzt sich aus dem Qa-SNARE Sed5p, dem Qb-SNARE Bos1p, dem Qc-SNARE Bet1p als auch dem R-SNARE Sec22p zusammen (Burri and Lithgow, 2004). Zu jedem der SNARE-Proteine aus *S. cerevisiae* wurden in dieser Arbeit Homologe aus *L. esculentum* identifiziert. Aufgrund der hier durchgeführten Sequenzvergleiche der SNARE-Proteine aus *L. esculentum* und den Homologen aus *A. thaliana*, *H. sapiens* und *S. cerevisiae* (Abb. 2.1) erscheinen die identifizierten Proteine auch in *L. esculentum* evolutionär konserviert. Wichtige Bindungsstellen, die zur Regulation der Bildung der *cis*- und *trans*-SNARE-Komplexe beitragen, sind weitestgehend konserviert oder gar identisch (Abb. 2.1). Am Beispiel der Sed5-Homologen sind die Aminosäuren der Sly1-Bindungsstelle im N-terminalen Peptid des Syntaxins identisch (Abb. 2.1 B; Yamaguchi et al., 2002). Auch die Aminosäuren der 16 Bindungsebenen innerhalb der SNARE-Fibrille, welche zur Stabilität der SNARE-Komplexe und damit zur effektiven Membranfusion von COPII-Vesikeln mit der *cis*-Golgi-Membran beitragen, sind zwischen den jeweiligen Vertretern der SNARE-Unterfamilien hoch konserviert (Abb. 2.2 B; Sutton et al., 1998; Fasshauer, 2003). Interessanterweise ergaben die Sequenzvergleiche der SNARE-Motive, dass die namengebende zentrale Aminosäure des „zero layers“ innerhalb der jeweiligen homologen Proteine der Qc- und R-SNAREs nicht konserviert ist. Bereits aus Sequenzvergleichen von AtBS14a und dessen Homolog AtBS14b mit Bet1p und Sft1p aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die jeweilige zentrale Aminosäure des „zero layers“ untypischerweise ein Histidin (AtBS14a, b), Serin (Bet1p) bzw. eine Asparaginsäure (Sft1p) statt einem Glutamin ist. Ein Austausch des Histidins von AtBS14a mit Serin oder Asparaginsäure ergab keinen funktionellen Verlust des Proteins (Tai and Banfield, 2001). Trotz dieses Befundes konnte mittels *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass das Qc-SNARE AtBS14a aus *A. thaliana* SNARE-Komplexe mit den Golgi-SNAREs

Sed5p, Sec22p und Bos1p aus *S. cerevisiae* ausbilden kann. Im Falle der pflanzlichen R-SNARE-Proteine AtSEC22 und LeSec22 ist die zentrale Aminosäure des „zero layers“ ein Valin (V) statt einem Arginin (R) (Abb. 2.2 B; Sanderfoot et al., 2000).

Aufgrund dieser Ergebnisse könnten die ermittelten SNARE-Proteine aus *L. esculentum* auch eine entsprechende Rolle im SNARE-Komplex bei der Fusion von COPII-Vesikeln mit der *cis*-Golgi-Membran spielen.

3.3. Haben die SNARE-Proteine eine Bedeutung auf die Protein-Sekretion *in vivo*?

Während in Hefen und Säugern bereits viel über die Funktion, Lokalisation und Spezifität der ER-Golgi-SNARE-Proteine und deren Komplexbildung mittels Fusionsstudien *in vitro* an Liposomen, als auch Bindungsstudien *in vivo* bekannt ist (Banfield et al., 1994; Hay et al., 1997; Weber et al., 1998; Chen and Scheller, 2001), gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die sich mit der Funktion und Lokalisation der homologen ER-Golgi-SNAREs in Pflanzen auseinandersetzen (Tai and Banfield, 2001; Uemura et al., 2004; Chatre et al., 2005). Um Hinweise darauf zu erlangen, welche Bedeutung die SNARE-Proteine LeSed5, LeBos1, LeBet1 und LeSec22 im Transport zwischen dem ER und Golgi-Apparat einnehmen, wurden transiente Genexpressionsstudien in Tabak-Protoplasten mit der α -Amylase der Gerste (Rogers, 1985) und deren Derivate α -Amylase-HDEL (Phillipson et al., 2001) und α -Amylase-spo (Pimpl et al., 2003) als Reporterproteine durchgeführt. Mit diesem System kann der Einfluss der koexprimierten SNARE-Proteine auf die Sekretion der Reporterproteine *in vivo* untersucht und quantitativ bestimmt werden. Der Einsatz eines pflanzlichen sekretorischen Proteins sollte ausschließen, dass der Transport des Reporterproteins aufgrund einer Inkompatibilität mit dem Transportsystem der pflanzlichen Zelle beeinflusst wird.

3.3.1. Bedeutung und Lokalisation des v-SNAREs LeBet1

In *S. cerevisiae* wurde das LeBet1 Homologon (Bet1p) als essentielles v-SNARE eingeordnet, das für die Fusion von COPII-Vesikeln mit der *cis*-Golgi-Membran benötigt wird (Sogaard et al., 1994; Cao et al., 1998; Cao and Barlowe, 2000). Sowohl Nullmutanten als auch temperatursensitive Mutanten von Bet1p in *S. cerevisiae* weisen Defekte im ER-Golgi-Transport auf, was zu einer Akkumulation von ER-abgeleiteten Membranen und Vesikeln führt (Newman and Ferro-Novick, 1987; Ossig et al., 1991). Zusammen mit dem trimeren t-SNARE-Komplex am *cis*-Golgi, bestehend aus dem R-SNARE Sec22p und den beiden Q-SNAREs Sed5p und Bos1p, kann das v-SNARE Bet1p den *cis*-SNARE-Komplex bilden (Newman et al., 1990; Woodman et al., 1996). *In vitro* Studien zeigten, dass die Anwesenheit von Bet1p die Bindung von Bos1p zu Sed5p zusätzlich verstärkte (Stone et al., 1997; Tsui et al., 2001). Anhand von Lokalisierungs-

studien wurde Bet1p als *cis*-Golgi-residentes Protein beschrieben, dessen Recycling vom Golgi-Apparat zurück zum ER nur sehr langsam abläuft (Ossipov et al., 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Lokalisierungsstudien von YFP-LeBet1 in Tabak-Protoplasten und in BY-2 Zellen zeigten eine punktförmige Verteilung des Fluoreszenzsignals (Abb. 2.8 A, 2.9 A und 2.10 A). Die Signale des *cis*-Golgi-Markers ManI-RFP wie auch die Signale des SNARE-Proteins YFP-LeBet1 konnten in den punktförmigen Strukturen des Golgi-Apparates beobachtet werden. Diese Kolo-kalisation beider Signale lässt eine Lokalisierung von LeBet1 am Golgi-Apparat vermuten. Die Lokalisation des *cis*-Golgi-Markers wird durch die Koexpression des SNARE-Proteins nicht im Geringsten beeinträchtigt. Als eine zusätzliche Kontrolle für die Lokalisation des SNARE-Proteins LeBet1 am Golgi-Apparat wurde der Inhibitor BFA verwendet. BFA interagiert mit dem GEF-ARF-GDP-Komplex (Donaldson et al., 1992; Helms and Rothman, 1992) und stabilisiert diesen (Peyroche et al., 1999). Als Folge dieser Stabilisierung wird die Rekrutierung der COPI-Hüllproteine inhibiert (Orci et al., 1991; Dascher and Balch, 1994). Die hierzu erforderlichen Konzentrationen unterliegen jedoch starken Schwankungen in Abhängigkeit der verwendeten Zellen. So wurden bei verschiedenen Säugerzellen bis zu 500fache Unterschiede in der wirksamen Konzentration des BFA beschrieben (Torii et al., 1995). Die in Pflanzen eingesetzten Konzentrationen liegen bei Untersuchungen *in vivo* meist zwischen 2 und 200 μM (Satiat-Jeunemaitre et al., 1996). Weiterhin erfordert die Inhibierung der Rekrutierung der COPI-Hüllproteine *in vitro* 10fach höhere BFA-Konzentrationen als die Inhibierung *in vivo* (Orci et al., 1991). Die in dieser Arbeit verwendete BFA-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht 35,7 μM) liegt somit im Bereich geringer BFA-Konzentrationen für Untersuchungen *in vivo*. In Studien von Pimpl et al. (2003) wurde bereits gezeigt, dass bei transienten Expressionsstudien von α -Amylase in Tabak-Protoplasten die Zugabe von 30 μM BFA zu einer starken Inhibierung der Sekretion von α -Amylase führte. Daher sollte bei Einsatz von 35,7 μM BFA in Tabak-Protoplasten eine Umverteilung von Golgi-lokalisierten Proteinen eindeutig zu detektieren sein.

Im Falle des anerkannten *cis*-Golgi-Markers ManI-XFP als Kontrolle konnte das GFP- oder RFP-Signal nach BFA-Behandlung nicht mehr in punktförmigen Strukturen detektiert werden, vielmehr war dieses ausschließlich in den tubulären Strukturen des ERs zu beobachten (Abb. 2.9 D-F). Das YFP-Signal des SNARE-Proteins YFP-LeBet1 hingegen konnte nach BFA-Behandlung sowohl im ER-Netzwerk als auch in punktförmigen Aggregaten detektiert werden (Abb. 2.9 A-C). Aufgrund dieser Umverteilung des YFP-Signals kann man davon ausgehen, dass das SNARE-Protein LeBet1 zwar im Golgi-Apparat lokalisiert ist, allerdings kann anhand dieser Fluoreszenzdaten keine konkrete Aussage über eine vermutete *cis*-Golgi-Lokalisierung dieses SNARE-Proteins gemacht werden, da sich YFP-LeBet1 nicht ganz wie ManI-RFP verhält. Die Aggregatbildung könnte zum einen durch unspezifische oder nicht funktionelle SNARE-Komplex-Bildung zwischen ER-abgeleiteten Vesikeln oder Golgi-Zisternen entstehen. Zum

anderen könnte es sich aber auch um *trans*-Golgi-Zisternen handeln, welche sich als Einzelzisternen abspalten und akkumulieren. Allerdings war das Ausmaß der Aggregatbildung nicht in allen Protoplasten gleichstark ausgeprägt (Abb. 2.9 B und C).

Frühe Arbeiten vermuteten bereits eine direkte Interaktion zwischen dem SNARE-Motiv von Bet1p und den COPII-Hüllproteinen Sec23/24 (Springer and Schekman, 1998; Rein et al., 2002). Diese Hypothese konnte durch Studien von Mossessoova et al. (2003) bestätigt und etabliert werden. Im COPII-Hüllprotein Sec24 wurde eine Bindungsstelle identifiziert, die so genannte „B-site“, an die das SNARE-Protein Bet1p mittels der am N-terminus des SNARE-Motivs befindlichen LxxLE-Sequenz binden kann. Aufgrund dessen, dass diese Sequenz zwischen Hefen, Säugern und Pflanzen nicht konserviert ist, wurden Bindungsstudien in Bezug auf Interaktionen von LeBet1 mit COPII-Hüllproteinen nicht in Betracht gezogen.

In Säugerzellen gibt es Hinweise darauf, dass das homologe SNARE BET1 sowohl am Transport vom ER zum ERGIC („ER-Golgi intermediate compartment“), auch VTC („vesicular tubular cluster“) genannt, als auch vom ERGIC zur *cis*-Golgi-Membran beteiligt ist und ein stetiges Recycling von BET1 zwischen diesen Kompartimenten stattfindet (Zhang et al., 1997; Ballensiefen et al., 1998; Hay et al., 1998; Rowe et al., 1998). Allerdings scheint diese hohe Dynamik unabhängig von SNARE-SNARE-Interaktionen zu sein. Mutiert man das SNARE-Motiv von BET1 in der Weise wie in Joglekar et al. (2003) geschehen, so ist BET1 nicht mehr in der Lage binäre, tertiäre und quartäre SNARE-SNARE-Interaktionen auszubilden. Dennoch ist der Transport von BET1 an sich nicht verändert. Das bedeutet, es wird weiterhin in COPI-Vesikel rekrutiert, transportiert und recycelt. Das BET1-Protein-Targeting scheint daher eine komplett unabhängige Funktion des SNARE-Motivs an sich zu sein.

Ähnlich könnte man auch die Überexpressionsdaten von LeBet1 in Tabak-Protoplasten interpretieren. Die Überproduktion des cytosolischen als auch des wildtypischen LeBet1-Proteins in Tabak-Protoplasten bewirkte keinen Effekt auf die Sekretion des löslichen Reporterproteins α -Amylase (Abb. 2.4 und 2.6). Trotz des relativ sensiblen Expressionssystems, gerade gegenüber Überexpressionen, scheinen die Transportvorgänge der potentiellen v-SNARE-Proteine nicht beeinträchtigt zu werden. Die zunehmende Expression beider SNARE-Proteine konnte sogar mittels Western-Blot-Analysen eindeutig nachgewiesen werden, sodass ein Abbau der SNARE-Proteine in den Tabak-Protoplasten auszuschließen ist. Des Weiteren zeigen die Daten, dass LeBet1 sehr wohl im Golgi-Apparat von Pflanzen zu finden ist, es aber unsicher ist, ob LeBet1 nur „passiv“ transportiert, also nicht als funktionelle Einheit dient, oder ob es in der Lage ist weiterhin SNARE-SNARE-Interaktionen einzugehen.

Die Ergebnisse der funktionellen als auch der CLSM-Studien zeigen, dass eine Überproduktion des Qc-SNAREs LeBet1 weder einen Einfluss auf die Sekretion und die Synthese des löslichen Reporterproteins α -Amylase hat noch den Transport des Golgi-Markers ManI-XFP stört. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen für das homologe Qc-SNARE AtBS14a aus *A. thaliana*

(Chatre et al., 2005). In Untersuchungen über Komplementationversuche von AtBS14a und AtBS14b in *S. cerevisiae* (Tai and Banfield, 2001) und *in vitro* Bindungsstudien verschiedener SNARE-Protein-Komplexe aus *S. cerevisiae* (Tsui et al., 2001) wurde bereits über eine funktionelle Redundanz innerhalb der Qc-SNARE-Familie in *A. thaliana* und *S. cerevisiae* diskutiert. Bis heute konnten auch mittels genetischer Untersuchungen in *A. thaliana* keine Phänotypen für ein Qc-SNARE gefunden werden (Lipka et al., 2007).

3.3.2. Welche Bedeutung hat die Redundanz des Longins LeSec22?

Das R-SNARE Sec22p aus *S. cerevisiae* wird sowohl für den anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat, wo es als t-SNARE fungiert (Lian and Ferro-Novick, 1993; Cao and Barlowe, 2000; Parlati et al., 2000), als auch als v-SNARE im Transport vom Golgi-Apparat zum ER benötigt (Semenza et al., 1990; Sacher et al., 1997; Spang and Schekman, 1998; Burri et al., 2003). Es ist somit im anterograden und auch retrograden Transport vorhanden. Das Recycling von Sec22p vom Golgi-Apparat zurück zum ER ist COPI-abhängig (Ballensiefen et al., 1998). *In vivo* Studien in *S. cerevisiae* zeigen, dass ein Signal in der Longin-Domäne von Sec22p zusammen mit einem zweiten Signal innerhalb des SNARE-Motivs von Sec22p für den COPII-abhängigen ER-Export benötigt wird. Beide Signale interagieren miteinander, was zu einer geschlossenen Formation des SNARE-Proteins führt. Aufgrund dieser Konformation ist eine direkte Bindung an den COPII-Hüllprotein-Komplex Sec23/24 möglich und somit ein gezielter COPII-abhängiger Export aus dem ER gewährleistet (Miller et al., 2003; Mossessoiva et al., 2003; Liu et al., 2004; Mancias and Goldberg, 2007). Die cytoplasmatische Domäne von Sec22p erlaubt dessen Aufnahme in synthetische Transportvesikel (Matsuoka et al., 1998).

Ob diese Signale im Transport der pflanzlichen Homologe von Sec22p eine ähnlich wichtige Rolle haben ist bis heute nicht bekannt. In Untersuchungen von Chatre et al. (2005) wurde gezeigt, dass die transiente Überproduktion von AtSEC22 in Tabak-Epidermiszellen zu einer Mislokalisierung der Golgi-Marker ST und ERD2 in das ER führten. Diese Ergebnisse und die Lokalisation von AtSEC22 sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat (Uemura et al., 2004; Chatre et al., 2005) deuten auf eine Beteiligung von AtSEC22 am ER-Golgi-Transport in Pflanzen hin.

Zur Charakterisierung von LeSec22 *in vivo* wurden sowohl das Wildtyp-Protein als auch die beiden N- und C-terminalen LeSec22-Deletionsmutanten in transienter Koexpression mit α -Amylase als Reporter für den COPII-abhängigen Transport in Tabak-Protoplasten getestet. Hierbei war allerdings kein Effekt auf die Sekretion der α -Amylase nachweisbar, obwohl die überexprimierten Proteine deutlich nachweisbar waren (Abb. 2.11 und 2.12). Darüber hinaus führten auch die Koexpressionen von LeSec22 mit α -Amylase-HDEL als Reporter des COPI-abhängigen retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER zu keinem veränderten Sekretionsverhalten von α -Amylase-HDEL (Abb. 2.13). Diese quantitativen Analysen stehen deutlich im Gegensatz zu den Ergebnissen von Chatre et al. (2005) und deuten darauf hin, dass die Ü-

berproduktion des SNARE-Proteins keinen hemmenden Einfluss auf den bidirektionalen Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat bedingt. Die Lokalisierungsstudien sowohl in Tabak-Protoplasten als auch in BY-2 Zellen unterstützen die biochemischen Daten insofern, dass die Koexpression von YFP-LeSec22 mit dem Golgi-Marker ManI-RFP zu keiner Mislokalisierung des Golgi-Markers führten (Abb. 2.15 D-F und 2.16). Des Weiteren zeigten diese Studien eine eindeutige Lokalisierung von YFPLeSec22 im ER und am *cis*-Golgi (Abb. 2.15). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass LeSec22 ebenso wie dessen Homologon AtSEC22 am bidirektionalen ER-Golgi Transport in Pflanzen beteiligt ist. Inwiefern dieses SNARE-Protein von biologischer Relevanz der ER-Golgi-Fusionsmaschinerie ist, kann aufgrund der Ergebnisse in dieser Arbeit nicht beurteilt werden und bedarf daher weiterer Untersuchungen. Im Falle der R-SNARE-Unterfamilie aus *A. thaliana* konnte, bis auf die Ausnahme eines erst kürzlich entdeckten salzresistenten Phänotyps (Leshem et al., 2006), kein weiterer Phänotyp in *Arabidopsis* R-SNARE-Mutanten gefunden werden, was auf eine partielle Redundanz dieser SNARE-Proteine hindeuten kann (Lipka et al., 2007). Auch im Bereich der Hefeforschung wird über eine zumindest teilweise funktionelle Redundanz einzelner R-SNARE-Proteine diskutiert. Die Analyse von Knockout-Mutanten führte zu dem Ergebnis, dass das SEC22-Gen für das Wachstum an sich entbehrlich ist. Im Gegensatz dazu sind die für Sed5p und Bos1p kodierenden Gene essentiell für Zellwachstum (Semenza et al., 1990; Dascher et al., 1991). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das R-SNARE Ykt6p, welches die höchste Identität zu Sec22p innehat und vorwiegend bei Fusionen des intra-Golgi-Transports beteiligt ist, in *sec22Δ*-Mutanten vermehrt exprimiert wurde und auch in COPII-Vesikeln nachzuweisen war (Tsui et al., 2001; Liu and Barlowe 2002). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise darauf, dass eine Deletion oder ein Single-Knockout von R-SNAREs in *Drosophila* (Deitcher et al., 1998), wie auch in *Caenorhabditis elegans* (Nonet et al., 1998) und in Mäusen (Schoch et al., 2001) nicht zwingend zu einem vollständigen Zusammenbruch der Transportwege und damit zur Letalität dieser Organismen führt (Hong, 2005).

3.3.3. Bedeutung von LeBos1 für den frühen sekretorischen Weg und dessen Lokalisierung

Das als Qb-SNARE klassifizierte Bos1p aus *S. cerevisiae* ist für die Fusion von COPII-Vesikeln mit der *cis*-Golgi-Membran unerlässlich (Newman et al., 1990; Ferro-Novick et al., 1991; Newman et al., 1992). Zusammen mit Sec22p bindet es an das Qa-SNARE Sed5p und bildet somit den trimeren t-SNARE-Komplex an der *cis*-Golgi-Membran aus (Sacher et al., 1997; Tsui et al., 2001). Es agiert ausschließlich als t-SNARE im anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat (Lian and Ferro-Novick, 1993; Spang and Schekman, 1998; Ossipov et al., 1999), zyklisiert aber mittels COPII- und COPI-Vesikeln zwischen dem ER und dem Golgi-

Apparat (Letourneur et al., 1994; Schekman and Orci, 1996; Matsuoka et al., 1998; Cao and Barlowe, 2000; Honda et al., 2005). In *A. thaliana* wurden Qb-SNARE-Proteine bereits mit einer Reihe biologischer Prozesse, wie Cytokinese oder Autophagie, in Verbindung gebracht (Lipka et al., 2007). Das Qb-SNARE-Protein AtVTI11, das am prävakuolären Kompartiment lokalisiert ist (Zheng et al., 1999), nimmt in der Etablierung und Erhaltung der Organisation von Geweben wie auch im Streckenwachstum der Pflanzen eine bedeutende Rolle ein. Entsprechende Mutanten weisen abnormal strukturierte Vakuolen und eine veränderte Morphologie des Stängels auf (Morita et al., 2002; Surpin et al., 2003). In Hefen führt die Substitution der zentralen Aminosäure Glutamin (Q) mit Arginin (R) im SNARE-Motiv von Bos1p zu schwerwiegenden Störungen. Diese Mutante (bos1-[Q186R]) ist nicht wachstumsfähig (Graf et al., 2005).

Als Folge der Überproduktion von LeBos1 in Tabakprotoplasten sank die Sekretion der α -Amylase mit steigenden Expressionsraten des LeBos1 drastisch ab. Untersuchungen in *S. cerevisiae* ergaben, dass die Zugabe von anti-Bos1p Antikörpern zu einer Blockierung der Fusion von Transportvesikeln mit dem Golgi-Apparat führt (Lian and Ferro-Novick, 1993). Die sofort sinkende α -Amylase-Sekretion zeigt, dass höchstwahrscheinlich der anterograde COPII-abhängige Transport betroffen sein muss. Im Falle der Überproduktion der cytosolische Deletionsmutante LeBos1 Δ TMD wurde die α -Amylase-Sekretion hingegen nicht beeinflusst (Abb. 2.17). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Qb-SNARE LeBos1 eine zentrale Bedeutung für den Transport im frühen sekretorischen Weg hat. Des Weiteren zeigen diese Versuche, dass für die Funktion dieses SNARE-Proteins die Anwesenheit der Transmembrandomäne von essentieller Relevanz ist. In Untersuchungen von SNARE-Proteinen in Säugern konnte gezeigt werden, dass die Fusionseffizienz mit zunehmender Länge eines Linkers, vergleichbar mit dem Fehlen der Transmembrandomäne, der zwischen das SNARE-Motiv und die Transmembrandomäne inseriert wurde, systematisch abnimmt (McNew et al., 1999). Um die Energiebarriere der Fusion von Membranen zu überwinden benötigt es einen aktiven Mechanismus. Die räumliche Nähe zweier Membranen ist nicht ausreichend um eine Fusion voranzutreiben (McNew et al., 2000). Daher nimmt man an, dass die Funktion der SNARE-Komplexe nicht nur darin besteht zwei Membranen in räumliche Nähe zu bringen, sondern dieser auch einen spezifischen und biologisch relevanten Mechanismus benutzt um die Fusion der Membranen zu begünstigen (Weber et al., 1998; Nickel et al., 1999; Parlati et al., 2000; Ungermann et al., 2005; Jahn and Scheller, 2006).

Auch die in dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Studien sowohl in Tabak-Mesophyll-Protoplasten als auch in den BY-2 Wurzelzellen zeigten eine Beeinflussung des ER-Golgi-Transports. So kam es bei Koexpression von YFP-LeBos1 mit dem Golgi-Marker ManI-RFP zu einer teilweisen Umverteilung des Golgi-Markers in das ER (Abb. 2.19 A-C und 2.20). Aufgrund der Retention des YFP-Signals in das ER-Netzwerk nach der Inkubation mit BFA, kann von einer Golgi-Lokalisation des YFP-LeBos1 gesprochen werden. Diese Ergebnisse sind

zwar vergleichbar mit den Resultaten aus den Untersuchungen von Chatre et al. (2005), jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich als Folge der transienten Expression von YFP-LeBos1 eine vermehrte Aggregat-Bildung beobachtet werden. In diesen Aggregaten kam es zu einer Kolokalisation der Fluoreszenz-Signale von YFP-LeBos1 und ManI-RFP. Diese Aggregate könnten die Folge der veränderten Konzentrationsverhältnisse der ER-Golgi-SNARE-Proteine und der daraus resultierenden Bildung nicht fusiogener SNARE-Komplexe (Varlamov et al., 2004) sein. In diesem Falle können COPII-Vesikeln zwar noch an die *cis*-Golgi-Membran andocken und *cis*-SNARE-Komplexe ausbilden, aber die Fusion der Membranen bleibt aus und es kommt zu einer unkontrollierten Anreicherung von Vesikeln am Golgi-Apparat. In Hefen resultierte die Depletion von Bos1p in einer Blockierung des ER-Golgi-Transports und es konnten Akkumulationen von kleinen Transportvesikeln nachgewiesen werden (Shim et al., 1991). Um allerdings eine möglichst exakte Aussage über die Entstehung und Struktur der Akkumulationen in der Pflanzenzelle machen zu können, müsste im als nächstes eine elektronenmikroskopische Analyse in stabil transformierten Pflanzen durchgeführt werden.

3.3.4. Charakterisierung des Syntaxins LeSed5

Das Qa-SNARE Sed5p aus *S. cerevisiae* und das dazu homologe Syntaxin 5 aus Säugern wurden am Golgi-Apparat lokalisiert (Hong, 2005; Jahn and Scheller, 2006) und spielen eine zentrale Rolle im anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat wie auch im retrograden Transport innerhalb des Golgi-Apparates (Banfield et al., 1995; Sacher et al., 1997; Wooding and Pelham, 1998; Peng and Gallwitz, 2004; Volchuk et al., 2004). In *A. thaliana* wurde das homologe Syntaxin AtSYP31 ebenfalls am *cis*-Golgi (Uemura et al., 2004; Chatre et al., 2005) lokalisiert und markiert die Zellplatte während der Cytokinese (Rancour et al., 2002). In *N. tabacum* ist das Syntaxin LeSed5 ebenso Golgi lokalisiert und nimmt, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, eine wichtige regulatorische Rolle in den SNARE-SNARE-Interaktionen des frühen sekretorischen Weges der Pflanze ein. Die Kombination der in dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen und biochemischen Untersuchungen zeigt eine starke Beeinflussung der COPII- und COPI-abhängigen Transportwege zwischen dem ER und Golgi-Apparat bei Überproduktion von LeSed5. Dieser Befund widerspricht aktuellen Arbeiten in Pflanzen (Chatre et al., 2005), erinnert aber an die Resultate von Hardwick and Pelham (1992), die gezeigt haben, dass die Überproduktion von Sed5p in *S. cerevisiae* den ER-Golgi-Transport verlangsamt und zu einer Akkumulation von Vesikeln führt. In weiteren Studien konnte festgestellt werden, dass die Überproduktion von Sed5p auch zu einer Inhibition des Zellwachstums und der Zellteilungsrate führt (Wooding and Pelham, 1998; Weinberger et al., 2005). Ein „Knockout“ des SNAREs kann sogar bis zur Letalität des Organismus führen (Hardwick and Pelham, 1992; Winzeler et al., 1999). In *A. thaliana* sind „gene disruptions“ oder „Knockouts“ von Syntaxinen ebenfalls letal (Lukowitz et al., 1996; Sanderfoot et al., 2001; Lipka et al., 2007).

3.3.4.1. Überexpression von LeSed5 beeinflusst den Proteintransport des frühen sekretorischen Wegs

Die transienten Genexpressionen von wt LeSed5 und der entsprechenden N-terminalen HA- bzw. XFP-Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten zeigten einen drastischen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion von α -Amylase. Ein vergleichbarer Effekt auf die Sekretion konnte durch die Überproduktion der N-terminalen Deletionsmutante LeSed5 Δ NT erzeugt werden, wohingegen die cytosolischen Derivate keine messbare Beeinträchtigung auf die Sekretion des Reporterproteins aufwiesen (Abb. 2.21, 2.24 und 2.27). Die Ergebnisse der N-terminalen Deletionsmutante LeSed5 Δ NT zeigen, dass die inhibitorische SNARE-Aktivität von LeSed5 unabhängig ist von der Anwesenheit des N-terminalen Peptids, welches mit dem SM-Protein Sly1 interagiert (Bracher and Weissenhorn, 2002; Yamaguchi et al., 2002). In Hefen und in Säugern haben die Vertreter der SM-Proteinfamilie regulatorische Funktionen inne. Diese binden an den N-Terminus der jeweiligen Syntaxine, was zu einer Konformationsänderung der Syntaxine führt und die Bindung der SNARE-Komplexe begünstigt (Dascher and Balch, 1996; Misura et al., 2000; Kosodo et al., 2002; Peng and Gallwitz 2002; Dulubova et al., 2003, Williams et al., 2004). Des Weiteren scheint das N-terminale Peptid auch keine Rolle im Targeting von LeSed5 inne zu haben, wie dies in Fluoreszenzstudien in *N. tabacum* mit der N-terminalen Deletionsmutante YFP-LeSed5 Δ NT gezeigt werden konnte. Diese Deletionsmutante wurde in mobilen punktförmigen Strukturen, die höchstwahrscheinlich den Golgi-Apparat darstellen, aber auch in vergrößerten punktförmigen Strukturen detektiert (Abb. 2.29 D-F). Die Rolle von Sly1 ist in Pflanzen noch nicht untersucht worden. Bis heute wurden nur an zwei SM-Proteinen aus *A. thaliana* Studien in Pflanzen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um das AtVPS45, welches am TGN lokalisiert ist (Bassham et al., 2000), und um KEULLE, das mit dem Cytokinase-spezifischen Syntaxin KNOLLE interagiert (Assad et al., 2001).

Im Falle der fehlenden inhibitorischen Aktivität auf die Sekretion α -Amylase bei Expression der cytosolischen LeSed5-Deletionsmutanten (LeSed5 Δ TMD) stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu den Untersuchungen des Plasmamembran-Syntaxin NtSYR1 (Geelen et al., 2002), in denen gezeigt wurde, dass nur das cytosolische Protein (SP2) die Sekretion inhibiert, nicht aber das Wildtyp-Protein selbst. Die Ergebnisse mit LeSed5 sind aber vergleichbar mit denen von Foresti et al. (2006), welche gezeigt haben, dass eine Überproduktion des cytosolischen Syntaxins des prävakuolären Kompartiments (PVC) SYP21 im Vergleich zum Wildtyp keinen inhibitorischen Effekt auf den sekretorischen Weg zeigte. Demnach ist, wie auch im Falle von LeBos1, die Transmembrandomäne des LeSed5 wichtig für die Fusionskompetenz und die regulatorische Wirkung des SNARE-Proteins. Bereits in Hefen und Säugern wurde beobachtet, dass die Anwesenheit und auch die Länge der Transmembrandomäne von Sed5p bzw. Syntaxin 5 für deren intrazelluläre Lokalisierung entscheidend sind (Banfield et al., 1994; Kasai et al., 2001; Watson et al., 2001). Erst kürzlich wurde die Rolle von Transmembrandomänen bei der Memb-

ranfusion mittels SNARE-Proteinen und viralen Fusionsproteinen diskutiert (Langosch et al., 2007). In *S. cerevisiae* führten Punktmutationen oder Deletionen der Transmembrandomäne von Vam3p zu einer reduzierten Fusion der Vakuolen (Rhode et al., 2003; Hofmann et al., 2006). Auch in Säugern und *C. elegans* wurde nach Ersetzen der jeweiligen Transmembrandomäne oder verschiedener Punktmutationen innerhalb der Transmembrandomäne von SNARE-Proteinen eine verminderte Fusionsaktivität nachgewiesen (Nonet et al., 1998; Saifee et al., 1998; Grote et al., 2000; Langosch et al., 2001; Xu et al., 2005; Giraudo et al., 2005). Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisierungsstudien in Tabak-Protoplasten konnte beobachtet werden, dass die Deletionsmutante YFP-LeSed5 Δ TMD höchstwahrscheinlich keine Interaktionen mit den SNARE-Komplexen am Golgi-Apparat eingeht, da das YFP-Signal ausschließlich im Cytosol und nie zusammen mit dem koexprimierten Golgi-Marker ManI-RFP in den punktförmigen Strukturen des Golgi-Apparates nachzuweisen war (Abb. 2.29 G-I).

Die Überexpression von LeSed5 in Tabak-Protoplasten führte nicht nur zu einer Inhibition der Sekretion von α -Amylase, sondern auch zu einer verminderten Neusynthese von α -Amylase, was man anhand der Gesamtaktivitäten von α -Amylase-Aktivität im Kulturmedium und in den Zellen beobachten konnte (Abb. 2.22 B und 2.23 A). Allerdings traten diese beiden Effekte zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Wohingegen die Inhibition der α -Amylase-Sekretion bereits sofort nach der Transfektion der Tabak-Protoplasten zu detektieren war, konnte die verminderte Neusynthese von α -Amylase erst nach einer Inkubation von vier Stunden beobachtet werden. Letztendlich scheint die Überproduktion von LeSed5 eine toxische Wirkung auf den Organismus zu haben und sowohl der anterograde als auch der retrograde Transport zwischen dem ER und Golgi-Apparat bricht nach Inkubation von 24 Stunden fast vollständig zusammen (Abb. 2.25 und 2.26). Auch in *S. cerevisiae* hat eine starke Überproduktion von Sed5p einen eindeutig toxischen Effekt (Braun and Jentsch, 2007). In Säugern inhibiert die Anwesenheit von anti-Syntaxin 5 Antikörpern das „tethering“ und die Fusion von COPII-Vesikeln, was eine unerwartete Rolle des SNARE-Proteins aufwärts der Fusion bedeuten kann. In diesen Studien konnte auch gezeigt werden, dass die Konzentrationen der einzelnen, an der Bildung oder Disassemblierung eines SNARE-Komplexes beteiligten Komponenten, wie zum Beispiel die Tethering-Faktoren p15 und GM130 als auch das α -SNAP, von zentraler Bedeutung sind (Bentley et al., 2006). Die Überproduktion des t-SNAREs LeSed5 könnte aufgrund der Limitierung der an der Fusion beteiligten regulatorischen Proteine zur Bildung nicht fusogener SNARE-Komplexe (i-SNAREs; Varlamov et al., 2004) führen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse von Chatre et al. (2005) lassen sich dadurch begründen, dass diese Autoren mit C-terminalen Fusionsproteinen gearbeitet haben. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels quantitativer Enzymtests gezeigt werden, dass das C-terminale Fusionsprotein LeSed5-GFP die Sekretion nicht beeinflusste, wohingegen die Fusion des GFP am N-Terminus des Syntaxins (GFP-LeSed5) die Sekretion hemmte, die Funktion des SNARE-Proteins also

nicht beeinträchtigte (Abb. 2.28). Alle in dieser Arbeit untersuchten N-terminalen Fusionsproteine verhielten sich auf die gleiche Art wie die jeweiligen Wildtyp-Proteine. Daher kann man davon ausgehen, dass die N-terminale Fusion die Methode der Wahl ist. Chatre et al. (2005) hatten absichtlich die C-terminale Fusion gewählt, um einer möglichen Beeinflussung mit den regulatorischen N-terminalen SNARE-Domänen vorzubeugen. Jedoch konnten bereits in früheren Studien in Hefen und Säugern keine Beeinträchtigung durch eine N-terminale Fusion der SNARE-Proteine festgestellt werden (Dascher and Balch, 1996; Nagahama et al., 1996; Rayner and Pelham, 1997; Wooding and Pelham, 1998; Burri et al., 2003). Aus den quantitativen Daten (Abb. 2.29) der vorliegenden Arbeit könnte man schließen, dass durch die Fusion des GFP-Proteins an den C-Terminus des SNARE-Proteins (LeSed5-GFP) dieses nicht mehr in der Lage ist mit den endogenen Komponenten zu interagieren. Somit könnte dieses SNARE-Fusionsprotein nicht mehr in den *cis*- oder *trans*-SNARE-Komplex aufgenommen werden. Mikroskopische Daten zeigen aber, dass dieses SNARE-Fusionsprotein zum Golgi-Apparat transportiert und aufgenommen wird (Abb. 2.30 G-L und 2.31 G-I) und es somit quasi als Golgi-Marker fungieren kann.

Unlängst wurde gezeigt, dass Moleküle mit endständiger Transmembrandomäne in SRP-unabhängiger Weise mit Hilfe des cytosolischen TRCs („TMD recognition complex“) in die ER-Membran transloziert werden können (Stefanovic and Hedge, 2007). Allerdings kann dieses Protein, durch eine Verlängerung des Polypeptids „upstream“ über die Transmembrandomäne hinaus, sowohl in SRP-abhängiger als auch in TCR-abhängiger Weise in das ER inseriert werden. Ob die Art der Insertion der SNARE-Proteine in die ER-Membran eine Auswirkung auf die Funktionalität der SNAREs hat, ist bis heute noch nicht geklärt.

3.3.4.2. Lokalisierung von LeSed5 im frühen sekretorischen Weg

Beide „full-length“ LeSed5-XFP-Fusionsvarianten (C- und N-terminale XFP-Fusionen) konnten am Golgi-Apparat lokalisiert werden. Die transiente Expression des funktionellen GFP-LeSed5 führte mit ansteigender Inkubationszeit vermehrt zur Bildung von Aggregaten (Abb. 2.30 A-C). Die Signale des LeSed5-GFP hingegen waren auch nach langer Inkubationszeit in den punktförmigen Strukturen des Golgi-Apparates zu beobachten und eine Aggregatbildung blieb in diesem Falle aus (Abb. 2.30 G-I). Wurde XFP-LeSed5 zusammen mit Marker-Proteinen koexprimiert, welche in der Regel COPII-abhängig vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden, so erreichte keines der Marker-Proteine sein typisches Zielkompartiment. Sowohl die Golgi-Marker ManI-RFP (Abb. 2.29 A-C) und ST-GFP (Abb. 2.31 A-C), als auch der Plasmamembran-Marker RFP-TMD23 (Abb. 2.31 D-F) und das Plasmamembran-Syntaxin YFP-SYP121 (Abb. 2.34) blieben größtenteils im ER zurück oder waren in Aggregaten kolokalisiert zu finden.

Bei mikroskopischen Studien von YFP-LeSed5 koexprimiert mit secGFP bzw. GFP-HDEL konnte der inhibitorische Effekt von „full-length“ LeSed5-Derivaten auf die Sekretion der löslichen Reporterproteine α -Amylase und α -Amylase-HDEL, welche im frühen sekretorischen Weg COPII- bzw. COPI-abhängig transportiert werden, ebenso beobachtet werden. So wurde secGFP größtenteils in den tubulären Strukturen des ERs zurückgehalten (Abb. 2.32). Im Falle von GFP-HDEL, welches zwischen dem ER und Golgi-Apparat zyklisiert, konnte bei Koexpression mit YFP-LeSed5 ein deutliches Aufblähen der ER-Strukturen festgestellt werden (Abb. 2.33). Diese Ergebnisse deuten auf eine Blockierung des anterograden COPII-abhängigen Transports hin. Ein möglicher gewebespezifischer Effekt (Blattmesophyllzellen vs. Wurzelzellen) kann in diesem Falle ausgeschlossen werden, da auch eine Kotransfektion von BY-2 Wurzelzellen mit GFP-LeSed5 und ManI-RFP zu einer Fehllokalisierung des Golgi-Markers in das ER und zu einer vermehrten Aggregatbildung des GFP-Signals mit zunehmender Inkubationsdauer führte (Abb. 2.37). Wahrscheinlich ist, dass sowohl die Inkubationsdauer, als auch die Stärke der Expression eine Rolle bei der Lokalisierung von LeSed5 spielen. Erst nach Lokalisierungsstudien in transient transfektierten Blättern von stabil transformierten ST-CFP Tabakpflanzen konnten bei einer niedrigen Expressionsrate des YFP-LeSed5 das Signal des SNARE-Proteins zusammen mit dem Signal des Golgi-Markers in den mobilen punktförmigen Strukturen des Golgi-Apparates detektiert werden (Abb. 2.38). Somit kann man annehmen, dass sowohl im Falle des inhibitorischen SNARE-Fusionsproteins XFP-LeSed5, als auch im Falle des scheinbar inaktiven LeSed5-GFP, das Zielkompartiment der Golgi-Apparat ist.

Für ein weiteres Kontrollexperiment zur möglichen Lokalisierung des Syntaxins LeSed5 am Golgi-Apparat wurden „full-length“ LeSed5-Derivate exprimierende Tabak-Protoplasten mit BFA behandelt. Es ergab sich eine interessante Beobachtung. Während das C-terminale Fusionsprotein LeSed5-GFP nach BFA-Behandlung eine partielle Umverteilung des GFP-Signals in das ER zeigte (Abb. 2.30 J-L), konnte im Falle des N-terminalen Fusionsproteins GFP-LeSed5 eine BFA-Resistenz beobachtet werden (Abb. 2.30 D-F).

Es stellt sich nun die Frage: Was stellen diese punktförmigen Strukturen verschiedener Größe, die während der Überproduktion von GFP-LeSed5 entstehen, tatsächlich dar?

In Säugern konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit BFA eine Rückverteilung von Golgi-Enzymen in das ER bewirkt, während eine Reihe von Strukturproteinen, wie zum Beispiel die „Golgins“, intakt im Cytosol zurückbleiben (Seemann et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen stellen die Strukturproteine während der Telophase eine Art Gerüst für die ER-abgeleiteten Golgi-Enzyme bereit (Seemann et al., 2002). Ähnliche Bedingungen werden auch nach dem Auswaschen von BFA angenommen. Daher scheint die BFA-Behandlung in Säugerzellen eine ähnliche Reaktion hervorzurufen, wie der Eintritt der Zellen in die Mitose, welcher eine Inaktivierung von Arf1 zur Folge hat (Altan-Bonnet et al., 2003; Kap. 2.3.2 und 3.3.1). Weitere Beobachtungen des Golgi-Apparates während der Zellteilung in Säugerzellen

lassen vermuten, dass in der Pro-Metaphase Fragmente des Golgi-Apparates in der Nähe von sogenannten „ER exit sites“ akkumulieren, bevor diese während der Metaphase vollständig in das ER aufgenommen werden und dieses dann letztendlich selbst fragmentiert (Altan-Bonnet et al., 2006). Obwohl auch in Pflanzen viele homologe „Golbins“ zu finden sind, fragmentiert der Golgi-Apparat in höheren Pflanzen während der Mitose nicht (Latijnhouwers et al., 2005). Möglicherweise sind die stabilen BFA-resistenten LeSed5-Kompartimente mit den pro-metaphasischen Golgi-Fragmenten aus Säugerzellen nach BFA-Behandlung zu vergleichen. Interessanterweise konnte in Säugerzellen gezeigt werden, dass „gene silencing“ von Syntaxin 5 mittels RNAi zur Fragmentation des Golgi-Apparates führte (Suga et al., 2005). In *S. cerevisiae* hingegen führte die Überproduktion von Sed5p zu einer Anreicherung von Vesikeln (Hardwick and Pelham, 1992).

Ob es sich bei den durch die Überproduktion entstandenen Aggregaten von XFP-LeSed5 in *N. tabacum* um eine Akkumulation von Vesikeln oder um Golgi-Fragmente handelt, kann nur durch elektronenmikroskopische Studien ermittelt werden. Dafür sind zum Beispiel stabil transformierte XFP-LeSed5 bzw. LeSed5-XFP BY-2 Zelllinien unter einem induzierbaren Promotor nötig. Damit können dann auch vergleichende Studien auf ultrastruktureller Ebene zwischen C- und N-terminalem LeSed5 durchgeführt werden. Hierzu wurde zunächst die stabil transformierte BY-2 LeSed5-GFP Zelllinie unter einem induzierbaren Promotor hergestellt. Die Behandlung der LeSed5-GFP BY-2 Zelllinie mit BFA führte zur Bildung von großen Aggregaten, die sich hauptsächlich in der Nähe des Zellkerns formierten (Abb. 2.39). Vergleicht man dieses Ergebnis mit denen der Kontroll-Zelllinie (Gonst1-YFP; Abb. 2.40), so kann man daraus schließen, dass das LeSed5-GFP ebenfalls am Golgi-Apparat lokalisiert ist. Bereits in mehreren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die BFA-Behandlung in BY-2 Zellen zur Akkumulation von Golgi- und ER-Membranen führte (Nebenfuhr et al., 2002; Ritzenthaler et al., 2002; Langhans and Robinson, 2007).

Zusätzlich wurde für die notwendige Visualisierung des LeSed5-GFP durch Immunogoldmarkierung auf Ultra-Dünnschnitten ein Antikörper gegen das Syntaxin LeSed5 selbst hergestellt. Bedauerlicherweise waren sowohl ein kommerziell verfügbarer anti-GFP als auch der anti-LeSed5 zu unspezifisch in ihrer Markierung um eine eindeutige Aussage über die Lokalisierung von LeSed5 in der Zelle treffen zu können. Die Diskussion stützt sich daher auf die gewonnenen Daten aus CLSM-Studien. Allgemein bleibt ein gewisser Unsicherheitsfaktor bei der Fluoreszenzlokalisierung schon allein aus technischen Gründen (Auflösungsvermögen des Fluoreszenzmikroskops) bestehen.

3.3.4.3. Einfluss von LeSed5 auf den Transport vakuolärer Proteine

Sowohl die quantitativen Analysen als auch die mikroskopischen Untersuchungen des Transports vakuolärer Reporterproteine bei Koexpression mit LeSed5 ergaben interessante Ergebnisse. Die Überproduktion von LeSed5 beeinflusste weder das Sekretionsverhalten des löslichen Kargoproteins α -Amylase-spo (Abb. 2.36) noch den Transport des Tonoplasten-Syntaxins AtVam3 (Abb. 2.35). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Proteine unter anderem in COPII-unabhängiger Weise aus dem ER in die Vakuole bzw. zum Tonoplasten transportiert werden können. In Pflanzen gibt es mehrere Hinweise darauf, dass es höchstwahrscheinlich mehrere Transportwege vom ER zur Vakuole gibt. Bereits Gomez and Chrispeels (1993) berichteten, dass es in Tabak-Protoplasten neben dem BFA-sensitiven Transport löslicher vakuolärer Proteine noch einen zweiten, BFA-resistenten und COPII-unabhängigen Transport vakuolärer Membranproteine zu geben scheint. In Tabak-Protoplasten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass vakuoläre Membranproteine mittels zwei separater Transportwege zur Vakuole transportiert werden können (Jiang and Rogers, 1998). So genannte PAC-Vesikel („precursor-accumulating vesicles“), welche wahrscheinlich COPII-unabhängige ER-Export-Strukturen darstellen, wurden gleichfalls beschrieben (Hara-Nishimura et al., 1998). Mögliche Hüllproteine dieser Carrier wurden noch nicht identifiziert. Törmekangas et al. (2001) beobachteten, dass die vakuoläre Sortierungsdomäne PSI („plant-specific insert“) der Aspartat-Proteinase Phytepsin die Transportroute des Proteins beeinflussen kann. Wird diese Domäne deletiert, so wird das Deletionsprotein COPII-unabhängig zur Vakuole transportiert. Um den in dieser Arbeit beobachteten möglichen COPII-unabhängigen Transport von α -Amylase-spo und AtVam3 in Tabak-Protoplasten zu überprüfen, bedarf es weiterer Kontrollexperimente. Eine Überproduktion des am ER lokalisierten Sar1-GEFs AtSec12 führt zu einer vollständigen Blockade des COPII-abhängigen ER-Exports (Phillipson et al., 2001). Sollte es sich um wirklich COPII-unabhängigen ER-Export handeln, so sollte im Falle einer Koexpression von Sec12 mit α -Amylase-spo bzw. Vam3 kein Effekt auf deren ER-Export zu beobachten sein. Erst kürzlich wurde berichtet, dass der Transport von Anthocyaninen in Keimlingen von *A. thaliana* vom ER zur Protein-Speichervakuole in einer Golgi-unabhängigen Weise von statten geht (Poustka et al., 2007). Ob es sich um einen COPII- und zugleich Golgi-unabhängigen Transport von α -Amylase-spo und Vam3 handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter thematisiert.

3.4. SNARE-Interaktionen sind die essentiellen Komponenten im frühen sekretorischen Weg

SNARE-Interaktionen im frühen sekretorischen Weg sind aus Säugern und Hefen bereits länger bekannt. In Pflanzen beginnt man erst jetzt, mit bekannt werden der genomischen Daten und den fortschreitenden Visualisierungstechniken die einzelnen Komponenten und deren Interaktionen im frühen sekretorischen Weg zu verstehen. Obwohl zunächst nur das Syntaxin LeSed5 im Fokus der Untersuchungen stand, muss nach den vorliegenden Ergebnissen der Lokalisierung und Funktionalität sämtlicher im SNARE-Komplex vorkommender Komponenten, unbedingt die Komplexität der Verknüpfungen der einzelnen Komponenten untereinander mit in Betracht gezogen werden. Unter diesen Aspekten konnte folgende Hypothese aufgestellt werden:

Im Falle der Lokalisierungsstudien der SNARE-Proteine des frühen sekretorischen Wegs lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit nur teilweise mit den bisherigen Beobachtungen von Uemura et al. (2004) und Chatre et al. (2005) in Einklang bringen. Das v-SNARE LeBet1, das Qb-SNARE LeBos1 sowie das Syntaxin LeSed5 sind nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit am Golgi-Apparat lokalisiert, wohingegen das R-SNARE LeSec22 sowohl am Golgi-Apparat als auch in tubulären Strukturen des ERs zu beobachten ist. Diese Beobachtungen sind daher konform zu den Lokalisierungsstudien der Homologen SNARE-Proteine aus *A. thaliana*.

Allerdings unterscheiden sich die funktionellen Daten dieser Arbeit in vielen Aspekten von den Befunden aktueller Veröffentlichungen (Chatre et al., 2005). Die Koexpressionen von LeBet1 und LeSec22 jeweils zusammen mit dem Reporterprotein α -Amylase hatten keinen Einfluss auf die Sekretion von α -Amylase in Tabak-Protoplasten (Abb. 2.6 und 2.13). Im Falle von LeSec22 wurden zusätzlich Koexpressionsstudien mit α -Amylase-HDEL durchgeführt, da dieses SNARE-Protein höchstwahrscheinlich wie die Homologen aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* auch eine Rolle im retrograden Transport vom *cis*-Golgi zum ER spielt. Auch hier konnte keine Veränderung im Sekretionsverhalten von α -Amylase-HDEL festgestellt werden, was dafür spricht, dass weder der anterograde noch der retrograde Transport zwischen dem ER und Golgi-Apparat bei Überexpression des R-SNAREs LeSec22 beeinflusst wird (Abb. 2.13). Die Überproduktion des Qb-SNAREs LeBos1 hingegen induzierte eine dosisabhängige Inhibierung der Sekretion von α -Amylase *in vivo*. Auch als Folge der Überproduktion des Syntaxins LeSed5 sank die Sekretion der α -Amylase und der α -Amylase-HDEL mit steigenden Expressionsraten von LeSed5 drastisch ab (Abb. 2.18 und 2.25). In beiden Fällen konnte vermehrt α -Amylase-Aktivität in den Protoplasten gemessen werden, was auf eine Akkumulation von α -Amylase in diesen hindeutet. Dieser Effekt lässt sich durch eine Beeinträchtigung des sekretorischen Transportwegs erklären, wobei wahrscheinlich der „default pathway“ betroffen ist, da die α -Amylase kein Sortierungssignal trägt und normalerweise mit dem „bulk flow“ sekretiert wird (Pfeffer and Rothman, 1987). In *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Konzentrationsverhältnisse einzelner

Komponenten des tetramerischen SNARE-Komplexes, zu dem auch die LeSed5 und LeBos1 Homologen Sed5p und Bos1p gehören, entscheidend für die Fusion sind. Liegt ein SNARE des *cis*-SNARE-Komplexes im Überschuss vor, kann dies zur Bildung nicht funktioneller Komplexe führen (Varlamov et al., 2004). Die Entdeckung dieser inhibierenden SNARE (i-SNARE) Aktivität lässt vermuten, dass diese nicht funktionellen SNARE-Komplexe zur Regulation der vielen verschiedenen miteinander verknüpften Transportwege beitragen können.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung des Syntaxins LeSed5 *in vivo* zeigten außerdem, dass die Überproduktion von LeSed5 das Sekretionsverhalten des vakuolären Reporterproteins α -Amylase-spo sowie den Transport von AtVam3 in den Tonoplasten nicht beeinflusst (Kap. 2.6.2.6). Unter diesem Aspekt konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass diese Proteine wahrscheinlich COPII-unabhängig zur Vakuole transportiert werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt betrifft die Erhaltung der Funktion des SNARE-Proteins. Durch die Fusion des GFP-Proteins an das C-terminale luminaire Ende des SNARE-Proteins konnte eine inhibitorische Wirkung auf das Sekretionsverhalten von α -Amylase nicht mehr festgestellt werden (Abb. 2.29). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Fusion des GFPs an den C-Terminus den Verlust der fusiogenen Aktivität des SNARE-Fusionsproteins zur Folge hat. Jedoch hat dieser mögliche Funktionsverlust letztendlich keinen Einfluss auf die Lokalisierung des Proteins im Golgi-Apparat (Abb. 2.30 G-L). Im Falle der Lokalisierungsstudien von LeSed5 konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Die bei der Expression des inhibitorisch wirkenden XFP-LeSed5 gebildeten Aggregate zeigen eine BFA-Resistenz (Abb. 2.30 A-F). Welche Strukturen diese Aggregate darstellen konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Für die detailliertere intrazelluläre Lokalisierung von LeSed5 werden zurzeit hochdruckgefrorene Ultradünnschnitte von *Arabidopsis*-Wurzelspitzen hergestellt, die mit den Antikörpern, die spezifisch gegen das Syntaxin LeSed5 gerichtet sind, markiert werden sollen. Das Meer-schweinchenserum, das gegen GST-LeSed5 Δ C hergestellt wurde, muss dazu affinitätschromatographisch aufgereinigt werden, da es im unaufgereinigten Zustand unspezifisch ist. Die bisherigen Untersuchungen sind erst der Anfang zum Verständnis der komplexen Zusammenhänge der SNARE-Interaktionen im frühen sekretorischen Transportweg der Pflanze.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien, Materialien und Enzyme

Alle verwendeten Laborchemikalien mit dem Reinheitsgrad pro analysis (p.a.) wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Amersham Bioscience (Freiburg), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von den Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck. Substanzmischungen für die Herstellung von Kulturmedien wurden von den Firmen Duchefa (Harlem, Niederlande), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) geliefert. Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerasen, RNase, sowie Größenmarker von DNA und Proteinen wurden von den Firmen Amersham Bioscience (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Roche (Mannheim), Finnzymes (Espoo, Finnland), Serva und Stratagene (Heidelberg) verwendet. Nitrocellulosemembranen lieferte die Firma Pall (Dreieich), ECL-Filme wurden von Amersham Bioscience bezogen.

4.2. Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1. Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmiden wurden anfangs die *E. coli* Stämme DH5 α und NovaBlue verwendet, im weiteren Verlauf der Arbeit wurde allerdings fast ausschließlich mit dem *E. coli* Stamm MC1061 gearbeitet, da dieser eine höhere Wachstumsrate aufweist (Tabelle 4.1). Die Expression von Proteinen erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21 (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme zur Klonierung und Amplifikation von Plasmiden bzw. zur Expression von Proteinen inklusive zugehöriger Merkmale und Referenzen.

<i>E. coli</i> -Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
DH5 α	<i>F</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
MC1061	<i>F</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7696 Δ (<i>lac Y74</i>) <i>galU galK hsdR hsdM</i> ⁺ <i>strA</i>	(Casadaban and Cohen, 1980)
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF</i> ' [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^f <i>ZAM15::Tn10</i> (Tc ^R)]	Novagen, Darmstadt
BL21	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB</i> -, <i>mB</i> -), <i>gal</i> , <i>dcm</i>	Firma Amersham Bioscience

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von BY2 Zellen zur stabilen Genexpression (Kap. 4.12) und die Agrobakterien-vermittelte Infiltration von Tabakblättern zur transienten Genexpression (Kap. 4.11) wurden mit Hilfe der *A. tumefaciens*-Stämme LBA4404 (Hoekema, 1983) bzw C58C1 (Deblaere, 1985) durchgeführt.

4.2.2. Verwendete Plasmide

Zur Klonierung der durch PCR-Amplifikation gewonnenen Gene und zur transienten Expression in Tabak-Protoplasten wurde folgender modifizierter pUC18-Vektor (von Dr. J. Denecke, University of Leeds, zur Verfügung gestellt) verwendet:

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

Zur bakteriellen Expression von Proteinen wurde in dieser Arbeit folgender kommerziell erhältlicher Vektor verwendet:

- pGEX-4T3 (Amersham Biosciences):
pBR322ori, tac-Promotor, lacI^q, Glutathion-S-Transferase-ORF, amp^r

Zur Transformation von BY-2 Zellen (4.12) und transienten Genexpression in Epidermiszellen von Tabak (4.11) wurden folgende Vektoren verwendet:

- pTA7002 (Aoyama and Chua, 1997):
induzierbarer Promotor (Dexamethasone), kan^r für Selektion in *E. coli* und *Agrobacterium*,
hyg^r für Selektion in Pflanzen
- pDE1001 (Denecke et al., 1992):
35S-Promotor, nos-Terminator, amp^r für Selektion in *E. coli*, sp^r und sm^r für Selektion
in *Agrobacterium*, kan^r als Selektionsmarker in Pflanzen

4.2.3. Desoxyoligonukleotide

Alle verwendeten Desoxyoligonukleotide wurden von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen. Die Sequenzen der Desoxyoligonukleotide sind jeweils in 5'- 3'- Orientierung angegeben. Die in der ersten Spalte angegebenen Zahlen geben die Position des Desoxyoligonukleotids innerhalb der im Anhang angefügten entsprechenden Sequenz an. Die unterstrichenen Nukleotide zeigen die Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym.

LeSed5-spezifische Oligonukleotide:

HASed5FL <i>Cla</i> I for ()	CTCTAT <u>ATCGAT</u> G TATCCATATGATGTTCCCTGAT- TATGCTCCTGTGAAAGTAGCAAGTGC
HASed5FL <i>Bam</i> HI rev (1026-)	TGCTTCGGATCCCTATGCCACG
HASed5cyt <i>Bam</i> HI rev (972-)	TGCTTCGGATCCTACTTAATCATTAG
HASed5dNT <i>Sac</i> I for (139-152)	GCTGAGCTCGAGGAACAGAGGAC
HASed5dNT <i>Bam</i> HI rev (1026-1017)	TGCTTCGGATCCCTATGCCACG
HASed5dNTcyt <i>Bam</i> HI rev (972-956)	CGGGATCCTACTTAATCATTAGCCACC
Sed5FL <i>Xho</i> I for (1-17)	TACCGCTCGAGATGCCTGTGAAAGTAGC

Sed5FL <i>NcoI</i> rev (1023-1009)	CATGCCATGGCTCCACCTCCTGCCACGAAAAATAG
GexSed5SL <i>Bam</i> HI for (4-23)	TTCGTGGATCCCCTGTGAAAGTAGCAAGTGC
GexSed5SL <i>Xho</i> I rev (972-955)	GGACCATGCTCGAGACCTACTTAATCATTAGCCACCG
Sed5FL_FOR_ <i>Cl</i> aI (1-23)	CTCTATATCGATGCCTGTGAAAGTAGCAAGTGC

LeBet1-spezifische Oligonukleotide:

HABet1FL <i>Sac</i> I for (4-19)	GCTGAGCTCAGTTATCGGAGGGATC
HABet1FL <i>Bam</i> HI rev (438-424)	CGCGGATCCCTAATTTGGATGAAC
HABet1cyt <i>Bam</i> HI rev (339-325)	CGCGGATCCTAGAAAGTATCCAACAAG
Bet1FL_FOR_ <i>Cl</i> aI (1-23)	CTCTATATCGATGAGTTATCGGAGGGATCATCG

LeBos1-spezifische Oligonukleotide:

HABos1FL <i>Sac</i> I for (4-13)	TATACTGAGCTCGCAACGGCGG
HABos1FL <i>Bam</i> HI rev (738-725)	CGGGATCCTCATCTTGTCCACC
HABos1cyt <i>Bam</i> HI rev (687-672)	GCGGATCCTACCCTGCATACTTGATC
Bos1FL_FOR_ <i>Cl</i> aI (1-24)	TCTATATCGATGGCAACGGCGGTTGGGATCGGA

LeSec22-spezifische Oligonukleotide:

HA-Sec22FLfor <i>Sac</i> I (4-23)	GATTATGCTGAGCTCGTGAAGTTGACTTTGATTGC
HA-Sec22FLrev <i>Bam</i> HI (657-636)	CTGCTTCGGATCCTCACCAGATCTTTGTTCTGAGC
HA-Sec22cytrev <i>Bam</i> HI (573-553)	CTGCTTCGGATCCCTACTGACGATTTAAGTCTTTTGC
HA-Sec22ntfor <i>Sac</i> I (217-236)	GATTATGCTGAGCTCCTGACAATGTGTGATCGCTC
Sec22FL_FOR_ <i>Cl</i> aI (1-28)	CTCTATATCGATGGTGAAGTTGACTTTGATTGCTCGCG

Sonstige Oligonukleotide:

T-nos Re	CCCATCTCATAAATAACGTCATGC
P-35S For	ATGACGCACAATCCCCTACTATCC
HA oligo1	CGATGCTCGAGTATCCATATGATGTTCTGATTATGCTGAGCTCG
HA oligo 2a	GATCCGAGCTCAGCATAATCAGGAACATCATATGGATACTCGAGCAT
GFP linker1	GATCTCAGCAGGTGGAGCAT
GFP linker2	CGATGCTCCACCTGCTGA
pGEX for	ATA GCA TGG CCT TTG CAG G
pGex rev	GAG CTG CAT GTG TCA GAG G

4.3. Antikörper

4.3.1. Primäre Antikörper

Nachfolgend sind die benutzten Primärantikörper einschließlich der zu ihrer Herstellung verwendeter Antigene aufgeführt, sowie die im Western-Plot verwendeten Verdünnungen oder Konzentrationen und zugehörige Verweise.

- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das green fluorescent protein (GFP) aus *Aequorea victoria*; Verdünnung: 1:2000, Molecular Probes (Göttingen)
- monoklonaler Antikörper aus Maus gegen das Influenza Hemagglutinin Epitop (HA) bestehend aus neun Aminosäuren (YPYDVPDYA), Verdünnung: 1:1000, Covance (Berkley, CA)
- polyklonaler Antikörper aus Meerschweinchen gegen das SNARE Protein Sed5 aus *Lycopersicon esculentum* (Tomate); Verdünnung 1:2000, Eurogentec (Seraing, Belgien)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen α -Amylase, Verdünnung: 1:2000, von Birte Svensson von Carlsberg Laboratory (Copenhagen, Dänemark)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen AtSYP31, Verdünnung 1:2000, von Michael R. Blatt (University of Glasgow, Schottland)

4.3.2. Sekundäre Antikörper

- polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:20 000; Sigma (Deisenhofen)
- polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:20 000; Sigma (Deisenhofen)
- polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Meerschweinchen IgG, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt war; Verdünnung 1:20 000; Sigma (Deisenhofen)

4.4. Computeranalyse von DNA und Proteinsequenzen

Die DNA- und Proteinsequenzen der in dieser Arbeit untersuchten SNAREs aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) wurden mit Hilfe der jeweiligen Arabidopsissequenzen (ermittelt aus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf der Homepage des „sol genomics network“ (<http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>) unter Verwendung des Programms BLAST (Altschul et al., 1990), sowie der jeweiligen „Gene Accession Numbers“ unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ermittelt. Die entsprechenden EST Klone aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cLEN7D17 (LeSyp31, LeSed5), cLEC38A14 (LeBS14a, LeBet1), cTOF30O5 (LeMEMB11, LeBos1) und cTOF1I10 (LeSec22) wurden direkt von dem Clemson University Genomics Institute (Clemson, USA) angefordert.

Die DNA-Sequenzanalyse, sowie das Alignment der Proteinsequenzen wurde mit den Programmen „BioEdit“ (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Hall, 1999) und „ClustalW“, ein online Service des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Thompson et al., 1994), unter Verwendung der Ähnlichkeitsmatrix „Blossum62“ durchgeführt.

4.5. Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurden Tabakpflanzen verschiedener Cultivare und Zellkulturen aus Tabakwurzelzellen verwendet.

4.5.1. Kultivierung der Tabakpflanzen im Gewächshaus

Die Anzucht und Kultur der Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana (Maliga et al., 1973) erfolgte im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 24°C). 6-8 Wochen alte Pflanzen mit einer Höhe von maximal 60 cm dienten als Ausgangsmaterial für die Transformation von Tabakblättern durch Agrobakterien.

4.5.2. Kultivierung von sterilen Tabakpflanzen *in vitro*

Die Anzucht und Kultur der Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Ökotyps SR1) erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 24°C) und sterilen Bedingungen auf festem Nährmedium (4,30 g/l MS medium basal salt mixture [Duchefa Biochemie, Harlem, 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). Anzuchtgläser und Medien wurden autoklaviert. Nach Abkühlung der Medien auf ungefähr 60°C wurden jeweils 100 ml in ein Weckglas gefüllt. Vor der Aussaat wurden die Samen durch zweiminütige Inkubation in 12 %iger Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert, anschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen und zur Keimung auf das feste Nährmedium pipettiert. Nach einer Woche wurden die Pflanzen vereinzelt. Zur

in vitro-Vermehrung wurden etwa alle sechs bis acht Wochen Spross-Stecklinge geerntet und in neues Nährmedium gesetzt. Stecklinge wurden bis zur Blatternte 4-6 Wochen unter den oben genannten Bedingungen angezogen.

4.5.3. Zellkulturen

Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in der Impfbank (Heracus^R HERA guard HPH12, Hanau).

4.5.3.1. BY-2 Suspensionszellkultur

Die Kultivierung der Tabak Bright Yellow 2 (BY-2)-Suspensionszellkultur erfolgte im Dunkeln bei 25°C und 100 rpm in einem Orbitalschüttler (innovaTM 4340, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) unter Verwendung von MS-Medium (4,30 g/l MS medium basal salt mixture [Duchefa Biochemie, Harlem, Niederlande, M0221.0050]; 30 g/l Saccharose; 0,2 mg/l 2,4-D; 200 mg/l KH₂PO₄; 100 mg/l Myoinositol; 1 mg/l Thiamin; pH 5,8 mit KOH eingestellt). Die Kulturen wurden wöchentlich in einem Verdünnungsverhältnis von 1:50 in frischem Medium subkultiviert. Die Zellen wurden ca. vier Tage nach der Subkultivierung (log Wachstumsphase) für die transiente Expression und EM Fixierung verwendet.

4.6. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle in Laborhandbüchern wie (Sambrook et al., 1989) beschriebenen und allgemein üblichen molekularbiologischen Methoden sind nicht näher dargestellt.

4.6.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase- Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein zyklischer Prozess, der die selektive *in vitro* Amplifikation von DNA Sequenzen mit Hilfe zweier sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer ermöglicht (Saiki et al., 1988). PCR-Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 10 pmol spezifischen Oligonukleotiden, 100 ng cDNA oder 1 – 10 ng Plasmid-DNA als Templat, 0,2 mM je Nucleotid, 1 U Pfu- , 1 U DeepVent- oder 1 U Phusion-DNA-Polymerase und entsprechendem 1*PCR-Puffer hergestellt. Die anschließende Reaktion wurde in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Firma Biozym (Hess, Oldendorf) durchgeführt. Üblicherweise wurde der Ansatz zur Denaturierung des Templats für 3 min bei 95°C aufgeheizt und anschließend das Enzym zum Starten der Reaktion dazugegeben. Der folgende Reaktionszyklus wurde 25 – 35 Mal wiederholt und abschließend zur zusätzlichen Kettenverlängerung 5 – 10 min bei 72°C inkubiert:

Denaturierung des Templats: 30 s bei 95°C

Anlagerung der Oligonukleotide: 60 s bei 55 – 60°C

Kettenverlängerung: 30 – 60 s bei 72°C

Nach Beendigung der PCR Reaktion wurde der Cycler auf 4°C abgekühlt und bis zur Entnahme der Proben bei dieser Temperatur gehalten.

4.6.2. Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die analytische bzw. präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten fand die Agarose-Gelelektrophorese mit 0,8 % Agarose in TAE bei 100 V Anwendung. Im Agarosegel enthaltenes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) als DNA Interkalator färbte die DNA. Über das Geldokumentationssystem Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 erfolgte die Erfassung der DNA Fragmentgrößen. Die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach dem Protokoll des NucleoSpin Extract Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt.

4.6.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktions-Endonukleasespaltungen von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA wurden grundsätzlich in einem Gesamtvolumen von 10 – 20 µl durchgeführt. Die Enzyme samt zugehörigen Puffern und der empfohlenen Temperatur wurden entsprechend der Angaben der Hersteller verwendet. Zur Verhinderung einer Rückligation linearisierter Plasmide wurden die 5' Phosphatreste durch eine Behandlung mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP) für 1 h bei 37°C entfernt. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden entweder direkt mit einem NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren) oder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion mit dem oben genannten Kit gereinigt.

4.6.4. Ligation

Die Ligation von gespaltenen DNA-Fragmenten (s. 4.6.3) in ihre Zielvektoren wurde in 10 - 20 µl Gesamtvolumen nach der beschriebenen Methode (Sambrook et al., 1989) mit T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer angesetzt. Ligationsansätze wurden entweder 1 – 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend transformiert.

4.6.5. Transformation von Bakterien

4.6.5.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden nach Hanahan (1983) mit der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Zur Anzucht von *E. coli* wurden 200 ml, auf 37°C vorgewärmtes, 2x YT Medium (1,6 % (w/v) Trypton, 1,0 % (w/v) Hefe Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl in ddH₂O, mit 1 M NaOH

auf pH 7,0 eingestellt) mit 3 ml einer Übernachtskultur (mit einer OD_{600} von etwa 0,3) angeimpft und bei 37°C und 250 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Sämtliche Lösungen wurden auf Eis gekühlt, ebenso wurden alle weiteren Arbeiten auf Eis und bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurden die Bakterien 10 min auf Eis gekühlt, 20 min mit 2.000 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) bei 4°C sedimentiert, vorsichtig in 80 ml eiskaltem TFB I (30 mM $KC_2H_3O_2$, 100 mM RbCl, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 15 % Glycerin (v/v) in ddH₂O, mit 0,2 M CH_3COOH auf pH 5,8 eingestellt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen vorsichtig in 8 ml TFB II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 % Glycerin (v/v), in ddH₂O, mit 5 M KOH auf pH 6,6 eingestellt, sterilfiltriert, bei 4°C gelagert) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.6.5.2. Transformation von *E. coli*

Die Transformationen von *E. coli* mit Plasmid-DNA oder 5 – 10 µl Ligationsansätzen wurden nach der Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1983) durchgeführt. Kompetente Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, danach mit dem Transformationsansatz versetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte bei 37°C für 3 min bei MC1061- und BL21-Zellen, oder bei 42°C für 45 s bei DH5a- und NovaBlue-Zellen. Nach dem Hitzeschock wurde 1 ml LB Medium zugegeben und 15 min – 1h bei 37°C zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar-Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.5.3. Transformation von Agrobakterien

Kompetente Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*) wurden 15 min auf Eis aufgetaut, anschließend mit Plasmid-DNA versetzt und für 30 min bei -80°C gefroren. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 37°C. Nach 4 min wurde 1 ml LB Medium hinzugefügt, der gesamte Ansatz in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 28°C und 250 rpm 4 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz auf LB-Agar-Selektionsmedium (100 µg/ml Rifampicin und entsprechende Antibiotika zur Selektion) verteilt und bei 28°C für mindestens 48 h inkubiert.

Die Anzucht von Agrobakterien in Flüssigkultur wurde in MGL-Medium (1:1 Gemisch aus LB-Medium und MG-Medium [4 µg/l Biotin; 0,4 g/l $MgSO_4$; 0,4 g/l NaCl; 1 g/l KH_2PO_4 ; 4,6 g/l Natriumglutamat; 20 g/l Mannitol; pH 7,0]) durchgeführt.

4.6.5.4. Anlegen von Langzeitkulturen

Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl Glycerinlösung (65 % (v/v) Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) gemischt und bei -80°C gelagert.

4.6.6. Isolierung von Plasmid-DNA

4.6.6.1. Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA für weitere Klonierungs- oder Sequenzierungsarbeiten erfolgte mittels alkalischer Lyse (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur bei g_{\max} (Eppendorf Centrifuge 5417R) für 1 min sedimentiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS oder STE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA) resuspendiert und abermals für 1 min bei g_{\max} zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Sol I (25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA) aufgenommen und mit 200 µl Sol II (0,2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS) versetzt. Nach 5 min wurde das Lysat mit 150 µl SOLIII (5 M K-Acetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure) neutralisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei g_{\max} wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2/3 Volumen Isopropanol gefällt und bei g_{\max} für 20 min sedimentiert. 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 TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM EDTA) gelöst, mit 0,5 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

4.6.6.2. Midipräparation von Plasmid-DNA

Um mittlere Mengen an Plasmid-DNA zu quantitativen Plasmid-Präparationen herzustellen wurde das *NucleoBond-Kit PC100* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Das Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers.

4.6.6.3. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im großen Maßstab erfolgte ausgehend von einer 500 ml Schüttelkultur, inkubiert für 24 h bei 37°C und 250 rpm. Die Zellen wurden mit 4000 rpm für 1 h bei 4°C (Sorvall RC5Cplus, Rotor: SLA3000) sedimentiert, in 8 ml eiskaltem TE 50/1 Puffer (50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und in ein vorgekühltes SS34 Zentrifugationsgefäß überführt. Die nachfolgende Lyse erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml Lysozym Lösung [10 mg/ml in ddH₂O], behutsamem zehnmaligen Schwenken und 5 minütiger Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden 2 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) zugegeben,

abermals geschwenkt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. 1 mg RNase und 150 µl 10 % Triton X-100-Lösung wurden in 1 ml TE zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einstündiger 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 in Corex Zentrifugationsröhrchen überführt, mit TE auf 12 - 15 ml aufgefüllt und mit 5 M NaClO₄ (10 % des Volumens) und Isopropanol (80 % des Volumens) versetzt und gut gemischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 10000 rpm in einem HB6-Swing Out-Rotor wurde der Überstand verworfen, das DNA-Präzipitat getrocknet, dieses in 500 µl TE resuspendiert und bei 4°C gelagert.

4.6.7. DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen (Sanger et al., 1977) wurden von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit den Programmen BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1990) und Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Hall, 1999) ausgewertet.

4.6.8. Plasmidkonstruktionen

Zur Herstellung der Plasmide zur Transformation von Protoplasten, BY-2 Suspensionskulturzellen und Epidermiszellen oder zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde wie folgt vorgegangen: Die jeweiligen Gene wurden durch PCR amplifiziert (Kap. 4.6.1) und nach Restriktionsendonukleasespaltung (Kap. 4.6.3) in die entsprechenden Zielvektoren kloniert. Als Templat für die Amplifizierung der jeweiligen SNARE-Genfragmente wurden die in Tabelle 4.2 aufgeführten EST Klone, erhalten von Clemson University Genomics Institute (Clemson, SC, USA), verwendet.

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung (Kap. 4.6.9) mit den Primern ‚P-35S For‘ und ‚T-nos R‘ verifiziert. Die Sequenzen aller in diesem Kapitel angegebenen Primer bzw. Oligonucleotide sind in Kapitel 4.2.3 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Übersicht der als Templat verwendeten EST-Klone

SNARE-Gen	Gen Acc. Nummer	EST Klonnummer
LeSed5	AW222275	cLEN7D17
LeBos1	BG130394	cTOF30O5
LeBet1	AW033981	cLEC38A14
LeSec22	BG123258	cTOF1I10

4.6.8.1. N-terminale HA-Fusionskonstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten SNARE Gene aus *Lycopersicon esculentum* (Tomate, Le) und deren Deletionsmutanten wurden als N-terminale HA-Fusionskonstrukte in die Expressionsvektoren pLL4 (Brandizzi et al., 2003) oder pJB00 (Abb. 4.1 A) zwischen den Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S-Promotor und den NOS-Terminator kloniert.

- 35S::HA::3'nos (pJB00):

Basierend auf pLL4 (Brandizzi et al., 2003), ein auf pUC basierender pDE4-Vektor, wurde das HA-Epitop mit multiplen Klonierungsstellen (*Clal-XhoI-HAtag-SacI-BamHI*) zwischen den 35S-Promotor und den NOS-Terminator inseriert. Das HA-Epitop (Influenza Hemagglutinin Epitop) ist ein aus 9 Aminosäuren bestehendes Peptid (YPYDVPDYA) (Abb. 4.1 A). Dieses *Clal-BamHI* Fragment wurde mittels PCR Assemblierung unter Verwendung von HA oligo1 und HA oligo2a (Kap. 4.3.2.) hergestellt und in den mit *Clal-BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pLL4 ligiert, sodass das Plasmid pJB00 (Abb. 4.1 B) erzeugt wurde. Dieses Plasmid diente als Ausgangsvektor um Fusionskonstrukte mit dem HA-Epitop am N-Terminus herzustellen.

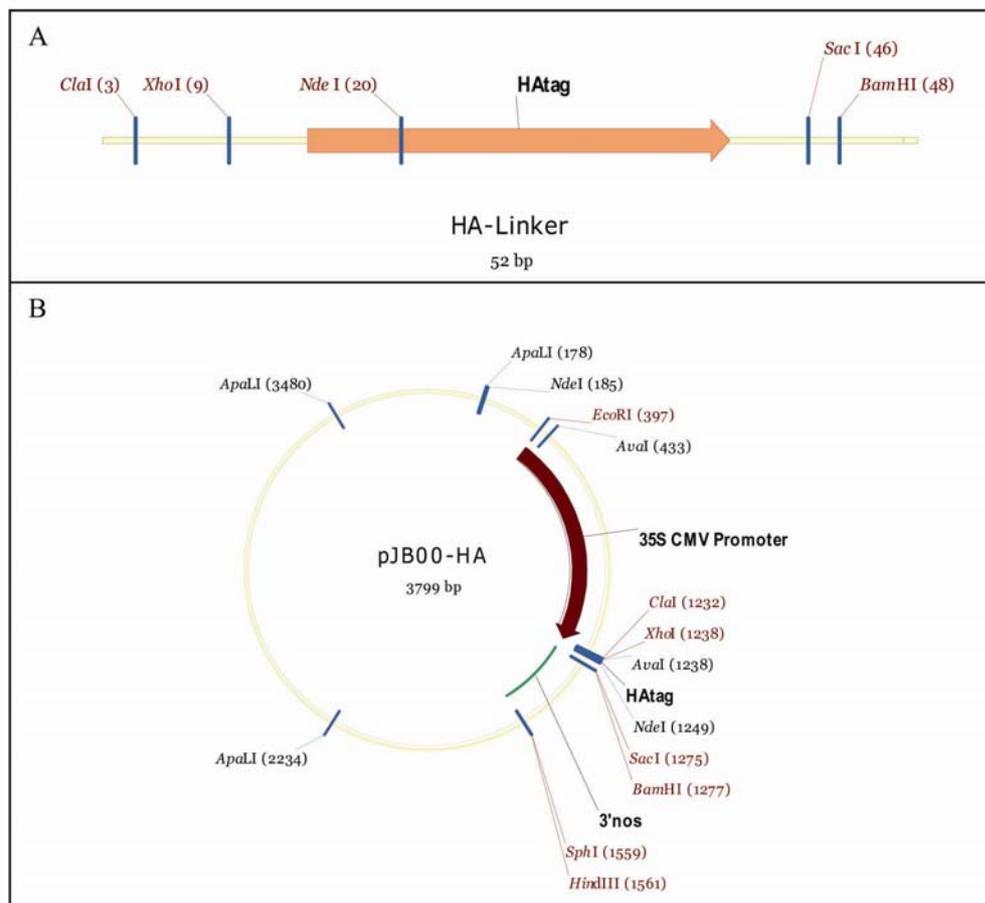


Abb. 4.1: **A** Schematische Darstellung des HA-Linkers. Das HA-Epitop wurde mit den Restriktionschnittstellen *Clal/XhoI* und *SacI/BamHI* flankiert. **B** Plasmidkarte von pJB00. Das auf pLL4 basierende Plasmid ist mit der inserierten Sequenz des HA-Epitops 3799 bp groß. Der 35S CaMV Promotor, ein

EcoRI-ClaI Fragment, ist dunkel hervorgehoben und umfasst etwa 840bp. Die 285 bp lange Sequenz des 3`nos Terminators ist unterstrichen dargestellt. Das HA-Fragment ist in (A) schematisch dargestellt.

- 35S::HA-LeSed5::3`nos (pJB01):

LeSed5 wurde aus einem EST Klon (cLEN7D17) unter Verwendung von Primer ‘HASed5FL *ClaI* for’ und ‘HASed5FL *BamHI* rev’ (Kap. 4.2.3) amplifiziert, mit *ClaI* und *BamHI* gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor pLL4 (Brandizzi et al., 2003) ligiert, sodass das Plasmid pJB01 (Abb. 4.2) erzeugt wurde.

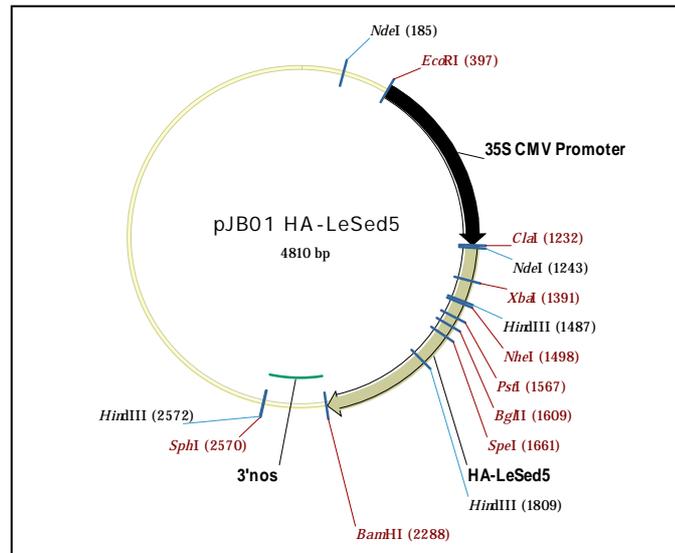


Abb. 4.2: Plasmidkarte von pJB01. Das auf pLL4 basierende Plasmid erreicht mit der inserierten HA-LeSed5 Sequenz eine Größe von 4810 bp. Der 35S CaMV Promotor, ein *EcoRI-ClaI* Fragment, ist schwarz hervorgehoben und umfasst etwas 840bp. Die 285 bp lange Sequenz des 3`nos terminators ist unterstrichen dargestellt. Das HA-LeSed5 Fragment ist hellgrau markiert, wird durch *ClaI* und *BamHI* begrenzt und umfasst 1049 bp.

- 35S::HA-LeSed5 Δ TMD::3`nos (pJB02):

Ein LeSed5 Fragment ohne die Transmembrandomäne (LeSed5 Δ TMD) wurde aus dem EST Klon (cLEN7D17) unter Verwendung von ‘HASed5FL *ClaI* for’ und ‘HASed5cyt *BamHI* rev’ Primern (Kap. 4.2.3) amplifiziert, mit *ClaI* und *BamHI* gespalten und in den mit *ClaI/BamHI* gespaltenen Zielvektor pLL4 ligiert.

- 35S::HA-LeSed5 Δ NT::3`nos (pJB03):

LeSed5 ohne das N-terminale Peptid wurde aus dem EST Klon (cLEN7D17) unter Verwendung von ‘HASed5dNT *SacI* for’ und ‘HASed5dNT *BamHI* rev’ Primern amplifiziert und nach *SacI/BamHI*-Spaltung in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Zielvektor pJB00 ligiert.

Die Vorgehensweise der folgenden Konstruktionen entsprach der der oben beschriebenen (siehe pJB03), aus dem entsprechend angegebenen EST Klon (Tab. 4.2), dem oben beschriebenen Zielvektor pJB00 (*SacI/BamHI*-Spaltung) und dem entsprechend dazu aufgeführten Primerpaar:

- 35S::HA-LeSed5 Δ NT/ Δ TMD::3'nos (pJB04):
EST Klon: cLEN7D17
Primer: ‚HASed5dNT *SacI* for‘ und ‚HASed5dNTcyt *BamHI* rev‘
- 35S::HA-LeBet1::3'nos (pJB05):
EST Klon: cLEC38A14
Primer: ‚HABet1FL *SacI* for‘ und ‚HABet1FL *BamHI* rev‘
- 35S::HA-LeBet1 Δ TMD::3'nos (pJB06):
EST Klon: cLEC38A14
Primer: ‚HABet1FL *SacI*‘ und ‚HABet1cyt *BamHI* rev‘
- 35S::HA-LeSec22::3'nos (pJB07):
EST Klon: cTOF1I10
Primer: ‚HA-Sec22FLfor *SacI*‘ und ‚HA-Sec22FLrev *BamHI*‘
- 35S::HA-LeSec22 Δ TMD::3'nos (pJB08):
EST-Klon: cTOF1I10
Primer: ‚HA-Sec22Flfor *SacI*‘ und ‚HA-Sec22cytrev *BamHI*‘
- 35S::HA-LeSec22 Δ NT::3'nos (pJB09):
EST Klon: cTOF1I10
Primer: ‚HA-Sec22ntfor *SacI*‘ und ‚HA-Sec22FLrev *BamHI*‘
- 35S::HA-LeBos1::3'nos (pJB10):
EST Klon: cTOF3005
Primer: ‚HABos1FL *SacI* for‘ und ‚HABos1FL *BamHI* rev‘
- 35S::HA-LeBos1 Δ TMD::3'nos (pJB11):
EST Klon: cTOF3005
Primer: ‚HABos1FL *SacI* for‘ und ‚HABos1cyt *BamHI* rev‘

4.6.8.2. Expressionsplasmide der SNAREs

Die ORFs der SNARE Gene wurden mittels PCR aus den jeweiligen, in Tabelle 4.2 aufgelisteten, EST Klonen amplifiziert und als *ClaI-BamHI* Fragmente zwischen den 35S Promotor und den NOS-Terminator in den ebenfalls *ClaI-BamHI* gespaltenen Vektor pLL4 (Brandizzi et al., 2003) kloniert. Die dazu verwendeten Primerpaare sind auf der nächsten Seite aufgeführt:

- 35S::LeSed5::3'nos (pJB26):
Primer: 'Sed5FL_FOR_ClaI' und 'HASed5dNT BamHI rev'
- 35S::LeBos1::3'nos (pJB23):
Primer: 'Bos1FL_FOR_ClaI' und 'HABos1FL BamHI rev'
- 35S::LeBet1::3'nos (pJB24):
Primer: 'Bet1FL_FOR_ClaI' und 'HABet1FL BamHI rev'
- 35S::LeSec22::3'nos (pJB25):
Primer: ',Sec22FL_FOR_ClaI' und ',HA-Sec22FLrev BamHI'

4.6.8.3. XFP-Fusionskonstrukte

- 35S::GFP-HA-LeSed5::3'nos (pJB12):
Um ein N-terminal GFP getaggtetes LeSed5 Konstrukt (GFP-LeSed5) herzustellen, wurde ein *EcoRI-BglIII* Fragment, welches den 35S-Promotor und den ORF des GFPs trägt, aus dem GFP-Syp21 Expressionsplasmid pOF22 (Foresti et al., 2006) erhalten und zusammen mit einem *BglIII-ClaI* Linker in den mit *EcoRI-ClaI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pJB01 (HA-LeSed5) ligiert. Der Linker wurde durch die Anlagerung der Sense- (GFP linker1) und Antisense-Primer (GFP linker2) hergestellt, sodass ein symmetrisches Linker Peptid (SerAlaGlyGlyAlaSer) entstand, das optimal zwischen GFP und LeSed5 fusioniert wurde um die Funktion beider Proteine nicht zu beeinflussen.
- 35S::LeSed5-GFP::pA35S (pJB13):
LeSed5 wurde aus dem EST Klon (cLEN7D17) unter Verwendung von Primer 'Sed5FL *XhoI* for' und 'Sed5FL *NcoI* rev' (Kap. 4.2.3) amplifiziert, mit *XhoI* und *NcoI* gespalten und in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCK(X/S)LTEV-EGFP (Ritzenthaler et al., 2002) ligiert.
- 35S::YFP-HA-LeSed5::3'nos (pJB21):
Der ORF von HA-LeSed5 wurde aus dem entsprechenden Vektor (pJB01) mit *ClaI-BamHI* erhalten und anschließend in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pOF21 (Foresti et al., 2006) ligiert.
- 35S::YFP-HA-LeSed5 Δ NT::3'nos (pJB29):
Der ORF von HA-LeSed5 Δ NT wurde aus dem entsprechenden Vektor (pJB03) mit *ClaI-BamHI* erhalten und anschließend in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pJB21 ligiert.

- 35S::YFP-HA-LeSed5 Δ TMD::3'nos (pJB28):
Der ORF von HA-LeSed5 Δ TMD wurde aus dem entsprechenden Vektor (pJB02) mit *ClaI-BamHI* erhalten und anschließend in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pJB21 ligiert.
- 35S::YFP-HA-LeBos1::3'nos (pJB31):
Der ORF von HA-LeBos1 wurde aus dem entsprechenden Vektor (pJB10) mit *ClaI-BamHI* erhalten und anschließend in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pJB21 ligiert.
- 35S::YFP-HA-LeSec22::3'nos (pJB32):
Der ORF von HA-LeSec22 wurde aus dem entsprechenden Vektor (pJB07) mit *ClaI-BamHI* erhalten und anschließend in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pJB21 ligiert.
- 35S::YFP-HA-LeBet1::3'nos (pJB33):
Der ORF von HA-LeBet1 wurde aus dem entsprechenden Vektor (pJB05) mit *ClaI-BamHI* erhalten und anschließend in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pJB21 ligiert.
- pTA7002::LeSed5-EGFP:
Zur Herstellung einer stabil transformierten BY-2 Zelllinie für die Expression von LeSed5-GFP unter einem induzierbaren Promotor wurde folgendermaßen verfahren. Der ORF von LeSed5-EGFP wurde aus pJB13 mit *XhoI-XbaI* erhalten und in den *XhoI-SpeI* gespaltenen und dephosphorylierten binären Vektor pTA7002 (Kap. 4.2.2) subkloniert.
- pDE1001::YFP-HA-Sed5:
Zur Agrobakterien-vermittelten transienten Expression von YFP-LeSed5 in Tabakblättern, wurde das 35S::YFP-HA-LeSed5::3'nos Fragment aus pJB21 mit *EcoRI-HindIII* erhalten und in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten binären Pflanzenvektor pDE1001 (Kap. 4.2.2) subkloniert.

4.6.8.4. GST-Fusionskonstrukte

- pGex-GST::LeSed5 Δ TMD:
LeSed5 ohne die Transmembrandomäne wurde aus dem EST Klon cLEN7D17 unter Verwendung von ‚pGEX for‘ und ‚pGEX rev‘ Primern (Kap. 4.3.2) amplifiziert, mit *BamHI* und *XhoI* gespalten und in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten pGex-4T3 (Kap. 4.2.2) kloniert.

4.7. Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* zur Antikörperherstellung

Der in Kapitel 4.6.10.4 beschriebene Expressionsvektor (pGex-GST::LeSed5ΔTMD) wurde durch Hitzeschock in BL21 transformiert (s. 4.6.5.2). Die Bakterienkulturen wurden in LB-Medium mit zugesetztem Ampicillin (50 µg/ml) bzw. 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 0,6 bis max. 0,8 kultiviert. Die Induktion der Expression der Kulturen erfolgte durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 bis 2 mM. Nach einer drei- bis vierstündigen Inkubation bei 25 - 30°C wurden die Bakterien abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, ihr Sediment in 500 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 95°C für fünf Minuten gekocht. Die Proteine in Proben wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 4.8.3) aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt (Kap. 4.8.4). Von Kulturen, die das gewünschte Protein gut exprimierten, wurden stabile Langzeitkulturen angelegt und die Proteine daraufhin in einem großen Maßstab exprimiert. Dazu wurden 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, in Falconröhrchen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

4.7.1. Aufreinigung der Fusionsproteine

4.7.1.1. Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose 4B

Jedes der unter 4.7 hergestellten 500 ml-Sedimente wurde in 10 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, mit mehreren Ultraschallpulsen (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 5*30 s, 200 W) lysiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 100.000 g (Sorvall Discovery 90SE, Rotor Ti-60) abgetrennt. Der cytosolische Überstand wurde mit 500 µl Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, Freiburg) versetzt und 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz in eine Leersäule gegeben und zehnmal mit jeweils 1 ml PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden fünf Mal mit je 500 µl Elutionspuffer (10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl; pH 8,0) eluiert. Pro Fraktion wurden 20 µl-Proben einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 4.8.3) mit anschließender Coomassiefärbung (Kap. 4.8.4) analysiert.

4.7.1.2. Aufreinigung aus Einschlusskörpern (Inclusionbodies)

Die Aufreinigung des Fusionsproteins aus Einschlusskörpern erfolgte nach (Frangioni and Neel, 1993). Das wie in Kapitel 4.7 beschrieben hergestellte 500 ml-Sediment wurde in 20 ml Endvolumen in eiskaltem Puffer (PBS-T-EDTA: 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4; 0,1% Tween 20; 1 mM EDTA) resuspendiert, mit 500 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 1M DTT und 4,5 ml Laurylsarcosin (10% w/v in PBS-T-EDTA) wurde der Ansatz kräftig durchgemischt und mit mehreren Ultraschallpulsen (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 6*10 s, 200 W) lysiert. Durch anschließende Zugabe von TritonX-100 (2%), wurden letztlich alle Membranen solubiliert. Das erhaltene Homogenat wurde mit 500 µl zuvor mit PBS-T-EDTA äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, Freiburg) versetzt und 2 Stunden bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 1500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus) sedimentiert und die gebundenen Proteine achtmal mit jeweils 30 ml eiskaltem PBS-EDTA (PBS, 1 mM EDTA) gewaschen. Der gesamte Ansatz von Glutathion-Sepharose 4B mit gebundenem GST-Fusionsprotein wurde mit 500 µl SDS-Probenpuffer (Kap. 4.11.5) versetzt, bei 95°C für fünf bis zehn Minuten gekocht, elektrophoretisch in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 4.8.3) aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt (Kap. 4.8.4).

4.7.1.3. Dialyse von Proteinlösungen

Zur Eliminierung von anhaftenden Proteasen wurden die Dialysemembranen (Typ 20, Biomol, Hamburg) zunächst 30 min in einer 100 mM EDTA-Lösung und anschließend 30 min in ddH₂O gekocht. Nachdem die Dialysemembranen noch fünfmal mit ddH₂O für je 10 min gespült worden waren, können sie bei 4°C in 30% (v/v) EtOH p.a. für längere Zeit aufbewahrt werden. Vor der eigentlichen Verwendung wurden die Dialyseschläuche nochmals mit ddH₂O gespült. Die vorbereiteten Dialyseschläuche wurden dann mit der Proteinlösung befüllt, mit einer Klammer verschlossen und in kalten Dialysepuffer (10 mM Tris-HCL, pH 7,5) gehängt. Die Dialyse erfolgte unter langsamem Rühren bei 4°C.

4.7.1.4. Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Proteinbanden nach ihrer Färbung (Kap. 4.8.4) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in den Gelhalter des nach Biotrap (Schleicher & Schüll, Dassel) nachgebauten Elektroelutionssystems eingelegt. Der Gelhalter (siehe Abb. 4.3) wurde vorher beidseitig mit jeweils einem Gerüchthaltefilter und einseitig mit einem Proteinsperrfilter versehen. Der Halter wurde so in eine mit einfachem Elektrodenpuffer [5-fach Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl; pH 8,3 (30,3 g/l); 380 mM Glycin (142,76 g/l); 0,1 % (w/v) SDS (5 g/l)] befüllte Elektrolysekammer eingelegt, dass der Proteinsperrfilter

am Ende des Halters in Richtung Anode zeigte. Die Proteine wurden mit 50 mA für 24 Stunden bei 4°C eluiert und anschließend aus der Kammer zwischen Gelrückhaltefilter und Proteinsperfilter des Gelhalters entnommen.

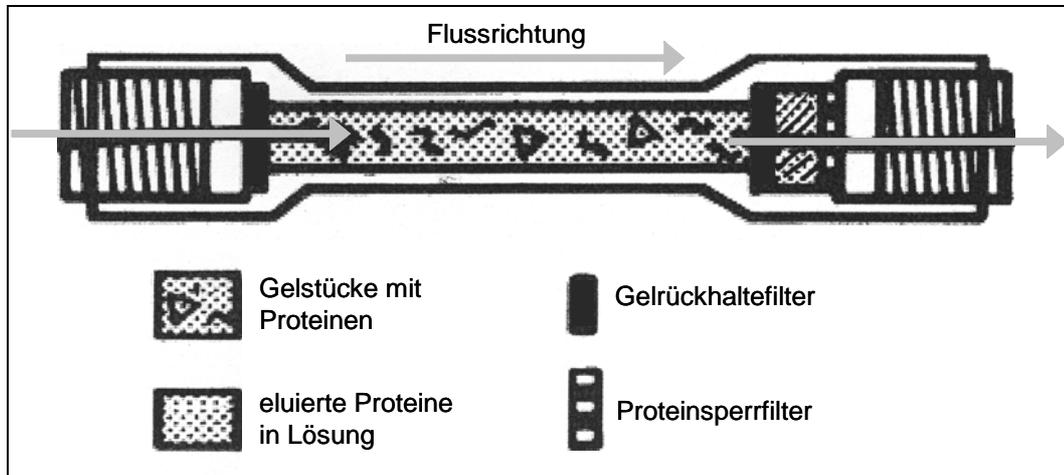


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Gelhalters

4.7.2. Herstellung von Antikörpern gegen LeSed5-SNARE

Als Antigen für einen gegen LeSed5 gerichteten Antikörper wurde das rekombinante GST-LeSed5 Protein verwendet. Nach der Färbung des aufgereinigten GST-Fusionsproteins (Kap. 4.7.1.1 oder 4.7.1.2) in einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 4.8.3) wurde dieses durch Elektrophorese isoliert (Kap. 4.7.1.4) und dreimal 2 h gegen 1 l Dialysepuffer dialysiert (Kap. 4.7.1.3). Im Anschluss daran wurden die Proteine lyophilisiert und zur Herstellung von Antikörpern als Antigen eingesetzt.

Zur Herstellung von Antikörpern gegen die isolierten Fusionsproteine wurden Meerschweinchen dreimal im Abstand von 14 Tagen und nochmals nach weiteren 28 Tagen mit je 10 bis 25 µg des Fusionsproteins immunisiert. Zur Beurteilung des Verlaufs der Immunantwort wurde den Meerschweinchen unmittelbar vor der ersten Immunisierung und 38 Tage (kleine Blutung) bzw. 66 Tage (große Blutung) nach der ersten Immunisierung Blut entnommen, bevor nach 80 Tagen die finale Blutung erfolgte. Die Immunisierung und die Gewinnung des Serums wurden bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben. Das erhaltene Serum wurde direkt verwendet und bei -20°C gelagert. Die Antikörper wurden in den in Kapitel 4.3.1 angegebenen Verdünnungen verwendet.

4.8. Allgemeine proteinbiochemische Methoden

4.8.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zu 20 µl einer Proteinprobe wurden 1 ml Bradfordreagenz (0,007 % (w/v) Serva Blue G250; 2 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure in ddH₂O) 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).

4.8.2. Fällung von Proteinen

4.8.2.1. TCA-Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) ermöglicht eine hohe Ausbeute von Proteinen. Jedoch sind die Proteine im schwer löslichen Präzipitat nicht mehr für funktionelle Studien verwendbar. 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.

4.8.2.2. Chloroform/Methanol-Fällung von Proteinen

Mit dieser Methode lassen sich vor allem Salze und Detergenzien sehr gut entfernen. Zu einem Volumen 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 and Flugge, 1984).

4.8.2.3. Ammoniumsulfat-Fällung von Proteinen

Diese Methodik zur Fällung von Proteinen erlaubt eine schonende Behandlung der Proteine, sodass diese anschließend in der Arbeit für funktionelle Studien eingesetzt werden konnten. Zu 600 µl einer Proteinlösung wurden 20 µl 10 mg/ml BSA zugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden 900 µl 100% Ammoniumsulfatlösung zugesetzt und ein bis zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde dann bei 20000 g bei 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg) für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten wurde das Präzipitat in 60 µl Phaseolin-Extraktionspuffer (100 mM

Tris, pH 7,8; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2% β -Mercaptoethanol und 0,2% TritonX-100) resuspendiert und 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt.

4.8.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli, 1970). Die Auftrennung erfolgte in einem 10-12%igen Trenngel (siehe Tabelle 4.3) dem eine Fokussierung der Proben in einem 5% igen Sammelgel (siehe Tabelle 4.4) vorangestellt war. Die zur SDS-PAGE bestimmten Proteinproben wurden stets 1:1 in SDS-Probenpuffer [900 μ l Probenpuffer (0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 5 mM EDTA; 1 M Sucrose; 200 mM Tris-HCl, pH 8,8); 300 μ l 10% SDS; 18 μ l 1 M DTT] aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Elektrophorese wurde in selbst konstruierten Gelapparaturen bei 100 V – 180 V in einfachem Laufpuffer [5-fach Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl; pH 8,3 (30,3 g/l); 380 mM Glycin (142,76 g/l); 0,1 % (w/v) SDS (5 g/l)] durchgeführt.

Die Angaben in Tabelle 4.3 und 4.4 gelten für ein Gel der Größe 200*100*2 mm.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel (%)	10	12
H ₂ O	11,5 ml	10 ml
3 M Tris, pH 8,8	3,2 ml	3,2 ml
Protogel	7,5 ml	9 ml
10% SDS	225 μ l	225 μ l
TEMED	12,5 μ l	12,5 μ l
10% APS	75 μ l	75 μ l
Endvolumen	22,5 ml	22,5 ml

Tabelle 4.4: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel	
20% Saccharose	11,3 ml
1 M Tris, pH 6,8	1 ml
Protogel	2,5 ml
10% SDS	150 μ l
TEMED	30 μ l
10% APS	50 μ l
Endvolumen	15 ml

4.8.4. Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine 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) unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend in Fixierlösung (50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) zwei bis vier Stunden bis zu einem klaren Hintergrund entfärbt.

4.8.5. Western-Blot-Analyse (Immunoblot)

4.8.5.1. Elektrophoretischer Proteintransfer

Der Elektrotransfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine im Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran (Pall, Dreieich) erfolgte im Naßblotverfahren in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) mit einem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol). Der Transfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 450 mA in einer Stunde oder bei 150 mA über Nacht durchgeführt.

4.8.5.2. Proteinfärbung auf Blots

Die Membranen wurden nach dem Proteintransfer mit Ponceau S (0,2 % (w/w) Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure) (Salinovich and Montelaro, 1986) einige Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend in PBS-T (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 0,1% Tween 20) wieder vollständig entfärbt.

4.8.5.3. Immunnachweis

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen 1 Stunde in Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver und 1 % (w/v) BSA in PBS) inkubiert. Anschließend wurde dreimal jeweils fünf bis zehn Minuten in PBS-T und einmal fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Membranen mit Primärantikörper in den angegebenen Verdünnungen eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum inkubiert und wieder dreimal jeweils zehn Minuten in PBS-T gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Blocklösung für eine Stunde in den angegebenen Verdünnungen (1:20.000) bei Raumtemperatur und das erneute Waschen mit dreimal PBS-T und einmal PBS für jeweils zehn Minuten.

Zur Entwicklung der Western-Blots wurde das ECL-Detektionsreagenz wie folgt verwendet: 25 µl 250 mM Luminol (in DMSO), 50 µl 90 mM p-Coumarsiure (in DMSO) wurden auf 10 ml mit 100 mM Tris pH 8,5 aufgefüllt und 3 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 5 s und einer Stunde belichtet.

4.9. Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten

4.9.1. Protoplastengewinnung aus Tabakmesophyll

Die Isolierung von Protoplasten aus Tabakblättern erfolgte ausgehend von den in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Tabakpflanzen unter sterilen Bedingungen. Es wurden zunächst 7 Petrischalen mit jeweils 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 ddH_2O]) befüllt. Die untere Epidermis der Blatthälften wurde entweder mit einem speziell angefertigten Stößel penetriert oder mit einem Skalpell in 1 mm Abständen vorsichtig eingeschnitten. Anschließend wurden die Hauptleitbündel mit einem Skalpell entfernt und die Blatthälften mit der Unterseite auf die Enzymlösung gelegt. Nach 20 Stunden Inkubation bei 25°C im Dunkeln, wurden die Petrischalen zur vollständigen Freisetzung der Protoplasten vorsichtig geschwenkt und eine weitere Stunde inkubiert. Die Isolierung der Protoplasten aus den Reaktionsansätzen erfolgte durch Filtration dieser Ansätze durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 80 μm . Das Netz und die Petrischalen wurden anschließend mit Elektroporationspuffer (10 mM Hepes; pH 7,2 mit KOH eingestellt; 400 mM Saccharose; 600 mg/l CaCl_2 ; 6 g/l KCl in H_2O) ausgeschwenkt und nachgespült, sodass man ein Endvolumen von 100 ml Protoplastenlösung erhält. Dieses wurde in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 80 g für 15 min ungebremst zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Die entstandene flotierende Schicht aus Protoplasten wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette durchstoßen und die sedimentierten Zelltrümmer sowie die Enzymlösung mit einer peristaltischen Pumpe (Watson Marlow U310) entfernt. Nach Resuspension der Protoplasten in je 25 ml Elektroporationspuffer und anschließender ungebremster Zentrifugation bei 80 g für 10 min wurden weitere Zelltrümmer und Elektroporationspuffer abermals abgesaugt. Die Protoplasten wurden danach in jeweils 10 ml Elektroporationspuffer resuspendiert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Flotation wurde eine Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ Protoplasten/ml eingestellt.

4.9.2. Transformation der Protoplasten

Die Transformation der wie unter Kapitel 4.9.1 gewonnenen Protoplasten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurde ausschließlich die wie unter Kapitel 4.6.6.3 hergestellte DNA verwendet. Diese wurde in Elektroporationspuffer (10 mM Hepes; pH 7,2 mit KOH eingestellt; 400 mM Saccharose; 600 mg/l CaCl_2 ; 6 g/l KCl in ddH_2O) entsprechend auf 100 μl verdünnt und zu 500 μl der in einer Halbmikroküvette befindlichen Protoplastensuspension gegeben. Durch kurzes Aufschütteln wurde die DNA mit den Protoplasten gut durchmischt und für fünf Minuten inkubiert. Nach der Elektroporation (1000 μF , 160 V) wurde die transformierte Pro-

toplastensuspension nochmals für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Protoplasten vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze mit 2 ml TEX-Puffer (siehe 4.9.1) in eine kleine Petrischale (4 cm Durchmesser) überführt und für 24 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

4.9.3. Ernten der Protoplasten und des Mediums

Nach 24stündiger Inkubation wurde die Protoplastensuspension in ein 10 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 100 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) für fünf Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dieser Schritt diente zur Separation der flotierenden intakten Protoplasten sowohl vom Kulturmedium als auch von den abgestorbenen sedimentierten Protoplasten. Mit einer ausgezogenen Pasteurpipette wurde die Schicht der flotierenden Protoplasten vorsichtig durchstoßen und bis zu 1 ml des Kulturmediums langsam abgesaugt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gelagert und die Zelltrümmer in einer anschließenden Zentrifugation bei 13000 g für 10 min bei 4°C sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand, das zellfreie Kulturmedium, wurde für weitere biochemische Charakterisierungen auf Eis aufbewahrt. Die verbliebenen Protoplasten wurden auf 10 ml mit einer 250 mM NaCl-Lösung verdünnt, kurz geschwenkt und fünf Minuten bei 100 g 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.

4.10. Transiente Genexpression in BY-2 Suspensionskulturzellen

Die Transformation von BY-2 Suspensionskulturzellen zur transienten Genexpression erfolgte mittels Partikelbeschuss. Als Ausgangsmaterial dienten 3 – 4 Tage alte BY-2 Suspensionszellkulturen. Es wurden 2 - 3 ml dieser Zellkulturen auf Papierfilter (Millipore, Bedford, USA) vakuumfiltriert, welches anschließend auf festes, in einer kleinen Petrischale (3,5 cm Durchmesser) befindliches MS-Medium (2 ml MS-Medium mit 0.8 % (w/v) Agar) gelegt wurde. Die Schalen wurden in Aluminiumfolie eingewickelt und so bis zum Beschuss durch Partikel bei RT aufbewahrt.

Für den Beschuss wurde ein heliumbetriebener Partikelbeschleuniger (PDS-1000/He, Biorad, Hercules, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für jedes Konstrukt wurden zwei Platten je 3x beschossen. Als Träger der DNA dienten Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1,6 µm. Diese wurden mit 2,5 – 5 µg DNA umhüllt. Dazu wurden 25 µl Partikel (60 mg/1 ml 50 % (v/v) Glycerin) mit der DNA, 25 µl 2.5 M CaCl₂ und 10 µl 0.1 M Spermidin unter ständigem vortexen gemischt, anschließend für weitere 3 min gevortext und bei g_{\max} für 10 s zentrifugiert. Die Partikel wurden einmal mit 200 µl EtOH_{abs} gewaschen und dann in 18 µl EtOH_{abs} resuspendiert. Je 6 µl der Suspension wurden auf einen Makrocarrier gegeben und getrocknet.

Die Platten mit den BY-2 Zellen wurden unter einer Stoppscheibe mit einem Abstand von 8 cm platziert. Unter 28 Inch Quecksilbersäule Vakuum wurden die Makrocarrier mit Hilfe eines Heliumdrucks von 1100 psi beschleunigt. Die beschossenen BY-2 Zellen wurden im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Die Analyse der BY-2 Zellen erfolgte mit einem inversen Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM 510 META) (siehe 4.14).

4.11. Agrobakterien-vermittelte Transformation von Tabakblättern zur transienten Genexpression

Die Transformation von Epidermiszellen in Tabakblättern zur transienten Genexpression wurde mittels Infiltration des rekombinanten Agrobakterien Stammes C58C1 durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten 6 – 8 Wochen alte, auf Erde gewachsene Tabakpflanzen mit einer Höhe von maximal 60 cm.

Die Agrobakterien, welche das Gen von Interesse aufgenommen haben, wurden vor der Infiltration aufgereinigt. Dazu wurde 1 ml einer 3 ml ü.N.-Kultur zweimal bei 8000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml Infiltrationsmedium (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM Mes, 5 µl von 200 mM Acetosyringon, mit ddH₂O auf 10 ml auffüllen) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde nun mit Infiltrationsmedium auf einen OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Zur Vorbereitung auf die Infiltration wurden die Blätter befeuchtet um die Verdunstungsrate zu erhöhen/erniedrigen. Die vorbereitete Bakteriensuspension wurde mit einer 1 ml Spritze aufgezogen und wie folgt in das Mesophyll des Blattes gespritzt. Das Blatt wurde mit der Oberseite nach unten um einen behandschuhten Finger gespannt, sodass die untere Epidermis nach oben zeigt. Die Spritze wurde fest an die untere Epidermis des Blattes gedrückt und die Bakteriensuspension wurde kontinuierlich in das Blattgewebe gespritzt. Die infiltrierten Bereiche des Blattes wurden mit einem Filzstift markiert und nummeriert.

Die Inkubation der Pflanzen wurde für mindestens zwei Tage unter Langtagbedingungen im Gewächshaus (Kap. 4.5.1) durchgeführt.

4.12. Agrobakterien-vermittelte Transformation von BY-2 Zellen zur stabilen Genexpression

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von BY-2 Zellen wurde mittels Kokultivierung einer BY-2 Suspensionskultur mit einer Agrobakterien-Kultur (LBA4404), welche das Gen von Interesse trägt, durchgeführt. Die rekombinanten Agrobakterien-Kulturen wurden in 10 ml YEB Medium (0,5% Rinderextrakt, 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Bactopeptone, 0,5% Saccharose, 2 mM McCl₂ mit Rifampicin (100 µg/ml) und entsprechender Antibiotika als Selektionsmarker (siehe 4.2.2) über zwei Tage bei 28°C angezogen. Anschließend wurden 100 µl dieser Vorkultur in 10 ml YEB Medium überimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag

wurden 4 ml einer drei Tage alten BY-2 Kultur zusammen mit 100 µl der Agrobakterien Suspension in einer Petrischale gegeben und bei 25°C im Dunkeln kokultiviert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Zellen bei 1000 rpm sedimentiert, drei Mal mit 8 – 12 ml MS Medium (Kap. 4.5.3.1) (versetzt mit 500 µg/ml Carbenicillin) gewaschen und anschließend auf festem MS Medium mit Carbenicillin (500 µg/ml) und entsprechender Antibiotika [pTA7002: Hygromycin (30 µg/ml)] als Selektionsmarker in Pflanzen ausplattiert. Carbenicillin wird verwendet um das Wachstum der Agrobakterien nach bereits wenigen Stunden oder Tagen der Kokultivierung vollständig zu inhibieren. Erfolgreich transformierte BY-2 Zellen wuchsen in ungefähr drei bis vier Wochen als kleine Kalli heran. Diese wurden auf neue Agarplatten mit BY-2 Selektionsmedium umgesetzt und nach erneutem Wachstum in flüssiges BY-2 Selektionsmedium überführt. Diese BY-2 Zellsuspensionskulturen wurden wie in Kapitel 4.5.3.1 beschrieben kultiviert. Die Selektion mit Carbenicillin und entsprechender Antibiotika sollte mindestens drei Wochen weitergeführt werden, um das vollständige Abtöten der Agrobakterien zu gewährleisten.

4.13. Messung der α -Amylaseaktivität

Die Messung der α -Amylaseaktivität wurde mit Hilfe des „Cereal α -amylase assay“ (Megazyme, Bray, Irland) durchgeführt. Das hierbei eingesetzte Substrat p-Nitrophenol-Maltoheptaosid (BPNPG7) wird durch Aktivität der α -Amylase hydrolysiert und das dabei entstandene p-Nitrophenyl-Maltosaccharid wird durch Glucoamylase und α -Glucosidase in Glucose und p-Nitrophenol gespalten. Die Konzentration des freigesetzten p-Nitrophenols kann photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Zur Messung der α -Amylaseaktivität wurden die in Kapitel 4.9.3 hergestellten Medien- und Zellproben mit Amylaseextraktionspuffer (50 mM Maleinsäure, 50 mM NaCl, 80 mM NaOH, 2 mM CaCl₂, 0,005% (w/v) Natriumazid, in ddH₂O, pH 5,7 mit HCl eingestellt) verdünnt. Die Zellproben wurden mit einem kurzen Ultraschallpuls (Bandelin Sonoplus GM70, Berlin, 5 s, 50 % Leistung) homogenisiert und die dabei entstandenen Zelltrümmer bei 20.000 g für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert. Der klare Überstand wurde für die Messung der α -Amylaseaktivität verwendet. 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 ddH₂O) versetzt, kurz gemischt und bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 15 – 50 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl einer 1 %igen Tris-Lösung (w/v in ddH₂O) gestoppt. Die Extinktion der Proben wurde in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Spektralphotometers (Biorad Benchmark Platereader) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

4.14. Konfokalmikroskopie

4.14.1. Probenvorbereitung

Die zur Mikroskopie verwendeten Objektträger wurden vorher mit einer Klebefolie beklebt, in die mit dem Skalpell ein 1 cm * 1,5 cm großer Ausschnitt geschnitten wurde. Protoplasten wurden 5 - 24 Stunden nach der Transformation (Kap. 4.9.2) mit den unterschiedlichen Fluoreszenzkonstrukten geerntet (Kap. 4.9.3) und auf eine Dichte von ca. $2 * 10^6$ Zellen/ml konzentriert, um eine ausreichende Zelldichte zur Identifikation von Transformanten zu erreichen. Maximal 50 µl der Protoplastensuspension wurden auf die vorbereiteten Objektträger gegeben. Die empfindlichen Protoplasten werden somit druckfrei zwischen Deckglas (24 mm * 32 mm) und Objektträger gehalten.

BY-2 Zellen wurden entweder direkt aus dem Flüssigmedium oder nach 5 – 24 Stunden Inkubation nach Partikelbeschuss (Kap. 4.10) mit einem Skalpell von der Petrischale mit etwas flüssigem MS-Medium auf einen, wie oben beschrieben, vorbereiteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (24 mm * 32 mm) abgedeckt.

Aus den infiltrierten Bereichen der Tabakblätter wurden mit einem Skalpell quadratische Stücke (0,5 cm * 0,5 cm) ausgeschnitten und mit der Unterseite nach oben gerichtet und einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger gegeben. Das Deckglas (22 mm * 50 mm) wurde so aufgedrückt, dass das Blattstück eben auf dem Objektglas liegt.

4.14.2. CLSM

Die Proben wurden an einem inversen Mikroskop (Axiovert 200M) mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe nach Transformanten durchsucht. Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden anschließend mit dem Zeiss LSM 510 META System aufgenommen. Für Aufnahmen von Protoplasten aus *N. tabacum* und BY-2 Zellen wurde das C-apochromatische 63/1,2 Wasser korrigierte Objektiv, für Aufnahmen von transformierten Tabakblättern das Plan-Neofluor 40x/1,3 Öl Immersionsobjektiv verwendet. Mittels „Lambda-Scans“ über das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts von 400-750 nm wurde der optimale Fluoreszenzbereich für die einzelnen Proteine unter verschiedenen Anregungswellenlängen bestimmt (siehe Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Darstellung der CLSM Bedingungen zur Detektion der jeweiligen fluoreszierenden Proteine.

	Laser	Wellenlänge (Anregung)	Emissionsmaxima	Metadetektor (Emission)
CFP	Argon/2	458 nm	477 nm	480-520 nm
GFP	Argon/2	488 nm	508 nm	496-518 nm
rsYFP	Argon/2	514 nm	560 nm	550-571 nm
RFP	Helium/Neon I	543 nm	603 nm	603-646 nm

Für die Aufnahmen von Koexpressionsstudien von YFP und GFP Konstrukten wurden die Anregungswellenlängen 458 nm für GFP und 514 nm für YFP des Argon Lasers verwendet und Fluorophore abwechselnd mit dem „multi tracking“ Modus des Mikroskops angeregt. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung des Nebenfärberteilers 545 nm und dem Bandpassfilter von 475-525 nm für GFP und dem Bandpassfilter 560-615 nm für YFP detektiert.

Bei Koexpressionsstudien von YFP mit RFP als auch von GFP mit RFP wurde die Fluoreszenz mittels des Metadetektors unter der Verwendung der Hauptfärberteiler HFT 405/514 und HFT 488/543 durchgeführt. Die Fluorophore wurden abwechselnd mit dem „multi tracking“ Modus des Mikroskops angeregt. Die Kodetektion von YFP und RFP wurde mittels Anregung bei 514 nm und Emission bei 550-571 nm für YFP und der Anregung mit 543 nm und Emission von 603-646 nm für RFP durchgeführt. Kodetektion von GFP und RFP wurde bei einer Anregung von 488/543 nm und Emission bei 496-529 nm (GFP) und 596-646 nm (RFP) durchgeführt. Alle Angaben sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Die Pinholes wurden an 1 Airy Unit für jede Wellenlänge (108 μm , 119 μm , 138 μm) angepasst. Die Leistung der Laser wurde bei allen Experimenten auf gleichem Niveau gehalten. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm „Zeiss LSM Image Browser“ (Version 3.5.0.376) nachbearbeitet.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Färberteiler und Bandpassfilter für Koexpressionsstudien

	Hauptfärberteiler	Nebenfärberteiler	Bandpassfilter	Metadetektor
GFP5/YFP	458/514 nm	545 nm	475-525 nm, 560-615 nm	-
YFP/RFP	405/514 nm 488/543 nm	-	-	550-571 nm 603-646 nm
GFP/RFP	488/543 nm	-	-	496-518 nm 603-646 nm
CFP/YFP	458/514 nm	545 nm	480-520 IR 565-615 IR	-

4.15. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem Philips CM10 Transmissions-elektronenmikroskop bei 80 kV.

4.15.1. Immunmarkierung von BY-2 Zellen für die Elektronenmikroskopie

Drei bis vier Tage alte BY-2 Zellsuspensionskulturen 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 GFP in Primärverdünnungen von 1:25 bis 1:100 inkubiert, mit Waschpuffer (PBS mit 1 % BSA) gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit goldgekoppelten Sekundäntikörpern (Biocell GAR10) bei einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit entweder 1 % BSA. Die Schnitte wurden mit wässrigen Uranylacetat/Bleicitrat-Lösungen nachkontrastiert und in einem Philips CM10 Transmissions-elektronenmikroskop (Philips, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV betrachtet.

5. Literaturverzeichnis

- Altan-Bonnet, N., Phair, R.D., Polishchuk, R.S., Weigert, R., and Lippincott-Schwartz, J.** (2003). A role for Arf1 in mitotic Golgi disassembly, chromosome segregation, and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13314-13319.
- Altan-Bonnet, N., Sougrat, R., Liu, W., Snapp, E.L., Ward, T., and Lippincott-Schwartz, J.** (2006). Golgi inheritance in mammalian cells is mediated through endoplasmic reticulum export activities. *Mol Biol Cell* **17**, 990-1005.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Antonny, B., and Schekman, R.** (2001) ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 438-443.
- Aoyama, T., and Chua, N.H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**, 605-612.
- Assaad, F.F., Huet, Y., Mayer, U., and Jurgens, G.** (2001). The cytokinesis gene KEULE encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. *J Cell Biol* **152**, 531-43.
- Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A., and Rothman, J.E.** (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* **39**, 405-416.
- Ballensiefen, W., Ossipov, D., and Schmitt, H.D.** (1998). Recycling of the yeast v-SNARE Sec22p involves COPI-proteins and the ER transmembrane proteins Ufe1p and Sec20p. *J Cell Sci* **111 (Pt 11)**, 1507-1520.
- Banfield, D.K., Lewis, M.J., and Pelham, H.R.** (1995). A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex. *Nature* **375**, 806-809.
- Banfield, D.K., Lewis, M.J., Rabouille, C., Warren, G., and Pelham, H.R.** (1994). Localization of Sed5, a putative vesicle targeting molecule, to the cis-Golgi network involves both its transmembrane and cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **127**, 357-371.
- Barlowe, C.** (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 67-76.
- 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.

- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R.** (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.
- Barlowe, C., and Schekman, R.** (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**, 347-349.
- Bar-Peled, M., and Raikhel, N.V.** (1997). Characterization of AtSEC12 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol.* **114**, 315–24.
- Bassham, D.C., Sanderfoot, A.A., Kovaleva, V., Zheng, H., and Raikhel, N.V.** (2000). AtVPS45 complex formation at the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* **11**, 2251-2265.
- Baumert, M., Maycox, P.P., Navone, F., Decamilli, P., and Jahn, R.** (1989). Synaptobrevin: an intergral membrane-protein of 18000 daltons present in small synaptic vesicles of rat-brain. *EMBO J* **8**, 379-384.
- Bennet, M.K., Calakos, N., and Scheller, R.H.** (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257**, 255-259.
- Bentley, M., Liang, Y., Mullen, K., Xu, D., Sztul, E., and Hay, J.C.** (2006). SNARE status regulates tether recruitment and function in homotypic COPII vesicle fusion. *J Biol Chem* **281**, 38825-38833.
- Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., and Scheller, R.H.** (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839–41
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C.** (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* **15**, 441-447.
- Boisson, M., Gomord, V., Audran, C., Berger, N., Dubreucq, B., et al.** (2001). *Arabidopsis* glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J.* **20**, 1010–19.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-166.
- Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T., and Rothman, J.E.** (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7852–56.
- Bracher, A., and Weissenhorn, W.** (2002). Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p. *Embo J* **21**, 6114-6124.

- 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., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.M., and Paris, N.** (2002). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* **14**, 1077-1092.
- Brandizzi, F., Hanton, S., DaSilva, L.L., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J., and Hawes, C.** (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.
- Brandizzi, F., Saint-Jore, C., Moore, I., and Hawes, C.** (2003). The relationship between endomembranes and the plant cytoskeleton. *Cell Biol Int.* **27**, 177-179.
- Braun, S., and Jentsch, S.** (2007). SM-protein-controlled ER-associated degradation discriminates between different SNAREs. *EMBO Rep* **8**, 1176-1182.
- Brown, J.C., Jolliffe, N.A., Frigerio, L., and Roberts, L.M.** (2003). Sequence-specific, Golgi-dependent targeting of the castor bean 2S albumin to the vacuole in tobacco protoplasts. *Plant J* **36**, 711-719.
- Burri, L., and Lithgow, T.** (2004). A complete set of SNAREs in yeast. *Traffic* **5**, 45-52.
- Burri, L., Varlamov, O., Doege, C.A., Hofmann, K., Beilharz, T., Rothman, J.E., Sollner, T.H., and Lithgow, T.** (2003). A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9873-9877.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S.** (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**, 671-682.
- Cao, X., and Barlowe, C.** (2000). Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J Cell Biol* **149**, 55-66.
- Cao, X., Ballew, N., and Barlowe, C.** (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Usa1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *Embo J* **17**, 2156-2165.
- 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.
- Casadaban, M.J., and Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**, 179-207.

- Chatre, L., Brandizzi, F., Hocquellet, A., Hawes, C., and Moreau, P.** (2005). Sec22 and Memb11 are v-SNAREs of the anterograde endoplasmic reticulum-Golgi pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Plant Physiol* **139**, 1244-1254.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H.** (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 98-106.
- Chernomordik, L.V., and Kozlov, M.M.** (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* **72**, 175-207.
- Chrispeels, M.J.** (1991). Sorting of Proteins in The Secretory System. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 21-53.
- Chrispeels, M.J., and Herman, E.M.** (2000). Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a newtype of organelle, precursor protease vesicles. *Plant Physiol.* **123**, 1227-34.
- Clary, D.O., Griff, I.C., and Rothman J.E.** (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**, 709-21.
- Contreras, I., Ortiz-Zapater, E., Castilho, L.M., and Aniento, F.** (2000). Characterization of Cop I coat proteins in plant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 176-182.
- Dascher, C., and Balch, W.E.** (1996). Mammalian Sly1 regulates syntaxin 5 function in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem* **271**, 15866-15869.
- 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., Snapp, E.L., Denecke, J., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C., and Brandizzi, F.** (2004). Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell* **16**, 1753-1771.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**, 4777 - 4788.
- Denecke, J., Botterman, J., and Deblaere, R.** (1990). Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* **2**, 51-59.
- Denecke, J., Goldman, M.H., Demolder, J., Seurinck, J., and Botterman, J.** (1991). The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. *Plant Cell* **3**, 1025-1035.

- Denecke, J., Carlsson, L.E., Vidal, S., Hoglund, A.S., Ek, B., van Zeijl, M.J., Sinjorgo, K.M., and Palva, E.T.** (1995). The tobacco homolog of mammalian calreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell* **7**, 391-406.
- Denecke, J., De Rycke, R., and Botterman, J.** (1992). Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *Embo J* **11**, 2345-2355.
- Deneka, M., Neeft, M., and van der Sluijs, P.** (2003). Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 121-42.
- Dietrich, L.E., Boeddinghaus, C., LaGrassa, T.J., and Ungermann, C.** (2003). Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 111-119.
- Dilcher, M., Veith, B., Chidambaram, S., Hartmann, E., Schmitt, H.D., and Fischer von Mollard, G.** (2003). Use1p is a yeast SNARE protein required for retrograde traffic to the ER. *Embo J* **22**, 3664-3674.
- Di Sansebastiano, G.P., Paris, N., Marc-Martin, S., and Neuhaus, J.M.** (1998). Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J.* **15**, 449-457.
- Duden, R.** (2003). ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* **20**, 197-207.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., et al.** (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* **18**, 4372-82.
- Dulubova, I., Yamaguchi, T., Arac, D., Li, H., Huryeva, I., Min, S.W., Rizo, J., and Sudhof, T.C.** (2003). Convergence and divergence in the mechanism of SNARE binding by Sec1/Munc18-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 32-37.
- Dupree, P., and Sherrier, D.J.** (1998). The plant Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 259-70
- Elias, M., Drdova, E., Ziak, D., Bavlínka, B., Hala, M., et al.** (2003). The exocyst complex in plants. *Cell Biol. Int.* **27**, 199-201.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., and Duden, R.** (2004). The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell* **15**, 1011-1023.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E.** (1998). The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* **8**, 2-10.

- Fasshauer, D., Antonin, W., Subramaniam, V., and Jahn, R.** (2002). SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 144–51.
- Fasshauer, D., and Margittai, M.** (2004). A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem* **279**, 7613-7621.
- Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W.K., Jahn, R., and Brünger, A.T.** (1997). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimidesensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.* **272**, 28036–41.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R.** (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15781-15786.
- Faulstich, D., Auerbach, S., Orci, L., Ravazzola, M., Wegchinger, S., Lottspeich, F., Stenbeck, G., Harter, C., Wieland, F.T., and Tschochner, H.** (1996). Architecture of coatomer: molecular characterization of delta-COP and protein interactions within the complex. *J Cell Biol* **135**, 53-61.
- Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T.C., and Rizo, J.** (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* **94**, 841-849.
- Fiebig, K.M., Rice, L.M., Pollock, E., and Brunger, A.T.** (1999). Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol* **6**, 117-123.
- Filippini, F., Rossi, V., Galli, T., Budillon, A., D'Urso, M., and D'Esposito, M.** (2001). Longins: a new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends Biochem Sci* **26**, 407-409.
- Flanagan, J.J., and Barlowe, C.** (2006). Cysteine-disulfide cross-linking to monitor SNARE complex assembly during endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J Biol Chem* **281**, 2281-2288.
- Foresti, O., daSilva, L.L., and Denecke, J.** (2006). Overexpression of the Arabidopsis syntaxin PEP12/SYP21 inhibits transport from the prevacuolar compartment to the lytic vacuole in vivo. *Plant Cell* **18**, 2275-2293.
- Frangioni, J.V., and Neel, B.G.** (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* **210**, 179-187.
- Frigerio, L., Jolliffe, N.A., Di Cola, A., Hernandez, F.D., Paris, N., Neuhaus, J.M., Ceriotti, A., and Roberts, L.M.** (2001). The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Phys* **126**, 167-175.

- Geelen, D., Leyman, B., Batoko, H., Di Sansabastiano, 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.
- Gerst, J.E.** (2003). SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim. Biophys. Acta* **1641**, 99–110.
- Gillmor, C.S., Poindexter P., Lorieau J., Palcic M.M., Somerville, C.** (2002). Alpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *J. Cell Biol.* **156**, 1003–13.
- Giraud, C.G., Hu, C., You, D., Slovic, A.M., Mosharov, E.V., Sulzer, D., Melia, T.J., and Rothman, J.E.** (2005). SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes. *J Cell Biol* **170**, 249-260.
- Gomez, L., and Chrispeels, M.J.** (1993). Tonoplast and Soluble Vacuolar Proteins Are Targeted by Different Mechanisms. *Plant Cell* **5**, 1113-1124.
- Gomord, V., and Faye, L.** (1996). Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. *Plant Physiol Biochem* **34**, 165-181.
- Gonzalez, L.C., Jr., Weis, W.I., and Scheller, R.H.** (2001). A novel snare N-terminal domain revealed by the crystal structure of Sec22b. *J Biol Chem* **276**, 24203-24211.
- Grabowski, R., and Gallwitz, D.** (1997). High-affinity binding of the yeast cis-Golgi t-SNARE, Sed5p, to wild-type and mutant Sly1p, a modulator of transport vesicle docking. *FEBS Lett* **411**, 169-172.
- Graf, C.T., Riedel, D., Schmitt, H.D., and Jahn, R.** (2005). Identification of functionally interacting SNAREs by using complementary substitutions in the conserved '0' layer. *Mol Biol Cell* **16**, 2263-2274.
- Grote, E., Baba, M., Ohsumi, Y., and Novick, P.J.** (2000). Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. *J Cell Biol* **151**, 453-466.
- Hadlington, J.L., and Denecke, J.** (2000). Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **3**, 461-468.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nul. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

- Hara-Nishimura, 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.
- Hardwick, K.G., and Pelham, H.R.** (1992). SED5 encodes a 39-kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *J Cell Biol* **119**, 513-521.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Gorlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T.A.** (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**, 654-657.
- Hay, J.C., Chao, D.S., Kuo, C.S., and Scheller, R.H.** (1997). Protein interactions regulating vesicle transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells. *Cell* **89**, 149-158.
- Hay, J.C., Klumperman, J., Oorschot, V., Steegmaier, M., Kuo, C.S., and Scheller, R.H.** (1998). Localization, dynamics, and protein interactions reveal distinct roles for ER and Golgi SNAREs. *J Cell Biol* **141**, 1489-1502.
- Hebert, D.N., Foellmer, B., and Helenius, A.** (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425-433.
- Hebert, D.N., Foellmer, B., and Helenius, A.** (1996). Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J.* **15**, 2961-2968.
- Helms, J.B., and Rothman, J.E.** (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-354.
- Hiesinger, P.R. et al.** (2005). The v-ATPase V₀ subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* **121**, 607-620.
- Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Hinz, G.** (2001). Vacuolar storage proteins are sorted in the cis-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **152**, 41-50.
- Hinz, G., Hillmer, S., Baumer, M., and Hohl, I.** (1999). Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* **11**, 1509-1524.

- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179 - 180.
- Hofmann, M.W., Peplowska, K., Rohde, J., Poschner, B.C., Ungermann, C., and Langosch, D.** (2006). Self-interaction of a SNARE transmembrane domain promotes the hemifusion-to-fusion transition. *J Mol Biol* **364**, 1048-1060.
- 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**, 2539-2550.
- Holwerda, B.C., Padgett, H.S., and Rogers, J.C.** (1992). Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell* **4**, 307-318.
- Hong, W.** (2005). SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 493-517.
- Irons, S.L., Evans, D.E., and Brandizzi, F.** (2003). The first 238 amino acids of the human lamin B receptor are targeted to the nuclear envelope in plants. *J. Exp. Bot.* **54**, 943–50
- Jackson, M.R., Nilsson, T., and Peterson, P.A.** (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **121**, 317-333.
- Jackson, C.L., and Casanova, J.E.** (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-67.
- Jahn, R., and Grubmuller, H.** (2002). Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 488-495.
- Jahn, R., and Scheller, R.H.** (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643.
- Jauh, G.Y., Phillips, T.E., and Rogers, J.C.** (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882.
- 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., Phillips, T.E., Rogers, S.W., and Rogers, J.C.** (2000). Biogenesis of the protein storage vacuole crystalloid. *J Cell Biol* **150**, 755-770.
- 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.
- Joglekar, A.P., Xu, D., Rigotti, D.J., Fairman, R., and Hay, J.C.** (2003). The SNARE motif contributes to rbt1 intracellular targeting and dynamics independently of SNARE interactions. *J Biol Chem* **278**, 14121-14133.

- Jurgens, G.** (2005). Cytokinesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 281-299.
- Kasai, K., and Akagawa, K.** (2001). Roles of the cytoplasmic and transmembrane domains of syntaxins in intracellular localization and trafficking. *J Cell Sci* **114**, 3115-3124.
- Kirchhausen, T.** (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 187-198.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincott-Schwartz, J.** (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**, 1071-1080.
- Kosodo, Y., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K.** (2002). Binding of Sly1 to Sed5 enhances formation of the yeast early Golgi SNARE complex. *J Cell Sci* **115**, 3683-3691.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langhans, M., and Robinson, D.G.** (2007). 1-Butanol targets the Golgi apparatus in tobacco BY-2 cells, but in a different way to Brefeldin A. *J Exp Bot* **58**, 3439-3447.
- Langhans, M., Hawes, C., Hillmer, S., Hummel, E., and Robinson, D.G.** (2007). Golgi regeneration after brefeldin A treatment in BY-2 cells entails stack enlargement and cis-tertiary growth followed by division. *Plant Physiol* **145**, 527-538.
- Langosch, D., Crane, J.M., Brosig, B., Hellwig, A., Tamm, L.K., and Reed, J.** (2001). Peptide mimics of SNARE transmembrane segments drive membrane fusion depending on their conformational plasticity. *J Mol Biol* **311**, 709-721.
- Langosch, D., Hofmann, M., and Ungermann, C.** (2007). The role of transmembrane domains in membrane fusion. *Cell Mol Life Sci* **64**, 850-864.
- Latijnhouwers, M., Hawes, C., and Carvalho, C.** (2005). Holding it all together? Candidate proteins for the plant Golgi matrix. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 632-639.
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R.** (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 87-123.
- Lerman, J.C., Robblee, J., Fairman, R., and Hughson, F.M.** (2000). Structural analysis of the neuronal SNARE protein Syntaxin-1A. *Biochemistry* **39**, 8470-8579.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., and Cosson, P.** (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207.
- Lewis, M.J., and Pelham, H.R.** (1996). SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* **85**, 205-215.

- Lewis, M.J., Rayner, J.C., and Pelham, H.R.** (1997). A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum. *Embo J* **16**, 3017-3024.
- Li, Y., Gallwitz, D., and Peng, R.** (2005). Structure-based functional analysis reveals a role for the SM protein Sly1p in retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **16**, 3951-3962.
- Lian, J.P., and Ferro-Novick, S.** (1993). Bos1p, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell* **73**, 735-745.
- Lipka, V., Kwon, C., and Panstruga, R.** (2007). SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 147-174.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D.** (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813.
- Liu, Y., and Barlowe, C.** (2002). Analysis of Sec22p in endoplasmic reticulum/Golgi transport reveals cellular redundancy in SNARE protein function. *Mol Biol Cell* **13**, 3314-3324.
- Liu, Y., Flanagan, J.J., and Barlowe, C.** (2004). Sec22p export from the endoplasmic reticulum is independent of SNARE pairing. *J Biol Chem* **279**, 27225-27232.
- Lowe, M., and Kreis, T.E.** (1996). In vivo assembly of coatomer, the COP-I coat precursor. *J Biol Chem* **271**, 30725-30730.
- Lucas, W.J., and Wolf, S.** (1993). Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* **3**, 308-315.
- Lukowitz, W., Nickle, T.C., Meinle, D.W., Last, R.L., Conklin, P.L., Somerville, C.R.** (2001). Arabidopsis *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyl-transferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2262-67.
- Lupashin, V., and Sztul, E.** (2005). Golgi tethering factors. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 325-339.
- 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.
- Maliga, P., Sz-Breznovits, A., and Marton, L.** (1973). Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nat New Biol* **244**, 29-30.

- Mancias, J.D., and Goldberg, J.** (2007). The transport signal on Sec22 for packaging into COPII-coated vesicles is a conformational epitope. *Mol Cell* **26**, 403-414.
- Markgraf, D.F., Peplowska, K., Ungermann, C.** (2007). Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Letters* **581**, 2125-2130.
- Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G., Camonis, J., Proux-Gillardeaux, V., Daviet, L., Formstecher, E., Hamburger, A., Filippini, F., D'Esposito, M., and Galli, T.** (2003). A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9011-9016.
- Marty, F.** (1999). Vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-599
- Matsuoka, K., Matsumoto, S., Hattori, T., Machida, Y., and Nakamura, K.** (1990). Vacuolar targeting and posttranslational processing of the precursor to the sweet potato tuberous root storage protein in heterologous plant cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 19750-19757.
- Matsuoka, K., Morimitsu, Y., Uchida, K., and Schekman, R.** (1998). Coat assembly directs v-SNARE concentration into synthetic COPII vesicles. *Mol Cell* **2**, 703-708.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., and Yeung, T.** (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-275.
- Matsuoka, K., and Neuhaus, J.M.,** (1999). *Cis*-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J Exp Bot* **50**, 165-174.
- May, A.P., Whiteheart, S.W., and Weis, W.I.** (2001). Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimidesensitive factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 21991-94.
- Mayer, A.** (2002). Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 289-314.
- McNew, J.A., Weber, T., Engelman, D.M., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (1999). The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Mol Cell* **4**, 415-421.
- McNew, J.A., Weber, T., Parlati, F., Johnston, R.J., Melia, T.J., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (2000). Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *J Cell Biol* **150**, 105-117.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-159.

- Meyer, D.I., Krause, E., and Dobberstein, B.** (1982). Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature* **297**, 647-650.
- Michelsen, K., Schmid, V., Metz, J., Heusser, K., Liebel, U., Schwede, T., Spang, A., and Schwappach, B.** (2007). Novel cargo-binding site in the beta and delta subunits of coatomer. *J Cell Biol* **179**, 209-217.
- Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S., and Schekman, R.** (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *Embo J* **21**, 6105-6113.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R.** (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* **114**, 497-509.
- Misura, K.M., Scheller, R.H., Weis, W.I.** (2000). Three dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin complex. *Nature* **404**, 355-62.
- Montecucco, C., Schiavo, G., and Pantano, S.,** (2005). SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci* **30**, 367-372.
- Moreau, P., Brandizzi, F., Hanton, S., Chatre, L., Melser, S., Hawes, C., and Satiat-Jeunemaitre, B.** (2007). The plant ER-Golgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. *J Exp Bot* **58**, 49-64.
- Morita, M.T., Kato, T., Nagafusa, K., Saito, C., Ueda, T., et al.** (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 47-56
- Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J.** (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* **114**, 483-495.
- 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.
- Munro, S., and Pelham, H.R.** (1986). An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300.
- Munson, M., Chen, X., Cocina, A.E., Schultz, S.M., and Hughson, F.M.** (2000). Interactions with the yeast t-SNARE Sso 1p that control SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol* **7**, 894-902.
- Nagahama, M., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Lacomis, L., Tempst, P., Rothman, J.E., and Sollner, T.H.** (1996). A v-SNARE implicated in intra-Golgi transport. *J Cell Biol* **133**, 507-516.

- Nakano, A., Brada, D., and Schekman, R.** (1988). A membrane glycoprotein, Sec12p, is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J. Cell Biol.* **107**, 851-863.
- Napier, R.M., Fowke, L.C., Hawes, C., Lewis, M., and Pelham, H.R.** (1992). Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **102**, 261-271.
- Nebenfuhr, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A.** (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol* **121**, 1127-1142.
- Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C., and Robinson, D.G.** (2002). Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* **130**, 1102-1108.
- Nebenfuhr, A., and Staehelin, L.A.** (2001). Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 160-167.
- Neuhaus, J.M., and Rogers, J.C.** (1998). Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol Biol* **38**, 127-144.
- Neumann, U., Brandizzi, F., and Hawes, C.** (2003). Protein transport in plant cells: in and out of the Golgi. *Ann Bot (Lond)* **92**, 167-180.
- Newman, A.P., and Ferro-Novick, S.** (1987). Characterization of new mutants in the early part of the yeast secretory pathway isolated by a [3H]mannose suicide selection. *J Cell Biol* **105**, 1587-1594.
- Newman, A.P., Shim, J., and Ferro-Novick, S.** (1990). BET1, BOS1, and SEC22 are members of a group of interacting yeast genes required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Mol Cell Biol* **10**, 3405-3414.
- Nickel, W., Weber, T., McNew, J.A., Parlati, F., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (1999). Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12571-12576.
- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P.A.** (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**, 707-718.
- Nonet, M.L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J.B., and Wei, L.** (1998). Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J Neurosci* **18**, 70-80.

- Oliviusson, P., Heinzerling, O., Hillmer, S., Hinz, G., Tse, Y.C., Jiang, L., and Robinson, D.G.** (2006). Plant Retromer: Identification, Localization to the Prevacuolar Compartment and Microvesicles, and Preliminary Evidence for an Interaction with Vacuolar Sorting Receptors. *Plant Cell* **18**, 1239-1252.
- Orci, L., Glick, B.S., and Rothman, J.E.** (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* **46**, 171-184.
- Ossig, R., Dascher, C., Trepte, H.H., Schmitt, H.D., and Gallwitz, D.** (1991). The yeast SLY gene products, suppressors of defects in the essential GTP-binding Ypt1 protein, may act in endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *Mol Cell Biol* **11**, 2980-2993.
- Ossipov, D., Schroder-Kohne, S., and Schmitt, H.D.** (1999). Yeast ER-Golgi v-SNAREs Bos1p and Bet1p differ in steady-state localization and targeting. *J Cell Sci* **112 (Pt 22)**, 4135-4142.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C.** (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Parlati, F., McNew, J.A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (2000). Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* **407**, 194-198.
- Parlati, F., Varlamov, O., Paz, K., McNew, J.A., Hurtado, D., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (2002). Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5424-5429.
- Pavelka, M., and Robinson, D.G.** (2003). The Golgi apparatus in mammalian and higher plant cells: a comparison. Blackwell Publishing Ltd, *Annual Plant Reviews* **9**, 16-35.
- Pelham, H.R.** (1988). Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *Embo J* **7**, 913-918.
- 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.
- Peng, R., and Gallwitz, D.** (2002). Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *J Cell Biol* **157**, 645-655.

- Peng, R., and Gallwitz, D.** (2004). Multiple SNARE interactions of an SM protein: Sed5p/Sly1p binding is dispensable for transport. *Embo J* **23**, 3939-3949.
- Pfeffer, S.R.** (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* **11**, 487– 491.
- Pfeffer, S.R., and Rothman, J.E.** (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem* **56**, 829-852.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Denecke, J.** (2001). Secretory bulk flow of soluble proteins is COPII dependent. *Plant Cell* **13**, 2005-2020.
- Pimpl, P., and Denecke, J.** (2002). Protein-protein interactions in the secretory pathway, a growing demand for experimental approaches in vivo. *Plant Molecular Biology* **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.
- Poustka, F., Irani, N.G., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K., and Grotewold, E.** (2007). A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in arabidopsis and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiol* **145**, 1323-1335.
- Rancour, D.M., Dickey, C.E., Park, S., and Bednarek, S.Y.** (2002). Characterization of AtCDC48. Evidence for multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants. *Plant Physiol* **130**, 1241-1253.
- 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.
- Rayner, J.C., and Pelham, H.R.** (1997). Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *Embo J* **16**, 1832-1841.
- Reim, K., Mansour, M., Varogueux, F., McMahon, H.T., Südhof, T.C., Brose, N., and Rosenmund, C.** (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* **104**, 71-81.

- Rein, U., Andag, U., Duden, R., Schmitt, H.D., and Spang, A.** (2002). ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *J Cell Biol* **157**, 395-404.
- Renault, L., Guibert, B., and Cherfils, J.** (2003). Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525-530.
- 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.
- Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piequet, A., Loudes, A.M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., and Pfeiffer, P.** (2002). Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *J Virol* **76**, 8808-8819.
- Robinson, D.G., Herranz, M.C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C.** (2007). Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Crit Rev Plant Sci* **26**, 199-225.
- Robinson, D.G., and Hinz, G.** (1997). Vacuole biogenesis and protein transport to the plant vacuole: a comparison with the yeast vacuole and the mammalian lysosome. *Protoplasma* **197**, 1-25.
- Robinson, D.G., Hinz, G., and Holstein, S.E.H.** (1998). The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* **38**, 49-76.
- Robinson, D.G., Oliviusson, P., and Hinz, G.** (2005). Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic* **6**, 615-625.
- Rohde, J., Dietrich, L., Langosch, D., and Ungermann, C.** (2003). The transmembrane domain of Vam3 affects the composition of cis- and trans-SNARE complexes to promote homotypic vacuole fusion. *J Biol Chem* **278**, 1656-1662.
- Rose, J.K., and Doms, R.W.** (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 257-288.
- Rossi, V., Banfield, D.K., Vacca, M., Dietrich, L.E., Ungermann, C., D'Esposito, M., Galli, T., and Filippini, F.** (2004). Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators. *Trends Biochem Sci* **29**, 682-688.
- Rothman, J.E.** (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Rothman, J.E.** (2002). Lasker Basic Medical Research Award. The machinery and principles of vesicle transport in the cell. *Nat Med* **8**, 1059-1062.

- Rothman, J.E., and Warren, G.** (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* **4**, 220-233.
- Rothman, J.E., and Wieland, F.T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.
- Rouille, Y., Rohn, W., and Hoflack, B.** (2000). Targeting of lysosomal proteins. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 165-171.
- Rowe, T., Dascher, C., Bannykh, S., Plutner, H., and Balch, W.E.** (1998). Role of vesicle-associated syntaxin 5 in the assembly of pre-Golgi intermediates. *Science* **279**, 696-700.
- Rutherford, S., and Moore, I.** (2002). The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 518-528.
- Sacher, M., Stone, S., and Ferro-Novick, S.** (1997). The synaptobrevin-related domains of Bos1p and Sec22p bind to the syntaxin-like region of Sed5p. *J Biol Chem* **272**, 17134-17138.
- Saifee, O., Wei, L., and Nonet, M.L.** (1998). The *Caenorhabditis elegans* unc-64 locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. *Mol Biol Cell* **9**, 1235-1252.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saint-Jore-Dupas, C., Gomord, V., and Paris, N.** (2004). Protein localization in the plant Golgi apparatus and the trans-Golgi network. *Cell Mol Life Sci* **61**, 159-171.
- Salama, N.R., Yeung, T., and Schekman, R.W.** (1993). The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J.* **12**, 4073-4082.
- Salinovich, O., and Montelaro, R.C.** (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**, 341-347.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Mantiatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 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., Kovaleva, V., Zheng, H., and Raikhel, N.V.** (1999). The t-SNARE At-VAM3p resides on the prevacuolar compartment in Arabidopsis root cells. *Plant Physiology* **121**, 929-938.
- 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., and Raikhel, N.V.** (2003). The Secretory System of Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, 1-24.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Satiat-Jeunemaitre, B., Cole, L., Bourett, T., Howard, R., and Hawes, C.** (1996). Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J Microsc* **181**, 162-177.
- Satiat-Jeunemaitre, B., Hawes, C.** (1992). Redistribution of a Golgi glycoprotein in plant cells treated with brefeldin A. *J Cell Sci* **107**, 1153 - 1166.
- Sato, M.H., Nakamura, N., Ohsumi, Y., Kouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Wada, Y.** (1997). The AtVAM3 encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **272**, 24530-24535.
- Scheel, J., Pepperkok, R., Lowe, M., Griffiths, G., and Kreis, T.E.** (1997). Dissociation of coatamer from membranes is required for brefeldin A-induced transfer of Golgi enzymes to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **137**, 319-333.
- Schekman, R., and Orci, L.** (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J.** (1997). Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* **139**, 1137-1155.
- 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.
- Seemann, J., Jokitalo, E., Pypaert, M., and Warren, G.** (2000). Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* **407**, 1022-1026.
- Seemann, J., Pypaert, M., Taguchi, T., Malsam, J., and Warren, G.** (2002). Partitioning of the matrix fraction of the Golgi apparatus during mitosis in animal cells. *Science* **295**, 848-851.

- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N., and Pelham, H.R.** (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**, 1349-1357.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J.E., and Wieland, F.T.** (1991). A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature* **349**, 215-220.
- Shim, J., Newman, A.P., and Ferro-Novick, S.** (1991). The BOS1 gene encodes an essential 27-kD putative membrane protein that is required for vesicular transport from the ER to the Golgi complex in yeast. *J Cell Biol* **113**, 55-64.
- Shin, J., Dunbrack, R.L., Jr., Lee, S., and Strominger, J.L.** (1991). Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1918-1922.
- Sitia, R., and Meldolesi, J.** (1992). Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1067-1072.
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R.R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J.E., and Sollner, T.** (1994). A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* **78**, 937-948.
- Sohn, E.J., Kim, E.S., Zhao, M., Kim, S.J., Kim, H., et al.** (2003). Rha1, an *Arabidopsis* Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *Plant Cell* **15**, 1057-70.
- 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.
- Spang, A., and Schekman, R.** (1998). Reconstitution of retrograde transport from the Golgi to the ER in vitro. *J Cell Biol* **143**, 589-599.
- Springer, S., and Schekman, R.** (1998). Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* **281**, 698-700.
- Staehelein, L. A.** (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* **11**, 1151-1165.
- Staehelein, L.A., and Moore, I.** (1995). The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 261-88
- Stefanovic, S., and Hegde, R.S.** (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**, 1147-1159.

- Stone, S., Sacher, M., Mao, Y., Carr, C., Lyons, P., Quinn, A.M., and Ferro-Novick, S.** (1997). Bet1p activates the v-SNARE Bos1p. *Mol Biol Cell* **8**, 1175-1181.
- Suga, K., Hattori, H., Saito, A., and Akagawa, K.** (2005). RNA interference-mediated silencing of the syntaxin 5 gene induces Golgi fragmentation but capable of transporting vesicles. *FEBS Lett* **579**, 4226-4234.
- Surpin, M., and Raikhel, N.** (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 100-109.
- Surpin, M., Zheng, H., Morita, M.T., Saito, C., Avila, E., Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Kovaleva, V., Carter, D., Murphy, A., Tasaka, M., and Raikhel, N.** (2003). The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell* **15**, 2885-2899.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T.** (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.
- Swanson, S.J., Bethke, P.C., and Jones, R.L.** (1998). Barley aleurone cells contain two types of vacuoles. Characterization Of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* **10**, 685-698.
- Tai, W.C., and Banfield, D.K.** (2001). AtBS14a and AtBS14b, two Bet1/Sft1-like SNAREs from *Arabidopsis thaliana* that complement mutations in the yeast SFT1 gene. *FEBS Lett* **500**, 177-182.
- Takeuchi, M., Ueda, T., Sato, K., Abe, H., Nagata, T., and Nakano, A.** (2000). A dominant negative mutant of Sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J.* **23**, 517-525.
- Teng, F.Y., Wang, Y., and Tang, B.L.** (2001). The syntaxins. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3012.
- 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.
- Törmäkangas, K., Hadlington, J.L., Pimpl, P., Hillmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T.H., and Denecke, J.** (2001). A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **13**, 2021-2032.
- Townsley, F.M., Frigerio, G., and Pelham, H.R.** (1994). Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J Cell Biol* **127**, 21-28.

- 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.
- Tsui, M.M., Tai, W.C., and Banfield, D.K.** (2001). Selective formation of Sed5p-containing SNARE complexes is mediated by combinatorial binding interactions. *Mol Biol Cell* **12**, 521-538.
- Tyrrell, M., Campanoni, P., Sutter, J.U., Pratelli, R., Paneque, M., Sokolovski, S., and Blatt, M.R.** (2007). Selective targeting of plasma membrane and tonoplast traffic by inhibitory (dominant-negative) SNARE fragments. *Plant J* **51**, 1099-1115.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H.** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* **29**, 49-65.
- Ungermann, C., and Langosch, D.** (2005). Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* **118**, 3819-3828.
- Vale, R.D.** (2000) AAA proteins: lords of the ring. *J. Cell Biol.* **150**, F13– F19.
- Varlamov, O., Volchuk, A., Rahimian, V., Doege, C.A., Paumet, F., Eng, W.S., Arango, N., Parlati, F., Ravazzola, M., Orci, L., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (2004). i-SNAREs: inhibitory SNAREs that fine-tune the specificity of membrane fusion. *J Cell Biol* **164**, 79-88.
- Vitale, A., and Denecke, J.** (1999). The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**, 615-628.
- Vitale, A., and Hinz, G.** (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci* **10**, 316-323.
- Vitale, A., and Raikhel, N.V.** (1999). What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends Plant Sci* **4**, 149-155.
- Volchuk, A., Ravazzola, M., Perrelet, A., Eng, W.S., Di Liberto, M., Varlamov, O., Fukasawa, M., Engel, T., Sollner, T.H., Rothman, J.E., and Orci, L.** (2004). Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack. *Mol Biol Cell* **15**, 1506-1518.
- Walter, P., and Blobel, G.** (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**, 551-556.

- Wanker, E.E., Sun, Y., Savitz, A.J., and Meyer, D.I.** (1995). Functional characterization of the 180-kD ribosome receptor in vivo. *J. Cell Biol.* **130**, 29-39.
- Waters, M.G., Griff, I.C., and Rothman, J.E.** (1991). Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 615-620.
- Watson, R.T., and Pessin, J.E.** (2001). Transmembrane domain length determines intracellular membrane compartment localization of syntaxins 3, 4, and 5. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C215-223.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H., and Rothman, J.E.** (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.
- 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.
- Weimbs, T., Low, S.H., Chapin, S.J., Mostov, K.E., Bucher, P., and Hofmann, K.** (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3046-3051.
- Weinberger, A., Kamena, F., Kama, R., Spang, A., and Gerst, J.E.** (2005). Control of Golgi Morphology and Function by Sed5 t-SNARE Phosphorylation. *Mol Biol Cell* **16**, 4918-4930.
- Weissman, J., Plutner, H., and Balch, W.E.** (2001). The mammalian Sar1 exchange factor mSec12 is essential for endoplasmic reticulum export. *Traffic.* **2**, 465-475.
- Wessel, D., and Flugge, 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.
- West, A.E., Neve, R.L., and Buckley, K.M.** (1997). Targeting of the synaptic vesicle protein synaptobrevin in the axon of cultured hippocampal neurons: evidence for two distinct sorting steps. *J Cell Biol* **139**, 917-927.
- Williams, A.L., Ehm, S., Jacobson, N.C., Xu, D., and Hay, J.C.** (2004). rsly1 binding to syntaxin 5 is required for endoplasmic reticulum-to-Golgi transport but does not promote SNARE motif accessibility. *Mol Biol Cell* **15**, 162-175.
- Wink, M.** (1993). The plant vacuole: A multifunctional compartment. *J. Exp. Botany* **44**, 231-246.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., et al.** (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.

- Wood, S.A., Park, J.E., and Brown, W.J.** (1991). Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* **67**, 591-600.
- Wooding, S., and Pelham, H.R.** (1998). The dynamics of golgi protein traffic visualized in living yeast cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2667-2680.
- Woodman, P.G., Rodriguez, L., and Stirling, C.J.** (1996). Functional conservation of cytosolic proteins required for endosomal vesicle fusion. *Yeast* **12**, 1251-1262.
- Xu, Y., Zhang, F., Su, Z., McNew, J.A., and Shin, Y.K.** (2005). Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 417-422.
- Yamaguchi, T., Dulubova, I., Min, S.W., Chen, X., Rizo, J., and Sudhof, T.C.** (2002). Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif. *Dev Cell* **2**, 295-305.
- Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L.J., and Scheller, R.H.** (2000). nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J. Cell Biol.* **148**, 247–52.
- 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.
- Yano, D., Sato, M., Saito, C., Sato, M.H., Morita, M.T., and Tasaka, M.** (2003). A SNARE complex containing SGR3/AtVAM3 and ZIG/VTI11 in gravity-sensing cells is important for Arabidopsis shoot gravitropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8589-8594.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., and Schekman, R.** (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* **259**, 1466-1468.
- Zeng, Q., Tran, T.T., Tan, H.X., and Hong, W.** (2003). The cytoplasmic domain of Vamp4 and Vamp5 is responsible for their correct subcellular targeting: the N-terminal extension of Vamp4 contains a dominant autonomous targeting signal for the *trans*-Golgi network. *J Biol Chem* **278**, 23046-23054.
- Zerangue, N., Malan, M.J., Fried, S.R., Dazin, P.F., Jan, Y.N., Jan, L.Y., and Schwappach, B.** (2001). Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2431-2436.
- Zhang, T., Wong, S.H., Tang, B.L., Xu, Y., Peter, F., Subramaniam, V.N., and Hong, W.** (1997). The mammalian protein (rbet1) homologous to yeast Bet1p is primarily associated with the pre-Golgi intermediate compartment and is involved in vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **139**, 1157-1168.

- Zheng, H., Camacho, L., Wee, E., Batoko, H., Legen, J., et al.** (2005). A Rab-E GTPase mutant acts downstream of the Rab-D subclass in biosynthetic membrane traffic to the plasma membrane in tobacco leaf epidermis. *Plant Cell* **17**, 2020–36.
- Zheng, H.Y., von Mollard, G.F., Kovaleva, V., Stevens, T.H., Raikhel, N.V.** (1999). The plant vesicle associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell* **10**, 2251–64.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
α	Alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMS	Ammoniumpersulfat
α -Amylase	α -Amylase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BFA	Brefeldin A
BiP	immunoglobulin binding protein
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCV	Clathrin-coated Vesikel
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CFP	cyan fluorescent protein
COP	Hüllprotein (coat protein)
C-terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1-4-Dithiothreitol
DV	dense vesicle
E	Extinktion
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
EST	expressed sequence tag
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm

ξ_{\max}	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
h	Stunde
HA	
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hsc	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Min	Minute
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
ms	Millisekunde
MVB	Multivesikulärer Körper (multivesicular body)
NaCl	Natriumchlorid
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster, open reading frame
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PM	Plasmamembran
PM-ATPase	Plasmamembran-H ⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSV	Proteinspeichervakuole
PVC	Prävakuoläres Kompartiment (prevacuolar compartment)
RFP	rot fluoreszierendes Protein
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease

Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
S	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SI	Sekretionsindex
Sp	Spectinomycin
Sm	Streptomycin
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
ST	Sialyltransferase
SRP	signal recognition particle
TCA	Trichloressigsäure
TE	N-Tris-methyl-2-aminoethan-sulfonsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-SNARE	target SNAP-receptor
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheit (Unit)
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen (weight per volume)
Wt	Wildtyp
v-SNARE	vesicle SNAP-receptor
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

Symbole für Aminosäuren:

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

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

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

6.2. Sequenzen

6.2.1. LeBet1 (AW033981)

```

1  ATGAGTTATCGGAGGGATCATCGAGCCCATAGAGCTTCTCTCTTTGATAACTACGATAGT 60
   M S Y R R D H R A H R A S L F D N Y D S
61  ATTGAGGAAGGTGGTATAAGGGCTTCATCTTCCCTATCCCCGTGATCTTGATGAACGAGAC 120
   I E E G G I R A S S S Y P R D L D E R D
121 AATGACAAAGCTGTTGATAGCTTACAGGACAGAGTCAGCTTTTTAAAGAAATTAACAGGT 180
   N D K A V D S L Q D R V S F L K K L T G
181 GATATACATGAGGAGGTGGAGACCCACAACAAGATGCTAGACCGAATGGGGAATGAGATG 240
   D I H E E V E T H N K M L D R M G N E M
241 GATTTCATCTAGAGGAATCATGTGAGGAATGATGATCGGTTCAAGATGGTGTGTTGAGAAG 300
   D S S R G I M S G T M D R F K M V F E K
301 AAATCGAATCAGAAAGTGTGCAAACTTGTGGATACTTCGTACTTTCCCTTTTCCTAATA 360
   K S N Q K V C K L V G Y F V L S F F L I
361 TACTACATATTTAGGTTTCTCATGTATTTTCATGTATGGTTTGAGGGTCAGGATCACTAAG 420
   Y Y I F R F L M Y F M Y G L R V R I T K
421 ATTGTTTCATCCAAATTAG 438
   I V H P N *

```

6.2.2. LeSec22 (BG123258)

```

1  ATGGTGAAGTTGACTTTGATTGCTCGCGTGACTGATGGCCTTCCTTTAGCCGAGGGGCTG 60
   M V K L T L I A R V T D G L P L A E G L
61  GATGATGGTCGTGATGTTCAAAATGCAGATTTCTACAAACAGCAGGTCAAGGCCTTATTC 120
   D D G R D V Q N A D F Y K Q Q V K A L F
121 AAGAACCTGTGCGATGCGCCAAAATGACGCTTCAAGGATGTCTATTGAAACTGGACCTTAC 180
   K N L S M R Q N D A S R M S I E T G P Y
181 GTCTCCATATATCATTGAAGGCATGTTGTTATCTGACAATGTGTGATCGCTCTTAT 240
   V F H Y I I E G H V C Y L T M C D R S Y
241 CCCAAGAACTTGCCTTTCAATACCTGGAAGACCTTAAGAATGAGTTTGAGCGGCCAAT 300
   P K K L A F Q Y L E D L K N E F E R A N
301 GGGAGTCAAATTGAAACTGCTGCTAGACCATATGCTTTTATTAATTTGATAACATTCATA 360
   G S Q I E T A A R P Y A F I K F D T F I
361 CAGAAGACGAAGAACTGTACCAGGATACTAGAACTCAACGCAACATTTCTAAGTTGAAT 420
   Q K T K K L Y Q D T R T Q R N I S K L N
421 GATGAGCTTTACGAAGTTCATCAAATAATGACTCGAAATGTCAAGAAGTTCCTGGAGTT 480
   D E L Y E V H Q I M T R N V Q E V L G V
481 GGTGAAAAGTTGGACCAGGTCAAGTCAATGTCCAGCCGTTTGACATCTGAATCCCGGATA 540
   G E K L D Q V S Q M S S R L T S E S R I
541 TATGCTGATAAAGCAAAGACTTAAATCGTCAGGCTTTGATTCGAAAATGGGCTCCTGTT 600
   Y A D K A K D L N R Q A L I R K W A P V
601 GCTATTGTGCTTGGAGTTGTCATCTCTTCTTCTGGCTCAGAACAAGATCTGGTGA 657
   A I V L G V V I L F F W L R T K I W *

```

6.2.3. LeBos1 (BG130394)

```
1   ATGGCAACGGCGGTTGGGATCGGAGAAGGGAATTCGGTGCCGGGGGTGGAACCTTATCG 60
    M A T A V G I G E G N S G A G G G T L S
61  GAACTTTACCAAAGCTCGAGACGGCTCTTACTCAAGTCTCGAGATGGTTTGGAGAGGCTC 120
    E L Y Q S S R R L L L K S R D G L E R L
121 GAGCGTTTCGAGTACACTTCGTCGTCGTCCTTCATCTTCATTTTCGAGTGCTGCTGACA 180
    E R F E Y T S S S S S S S F S S A V V T
181 GATCCTTCAGAACAACCGTTTGATGCAGTAAGCAAGATATCGCTCAGATCCAGTCTCTT 240
    D P S E Q P F D A V R Q D I A Q I Q S L
241 TGCTCTAAGATGGAACCTTCTCTGGCGATCCATATCTGCCAAATCCCAGCGTGATCTCTGG 300
    C S K M E L L W R S I S A K S Q R D L W
301 AAAAGAAAAGTGGAAACAAGTGGCTGAAGAAGCTGACTCTTTGAAAGCCAGTCTGGATAAA 360
    K R K V E Q V A E E A D S L K A S L D K
361 TATAATTTAAGACATCAGCGACGTATGCAAGAAGCCCGGGAGAGAGCAGAACTGATTGGA 420
    Y N L R H Q R R M Q E A R E R A E L I G
421 AGAAGTAATGGTGATTCGTCCCATGTTCTGAGGATTTTGGATGACGAAGCACAGGCGATG 480
    R S N G D S S H V L R I F D D E A Q A M
481 CAATCTGCTCGTAATTCATCTAGAATAATGGAAGAAACCCTGGCAACAGGTGTGGCCATT 540
    Q S A R N S S R I M E E T L A T G V A I
541 CTATCCAAATATAGCGAGCAGAGGGATCGTTTGAAGAGAGCTCAACGTAAAGCACTGGAC 600
    L S K Y S E Q R D R L K R A Q R K A L D
601 GTGCTCAACACTTTGGGGCTTCAAATTTCTGTGATGAGAATCATTGAGAAGAGGAATCGC 660
    V L N T L G L S N S V M R I I E K R N R
661 GTTGATAGATGGATCAAGTATGCAGGATGGTCTTAACAATTGTGATTCTGTTTTTCATT 720
    V D R W I K Y A G M V L T I V I L F F I
721 TGGAGGTGGACAAGATGA 738
    W R W T R *
```

6.2.4. LeSed5 (AW222275)

```
1   ATGCCTGTGAAAAGTAGCAAGTGCCTCATTACGGGATCGGACTCAGGAGTTTCAGAGTATA 60
    M P V K V A S A S L R D R T Q E F Q S I
61  GCGGAGAGGTTAAAGAAGTCATTTTCGTCGGTTCAGAATGGGTCGATTAGCACCAGCACC 120
    A E R L K K S F S S V Q N G S I S T S T
121 AGCAGTGGTTCCTAGATCGGAGGAACAGAGGACCCTATTGCTATGCAATCGGAGTTCAAT 180
    S S G S R S E E Q R T T I A M Q S E F N
181 CGGCGAGCCTCCAAAATFGTTTTGGAATACATCAAACCTTCTCAGAAGCTTGCAAAGCTA 240
    R R A S K I G F G I H Q T S Q K L A K L
241 GCAAAGTTGGCAAAAAGGACTTCCGTTTTTGATGATCCGACTACGGAAATCCAAGAGTTG 300
    A K L A K R T S V F D D P T T E I Q E L
301 ACTGCAGTCATCAAGCAAGATATTACAGCACTTAACTCTGCTGTAGTAGATCTCCAGCTT 360
    T A V I K Q D I T A L N S A V V D L Q L
361 CACTCTAATGCTCGTAATGAAAGTGGAATAGTGATACTACTAGTCACTCGACGACTGTT 420
    H S N A R N E S G N S D T T S H S T T V
421 GTAGATGACTTGAAGAACAGGCTGATTACTGCCACAAAGGAGTTCAAAGAAGTACTCACC 480
    V D D L K N R L I T A T K E F K E V L T
481 ATGCGGACAGAGAATATGAAGGTTTCATGAGAACAGAAGACAGATGTTTTCTTCATCGACT 540
    M R T E N M K V H E N R R Q M F S S S T
541 AGCAAAGAAGCTTCAAATCCATTATGCGCCAACGTCCTACTAGCTTCAAGGAATACTGCT 600
    S K E A S N P F M R Q R P L A S R N T A
601 AGTACATCAGCCAGCCCTCCTCCTTGGGCTAATGATTACCTTCTTCTCTCAGTTATTT 660
    S T S A S P P P W A N D S P S S S Q L F
661 CCAAGGAAGCAAGGTGATGGAGACACACAGCCATTGTTGCAGGATCAACAACAACAGCAG 720
    P R K Q G D G D T Q P L L Q D Q Q Q Q Q
721 CAGCAGCAGATAGTTCCATTGCAAGACAGCTACATGCAGAGTAGAGCCGAAGCTCTACAA 780
    Q Q Q I V P L Q D S Y M Q S R A E A L Q
781 AATGTCGAGTCTACTATCCATGAGCTGGGCAGCATTTTAAATCAGCTTGCTACTTTGGTT 840
    N V E S T I H E L G S I F N Q L A T L V
841 TCTCAGCAAGGGGAGGTTGCAATCAGGATTGATGAGAACATGGACGACACACTAACAAAT 900
    S Q Q G E V A I R I D E N M D D T L T N
901 GTGGAAGGGGCACAAGGGGCTCTGCTCAAGTACCTCAATAGCATCTCGTCAAATCGGTGG 960
    V E G A Q G A L L K Y L N S I S S N R W
961 CTAATGATTAAGATATTTCTTTGTGTTGATTTTCTTCTTATGATTTTCTTATTTTCTGTG 1020
    L M I K I F F V L I F F L M I F L F F V
1021 GCATAG 1026
    A *
```