

**Untersuchungen zur Fettsäurezusammensetzung,
subzellulären Verteilung und Funktion
stressinduzierter Phosphoinositid-Pools
in Pflanzen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sabine König
aus Göttingen

Göttingen 2008

Referent: Prof. Dr. Ivo Feußner
Korreferent: Dr. Ingo Heilmann
Tag der Disputation : 30. April 2008

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1	Biosynthese von Phosphoglyceriden	5
1.2	Das PI-System.....	10
1.3	Enzyme des PI-Stoffwechsels.....	12
1.4	Regulation physiologischer Prozesse durch PIs	16
1.5	PIs im pflanzlichen Stoffwechsel und in der pflanzlichen Stressantwort.....	19
1.6	Verschiedene regulatorische Funktionen von PIs sind in distinkten Pools voneinander getrennt.....	21
1.7	Interaktionen von PIs mit Proteinen über spezifische Lipidbindungsdomänen.....	23
1.8	Aufbau und Regulation von PI-Pools	25
1.9	Zeitliche und räumliche Anordnung von PIs in eukaryotischen Zellen	27
1.10	Einfluß assoziierter Fettsäuren auf subzelluläre Verteilung und Funktion von PIs	29
1.11	Probleme der PI-Analytik	30
1.12	Zielsetzung.....	31
2.	Material und Methoden.....	33
2.1	Chemikalien	33
2.2	Filter und Membranen.....	34
2.3	Enzyme	34
2.4	Antiseren	35
2.5	Sequenzen, Plasmide, Vektoren und Bakterien	36
2.6	Bakterienmedium für <i>E. coli</i>	37
2.7	Verwendete Oligonukleotide	37
2.8	Pflanzenlinien	38
2.9	Stammlösungen für hydroponisches Medium	38
2.10	Stammlösungen für hydroponisch wachsende Pflanzen.....	39
2.11	Wachstumsbedingungen und Kultivierung von Pflanzen.....	40
2.12	Ernte der Pflanzen.....	41
2.13	Anreicherung subzellulärer Fraktionen.....	42
2.13.1	Mikrosomen und Plasmamembranen.....	43
2.13.2	Plasmamembranen und Detergenzien-unlösliche Membranen aus BY2- Zellen	45
2.13.3	Endoplasmatisches Retikulum	46
2.13.4	Zellkerne	47
2.13.5	Aktincytoskelett	48
2.13.6	Peroxisomen.....	49
2.13.7	Clathrin-beschichtete Vesikel (CCVs).....	50
2.14	Nachweis für Plasmamembrananreicherung durch Bindung von Concanavalin A.....	52
2.15	Nachweis für Zellkernanreicherung durch DAPI Färbung.....	52
2.16	Proteinbestimmung nach Bradford	52
2.17	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.18	Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen auf Nylonmembranen	54

2.19	Immundetektion spezifischer Proteine.....	56
2.20	Lipidanalytik	57
2.20.1	Spezifischer Kopfgruppennachweis für PtdIns(4,5)P ₂	57
2.20.2	Fettsäurebestimmung von PIs	57
2.20.3	Quantitative Extraktion anionischer Phospholipide durch saure Lipidextraktion.....	57
2.20.4	Trennung von Lipiden durch DC	58
2.20.5	Transmethylierung veresterter Fettsäuren mit Natriummethoxid.....	59
2.20.6	Gaschromatographische Analyse von Fettsäuregemischen	60
2.21	Analyse spezifischer Protein-Lipid-Interaktionen	60
2.22	Klonierung von cDNA-Fragmenten	61
2.22.1	Herstellung von DEPC-behandeltem ddH ₂ O.....	62
2.22.2	RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	62
2.22.3	Reverse Transkription	63
2.22.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	63
2.22.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	64
2.22.6	Restriktionsverdau von DNA.....	64
2.22.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	65
2.22.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	65
2.22.9	Klonierung mit dem Gateway System®	65
2.22.10	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	66
2.22.11	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	66
2.22.12	Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte in Einzelkolonien („Kolonie- PCR“).....	67
2.22.13	Vermehrung von <i>E. coli</i> -Zellen zur Plasmidisolierung („Minipräparation“)	67
2.22.14	DNA-Sequenzierung.....	68
2.23	Bestimmung spezifischer Transkriptmengen durch RNA-DNA- Hybridisierung („Northern Blot“).....	68
2.23.1	Denaturierende Elektrophorese von RNA in formaldehydhaltigen Agarosegelen.....	68
2.23.2	Amplifizierung von cDNA-Sonden für Hybridisierungsexperimente....	69
2.23.3	Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden.....	69
2.23.4	Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Nylonmembranen („Blot“)	70
2.23.5	RNA-DNA-Hybridisierung zur Detektion spezifischer Transkripte auf RNA-Blots	71
2.23.6	Visualisierung der spezifischen Hybridisierungssignale	71
2.24	Transiente Expression fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine in Zwiebelepidermiszellen (<i>Allium cepa</i>)	72
2.24.1	Vorbereitung von Goldpartikeln für die DNA-Präparation	72
2.24.2	DNA-Präzipitation auf Goldpartikel.....	72
2.24.3	Biolistische Transformation von Zwiebelzellen	73
2.25	Fluoreszenzmikroskopie	73
3.	Ergebnisse	74
3.1	Eine neue Methode zur direkten Quantifizierung und Charakterisierung von PI-Spezies über DC und GC	74
3.1.1	Bestimmung der Retentionsfaktoren (R _f -Werte)	75
3.1.2	Wiederfindungsrate.....	77

3.2	PI-Spezies und assoziierte Fettsäuren in <i>Arabidopsis</i> : PIs waren stärker gesättigt als PtdIns	78
3.3	Vergleich verschiedener subzellulärer Kompartimente von <i>Arabidopsis</i> -Blättern, <i>Arabidopsis</i> -Zellkulturen und Tabak-Zellkulturen (NT1)	79
3.4	Charakterisierung angereicherter subzellulärer Fraktionen über Lipidanalyse, Markertests und Immundetektion.....	79
3.5	Die Fettsäurezusammensetzung von PI-Spezies verschiedener Organellen ist ähnlich	84
3.6	Charakterisierung stressinduzierter PI-Spezies in <i>Arabidopsis</i> und anderen Organismen	87
3.6.1	Der PtdIns(4,5)P ₂ Gehalt in Pflanzenzellen steigt nach hyperosmotischem Stress an	88
3.7	Salzstressinduzierte PI-Spezies in <i>Arabidopsis</i> -Blättern haben eine charakteristische Fettsäurezusammensetzung.....	89
3.8	Globale Änderungen im Grad der Lipidsättigung nach hyperosmotischem Stress	93
3.9	Flux von Lipidintermediaten des PtdIns-Weges in InsP ₃ und DAG ist verstärkt in <i>InsP 5Ptase</i> -Pflanzen.....	100
3.10	Transkriptgehalte salzstressinduzierter Gene als Nachweis für das Überleben unter Stressbedingungen	104
3.11	Subzelluläre Lokalisierung der Salzstressinduzierten PI-Spezies in <i>Arabidopsis</i> -Blättern	106
3.11.1	Internalisierung von PtdIns(4,5)P ₂ von der Plasmamembran in Endomembranen	106
3.12	Keine Akkumulation von PtdIns(4,5)P ₂ in ER, Plastiden oder Zellkernen	109
3.13	Akkumulation von PtdIns(4,5)P ₂ in CCV-angereicherten Fraktionen	113
3.14	Anstieg der PtdCho- und PtdEtn-Gehalte in CCVs nach Salzstress.....	114
3.15	Clathrin akkumuliert nach Salzstress in CCVs.....	114
3.16	Kolokalisierung fluoreszenzmarkierter Reporter für PtdIns(4,5)P ₂ und Clathrin	120
3.17	Lipid und Fettsäurezusammensetzung Detergenzien-unlöslicher Membranen (DIMs) von Tabak BY2-Zellen	123
3.18	Lipidbindungseigenschaften der N-terminalen MORN-Domänen aus <i>Arabidopsis</i> -PIP-Kinasen.....	127
3.19	Vergleich der N-terminalen MORN-Domäne pflanzlicher PIP-Kinasen mit der MORN-Domäne von ARC3	129
4.	Diskussion.....	130
4.1	Charakterisierung pflanzlicher PIs durch direkte Analyse der Lipide.....	130
4.2	PIs werden in verschiedenen Pools gebildet.....	131
4.3	Stressinduzierte PIs haben eine charakteristische Fettsäurezusammensetzung	133
4.4	Assoziation stressinduzierter PIs mit CCVs	140
4.5	Mögliche physiologische Funktionen stressinduzierter PIs.....	146
5.	Schlusswort	150
6.	Zusammenfassung.....	151
7.	Literatur.....	152

8. Anhang.....	166
9. Abbildungsverzeichnis.....	168
10. Tabellenverzeichnis	171
11. Abkürzungsverzeichnis.....	172
12. Lebenslauf.....	176
13. Danksagung.....	178

1. Einleitung

Phospholipide und Membranen

Zellen sind von Membranen umschlossen. Membranen trennen auch verschiedene Kompartimente eukaryotischer Zellen voneinander. Als hochselektive Permeabilitätsschranken begrenzen Membranen den Austausch von Energie, Stoffwechselprodukten und Information zwischen Zellen, verschiedenen Kompartimenten und der Umgebung. Die Plasmamembran und intrazelluläre Membranen, wie die Thylakoidmembranen, die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums oder der Tonoplast erfüllen verschiedene Funktionen innerhalb einer Zelle. Ein kontrolliertes Zusammenspiel zwischen verschiedenen zellulären Membranen ist wichtig für einen geregelten Ablauf zellulärer Funktionen (Horton et al., 2006).

Membranen bestehen aus Lipiden

Membranen bestehen hauptsächlich aus einer Doppelschicht von Phospholipiden, in die Proteine oder Proteinkomplexe eingebettet sind. Außerdem lagern sich Proteine peripher an Membranen an. Die Grundstruktur zellulärer Membranen ist die Lipiddoppelschicht („Bilayer“, Abb. 1). Die beteiligten Lipide sind amphipatische Verbindungen, die eine polare Kopfgruppe und einen unpolaren Schwanz aus Fettsäureresten enthalten. Amphipatische Moleküle lagern sich in wässriger Umgebung so zusammen, dass die unpolaren Fettsäurereste im Inneren einer Doppelschicht liegen und die hydrophilen Gruppen außen. Durch ihre strukturellen Eigenschaften ist es Lipiden so möglich, in wässrigen Lösungen Lipiddoppelschichten zu bilden, die neben Biomembranen auch sphärische Strukturen beinhalten, die wässrige Hohlräume umschließen, sogenannte Vesikel (Somerville et al., 2000; Horton et al., 2006). Der unpolare Innenbereich von Membranen ist der Grund dafür, dass unpolare Substanzen passieren können, polare, wasserlösliche Moleküle hingegen nicht. Membranen stellen ein Hindernis für den freien Stofftransport dar. Abhängig von ihrer Größe, Polarität und Ladung benötigen viele Stoffe aktive Transportmechanismen, um Membranbarrieren zu überwinden. Die Lipidzusammensetzung einer Membran definiert ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften. Die so definierten physikalischen Eigenschaften verschiedener biologischer Membranen können sich unterscheiden und ändern sich mit der Entwicklung einer Zelle und deren Teilung (Somerville et al., 2000).

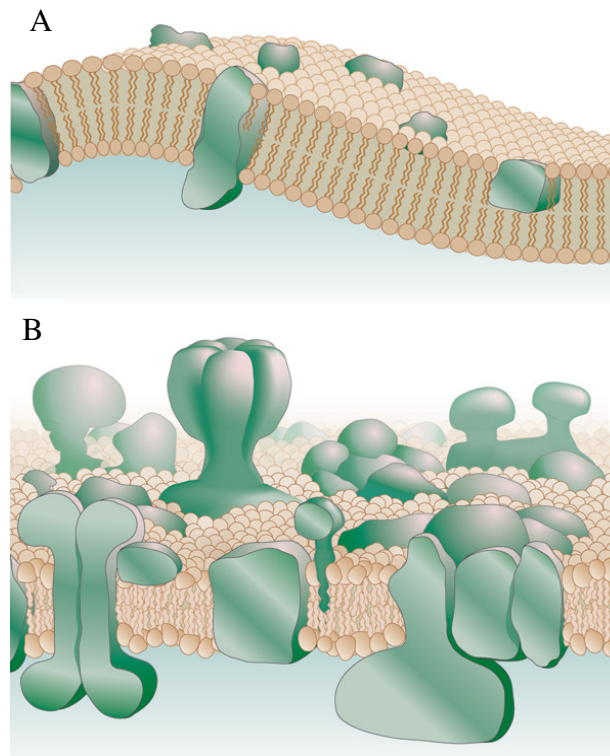


Abbildung 1: Schematische Darstellung zellulärer Membranen. A, Das „Fluidmosaic“ Modell (Singer und Nicholson, 1972). B, Überarbeitetes Modell (Engelman, 2005). Die Phospholipide sind als Doppelschicht (rot) angeordnet, in die Proteine (grün) integriert oder peripher eingelagert sein können. Verschiedene Arten der Membranassoziation von Proteinen sind denkbar, angedeutet durch verschiedene grüne Formen. Membranen können aus verschiedenen Lipidgemischen bestehen, in B angedeutet durch unterschiedlich geformte rote Kopfgruppen.

Membranbildende Lipide

Es gibt drei Hauptgruppen membranbildender Lipide: Phosphoglyceride, Glykolipide und Sphingolipide (Somerville et al., 2000; Horton et al., 2006). Phosphoglyceride sind ein Hauptbestandteil der Membranen vor allem tierischer Organismen (Cullis et al., 1986). Die Thylakoidmembranen pflanzlicher Plastiden bestehen vor allem aus Glykolipiden und stellen somit eine Ausnahme dar (Ohlrogge und Browse, 1995). Die Phosphoglyceride leiten sich von Glycerin ab und bestehen aus einem Glycerinrückgrat, zwei Fettsäuren und einem phosphorylierten Alkohol. Das einfachste Phosphoglycerid ist das Diacylglycerin-3-phosphat, oder Phosphatidsäure (PtdOH). Die wichtigsten Phosphoglyceride sind Derivate von PtdOH und entstehen durch Veresterung der Phosphorylgruppe mit der Hydroxylgruppe eines mehrerer möglicher Alkohole, wie weiter unten noch detaillierter beschrieben wird. Gewöhnlich ist die Alkoholkomponente in Phosphoglyceriden entweder Serin, Ethanolamin, Cholin, Glycerin oder Inositol (Ohlrogge und Browse, 1995), wie in Abb. 2 dargestellt.

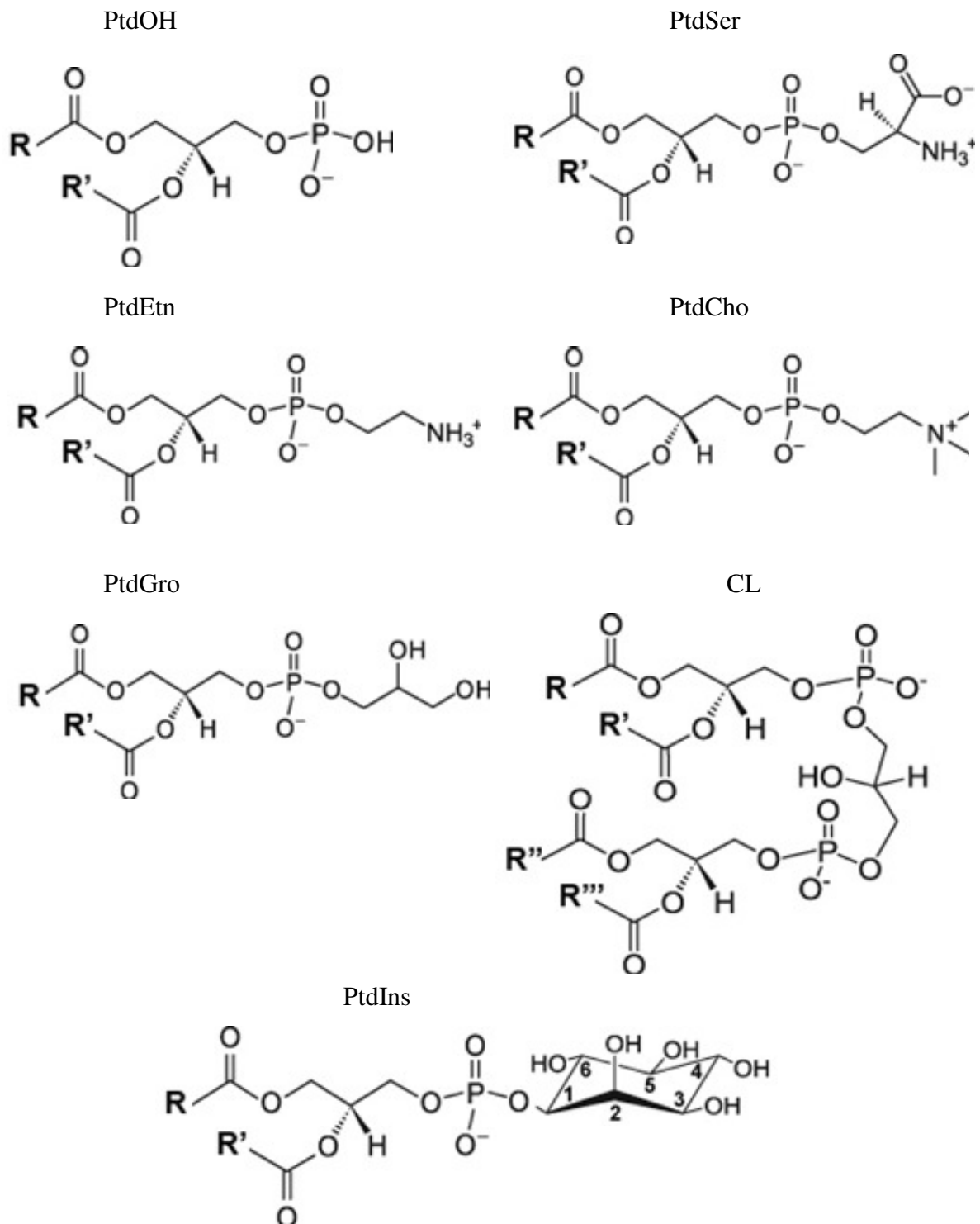


Abbildung 2: Strukturen wichtiger Phosphoglyceride. CL, Cardiolipin; PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdGro, Phosphatidylglycerol; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdOH, Phosphatidsäure; PtdSer, Phosphatidylserin. R, Fettsäurereste. Quelle der Abbildung: <http://www.avantilipids.com>

Glykolipide

Glykolipide sind Membranlipide, bei denen Mono- oder Oligosaccharide die hydrophilen Kopfgruppen bilden (Curatolo, 1987). Die hydrophilen Kopfgruppen der Glykolipide bedingen eine weniger ausgeprägte Polarität der Lipide als bei Phosphoglyceriden. Die Glykolipide pflanzlicher Thylakoidmembranen besitzen wie Phosphoglyceride ein Glycerinrückgrat, an das zwei Fettsäuren verestert sind, und das als Kopfgruppe einen oder mehrere Galaktosereste tragen kann. Hauptvertreter dieser Gruppe sind Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG).

Sphingolipide

Sphingolipide, die dritte große Gruppe der Membranlipide, haben ebenfalls eine polare Kopfgruppe und zwei unpolare Gruppen, enthalten jedoch im Gegensatz zu den Phosphoglyceriden oder plastidären Glykolipiden kein Glycerin (Sperling und Heinz, 2003). Das Grundgerüst der Sphingolipide besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin oder einem seiner Derivate, wie z.B. Phytosphingosin. An das Sphingosin kann über eine Amidbindung eine langkettige Fettsäure gebunden sein. Als Kopfgruppe fungieren Phosphocholin oder Mono- und Oligosaccharide. Ganglioside sind Membranlipide von Eukaryotenzellen, bei denen die polare Kopfgruppe, die die äußere Oberfläche der Membran bildet, aus einem komplexen Oligosaccharid besteht, das Sialinsäure und andere Monosaccharidreste enthalten kann.

Lipide können Signale, Cofaktoren und Pigmente sein

Außer den membranbildenden Lipiden werden alle anderen Moleküle als Lipide bezeichnet, die in unpolaren Substanzen löslich sind, wie z.B. in Chloroform (CHCl_3) oder Hexan (van Meer, 2005). Neben Membranlipiden kommen auch andere Klassen von Lipiden vor. Wichtig sind vor allem Speicherlipide (Fette/Öle), Pigmente, lipophile Botenstoffe, oder Cofaktoren enzymatischer Reaktionen. Lipide umfassen eine Vielzahl von fettsäureabgeleiteten Bestandteilen, aber auch sekundäre Bestandteile ohne direkten Bezug zum Fettsäurestoffwechsel. Unterschiedliche Pflanzenspezies können verschiedene Lipide enthalten, und auch die Lipidzusammensetzungen verschiedener Pflanzenorgane können sich beträchtlich unterscheiden (Somerville et al., 2000), wie in Abb. 3 dargestellt. In spezialisierten Zelltypen können einzelne Lipidtypen in sehr

unterschiedlichen Proportionen vorliegen. Abbildung 3 zeigt die Unterschiede der Lipidzusammensetzung von *Arabidopsis*-Blättern im Vergleich zu Wurzeln.

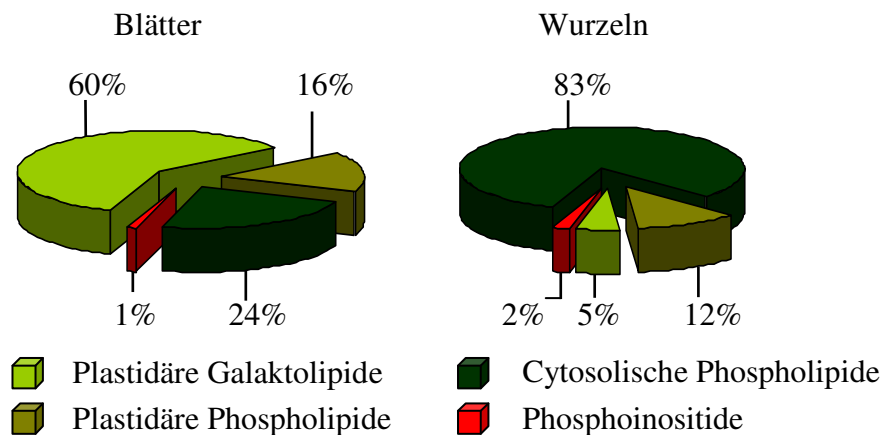


Abbildung 3: Glycerolipidzusammensetzung verschiedener pflanzlicher Gewebe. Glycerolipide leiten sich von Glycerin ab und sind amphiphile Moleküle. In der Pflanze variiert die Glycerolipidzusammensetzung nach Art und Funktion der Zelle und zwischen verschiedenen Geweben. So dominieren in Blättern die Galaktolipide der Chloroplastenmembranen, während in Wurzeln die meisten Membranen im Endoplasmatischen Retikulum vorliegen, so dass cytosolische Phospholipide in den Wurzelzellen überwiegen (Somerville et al., 2000).

1.1 Biosynthese von Phosphoglyceriden

Zu den Strukturlipiden eukaryotischer Membranen zählen die Membranlipide Phosphatidylethanolamin (PtdEtn), Phosphatidylcholin (PtdCho), Phosphatidylserin (PtdSer) und Phosphatidylinositol (PtdIns). Eukaryotische Zellen synthetisieren diese Phosphoglyceride hauptsächlich an der Oberfläche des glatten Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Ohlrogge und Browse, 1995). Lipide werden außerdem in Plastiden und Mitochondrien synthetisiert. Einige Phosphoglyceride verbleiben am Ort ihrer Synthese, andere werden zu anderen Orten in der Zelle transportiert (Ohlrogge und Browse, 1995).

Die Glycerolipidbildung beginnt mit der Synthese der hydrophoben Gruppen, also der Fettsäuren. In Pflanzen findet die Neusynthese von Fettsäuren durch die Fettsäuresynthese (FAS) in den Plastiden statt. Ausgangspunkt der Fettsäuresynthese ist Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), das unter Verbrauch von ATP von einer Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA carboxyliert wird. Anschließend wird das CoA durch das Acyl-Trägerprotein (ACP) ausgetauscht. Es folgt eine Kondensation von Acetyl-CoA an Malonyl-ACP. Das gebildete Acetoacetat bleibt als Thioester an ACP gebunden und

kann zu β -D-Hydroxyacyl-ACP reduziert werden. Wasserabspaltung und eine Reduktion zu Acyl-ACP verlängern das Produkt um zwei Kohlenstoffatome. Die Kettenverlängerung erfolgt so iterativ bis zur Bildung von 16:0-ACP und, hauptsächlich, 18:0-ACP. In Pflanzen führen plastidäre lösliche Desaturasen die ersten Doppelbindungen noch am Acyl-ACP ein, bevor die Umesterung des Acyl-Restes auf Glycerin erfolgt. Alle weiteren Desaturierungsschritte erfolgen dann direkt am Lipid (Ohlrogge und Browse, 1995).

Synthese von Glycerolipiden

Glycerin-3-phosphat ist das Ausgangssubstrat für die Synthese aller Glycerolipide. Acyl-ACP wird bei der plastidären Lipidsynthese direkt auf Glycerin-3-phosphat übertragen. Bei der ersten Acylierung findet meist eine Übertragung eines 18:1 Δ^9 -Acylrestes an Position *sn*-1 statt, an Position *sn*-2 wird meist ein 16:0-Acylrest übertragen. Membrangebundene Fettsäuresaturasen der Plastiden führen weitere Doppelbindungen in die lipidgebundenen Fettsäuren ein. Dieser Glycerolipidsyntheseweg in den Plastiden wird als prokaryotischer Weg bezeichnet. Während nur ein Teil der gebildeten Fettsäuren im prokaryotischen Weg verbleibt, wird ein Großteil der im Plastiden gebildeten Fettsäuren ins Cytosol exportiert und dabei auf CoA umgeestert. Bei der Glycerolipidsynthese an den ER-Membranen werden Acylreste von Acyl-CoA auf Glycerin-3-phosphat übertragen. Membrangebundene Desaturasen im ER führen dann bis zu drei Doppelbindungen in die lipidgebundenen Fettsäuren ein. Den Syntheseweg in den ER-Membranen bezeichnet man als eukaryotischen Weg. Das Primärprodukt der Glycerolipidsynthese ist PtdOH, das strukturell einfachste Phosphoglycerolipid darstellt (Abb. 2), aus dem alle anderen Glycerolipide hergestellt werden können (Ohlrogge und Browse, 1995).

Die Biosynthese weiterer Phosphoglyceride beginnt mit der Bildung von Cytidindiphosphatdiacylglycerin (CDP-DAG) aus PtdOH und Cytidintriphosphat (CTP). Die aktivierte Phosphatidyleinheit des CDP-DAGs reagiert dann mit der Hydroxylgruppe eines polaren Alkohols. Im Falle von Serin entstehen so PtdSer und Cytidinmonophosphat (CMP). PtdIns und PtdGro entstehen durch analoge Übertragung eines Phosphatidylrestes von CDP-DAG auf Inositol bzw. Glycerin (Ohlrogge und Browse, 1995).

Cholin und Ethanolamin werden von spezifischen Kinasen phosphoryliert und anschließend über Cytidyltransferasen durch die Reaktion von CTP zu CDP-Cholin und

CDP-Ethanolamin umgesetzt. Die Bildung von PtdCho und PtdEtn erfolgt also durch die Übertragung aktivierter Kopfgruppen auf DAG. Die Hauptreaktionen des Phosphoglyceridstoffwechsels sind in Abbildung 4 zusammengefasst. Die Synthese von Cardiolipin in Mitochondrien erfolgt durch die Übertragung eines Phosphatidylrestes von CDP-DAG auf PtdGro (Schlame et al., 2000).

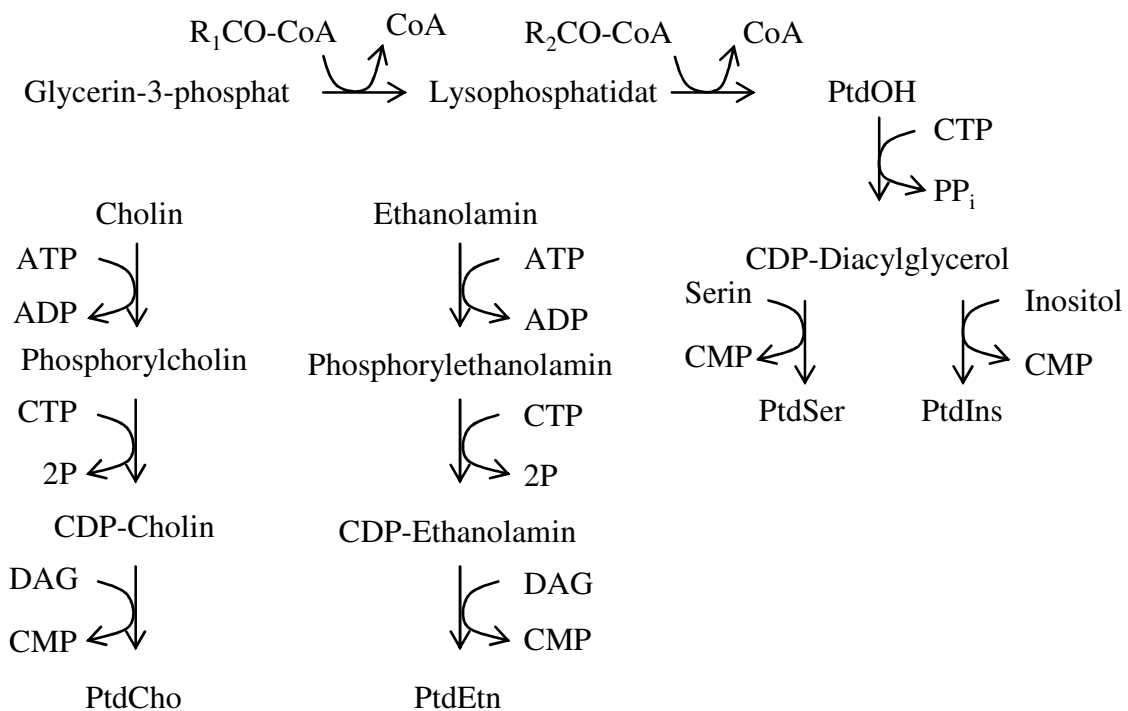


Abbildung 4: Hauptreaktionen des Phosphoglyceridstoffwechsels. Glycerin-3-phosphat ist das Ausgangssubstrat der Glycerolipidsynthese. Acylreste werden dabei auf Glycerin-3-phosphat übertragen. Das Primärprodukt der Glycerolipidsynthese ist PtdOH. Weitere Phosphoglyceride werden aus CDP-DAG und PtdOH gebildet. Die aktivierte Phosphatidyleinheit des DAGs reagiert mit Serin oder Inositol zu PtdSer oder PtdIns. Cholin und Ethanolamin werden von spezifischen Kinasen phosphoryliert. Die Bildung von PtdCho und PtdEtn erfolgt durch die Übertragung aktivierter Kopfgruppen auf DAG. ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriphosphat; CMP, Cytidinmonophosphat; CoA, Coenzym A; CTP, Cytidintriphosphat; DAG, Diacylglycerol; PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdOH, Phosphatidsäure; PP_i , anorganisches Phosphat.

Regulatorische Lipide

Neben strukturgebenden Phospholipiden, die den Großteil des Membrankörpers ausmachen, gibt es auch Phospholipide von geringerer Verbreitung, die regulatorische Aufgaben in der Zelle wahrnehmen (Munnik et al., 1998). Die inositolhaltigen Phospholipide, auch „Phosphoinositide“ (PIs), sind ein klassisches Beispiel für regulatorische Lipide und gehören zur Gruppe der Phosphoglyceride (Stevenson et al.,

2000; Balla, 2006). PIs leiten sich von PtdIns ab. Der Inositolring bildet die Grundstruktur der polaren Kopfgruppe und kann an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierungen an den Positionen 3, 4 und 5 können verschiedene Derivate entstehen, die jeweils regulatorische Aufgaben in der Zelle übernehmen (Abb. 5). Die Positionen 2 und 6 der Lipidkopfgruppe sind sterisch nicht für eine Phosphorylierung zugänglich. Sieben Varianten der PIs sind bekannt, die vorwiegend auf der cytosolischen Seite zellulärer Membranen lokalisiert sind. PIs machen nur etwa 1-3 % der gesamten Phospholipide aus (Stevenson et al., 2000; Balla, 2006) (vgl. Abb. 3).

Die Phosphatidylinositolmonophosphate (PtdIns3P, PtdIns4P und PtdIns5P), Phosphatidylinositolbisphosphate (PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4,5)P₂) und das Phosphatidylinositoltriphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) werden aufgrund ihrer Phosphorylierungsstellen an der Inositolkopfgruppe benannt. Die überwiegende Zahl der Studien zum PI-Stoffwechsel eukaryotischer Zellen unterscheidet keine molekularen Spezies anhand der Fettsäurezusammensetzung. Mit Ausnahme von PtdIns(3,4,5)P₃ kommen alle denkbaren PIs auch in Pflanzen vor (Munnik et al., 1998; Stevenson et al., 2000). Die komplexen Beziehungen und Funktionen von PIs sollen in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

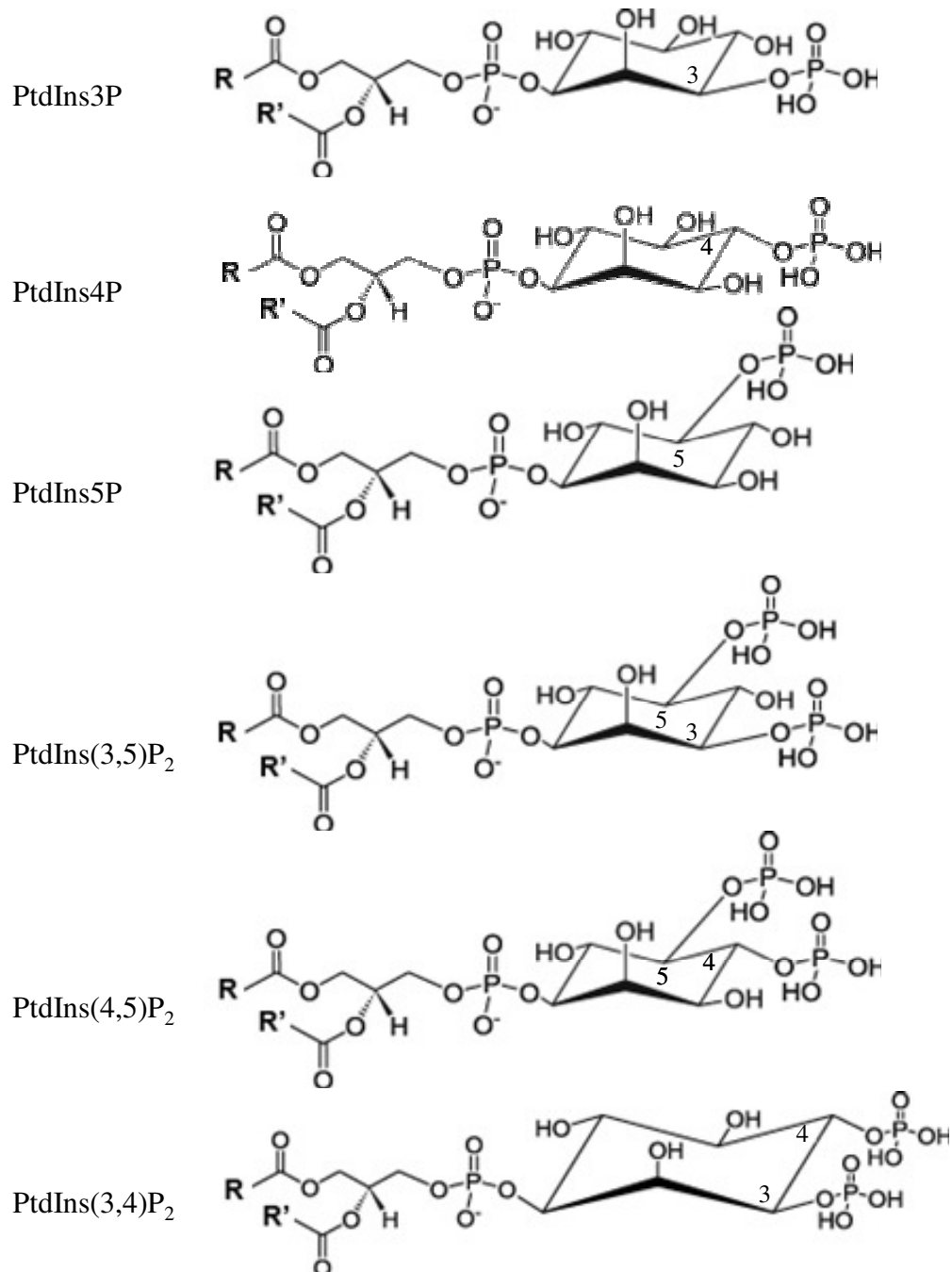


Abbildung 5: Strukturen pflanzlicher PIs. PIs bestehen aus einem Glycerinrückgrat, das mit verschiedenen Fettsäuren verestert ist, zudem besitzen sie alle eine Inositolkopfgruppe, die an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden kann. PtdIns3P, Phosphatidylinositol-3-phosphat; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns5P, Phosphatidylinositol-5-phosphat; PtdIns(3,5)P₂, Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdIns(3,4)P₂, Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat. Quelle der Strukturen: <http://www.avantilipids.com>

1.2 Das PI-System

Der PI-Stoffwechselweg ist in der Evolution eukaryotischer Organismen konserviert. Neben den membrangebundenen PIs schließen sich auch eine Vielzahl löslicher Inositolphosphate mit großteils unbekannter Funktion an. Die Funktionsvielfalt der PIs scheint mit der Stereospezifität der sechs Hydroxylgruppen am Inositolring zusammenzuhängen, die mehrfach und in verschiedenen Kombinationen phosphoryliert vorkommen können. Durch ihre spezielle Struktur können PIs sowohl hydrophobe als auch hydrophile Milieus durchdringen (Munnik et al., 1998; Stevenson et al., 2000).

PtdIns3P

PtdIns3P wurde eine Rolle bei der Regulation der Transkription im Kern zugeschrieben (Bunney et al., 2000). In Hefe wurde PtdIns3P ausserdem eine entscheidende Rolle im Vesikeltransport zugeordnet (Schu et al., 1993; Stack et al., 1993). Ein wichtiger Schritt im Beginn der Endocytose in Hefe, Tieren und pflanzlichen Zellen ist eine Aktivierung der PI3P-Synthese (Simonsen et al., 2001). In *Arabidopsis* Wurzelzellen ist die Aktivierung der PtdIns3P-Synthese mit der schnellen Internalisierung von Membranen nach hyperosmotischem Stress korreliert worden (Leshem et al., 2007).

PtdIns4P

PtdIns4P ist wichtig für den Vesikelfluss vom ER zum Golgi-Apparat und zur Plasmamembran und somit für die Membranentstehung. In einer Hefemutante, die einen Defekt in der PtdIns 4-Kinase hat (Yoshida et al., 1994), konnte gezeigt werden, dass kein Transport von PtdSer vom ER weiter zum Golgi stattfinden kann (Stack et al., 1993; Voelker, 2005). Außerdem ist PtdIns4P ein wichtiger Vorläufer für PtdIns(4,5)P₂, das durch weitere Phosphorylierung entsteht (Stevenson et al., 2000). PtdIns4P-Bildung ist notwendig für die Vesikelbildung und die Regulation der Exocytose in synaptischen Vesikeln von Nervenzellen (Wenk und De Camilli, 2004).

PtdIns5P

Obwohl PtdIns5P in verschiedenen Organismen nachgewiesen wurde, ist bislang keine physiologische Funktion dieses Lipids beschrieben (Meijer et al., 2001; Pettitt et al., 2006).

PtdIns(4,5)P₂

Das am besten untersuchte PI ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) (Chen et al., 1991; Munnik et al., 1998; Stevenson et al., 2000; Cremona und De Camilli, 2001; Santarius et al., 2006). PtdIns(4,5)P₂ entsteht durch die zweifache Phosphorylierung von PtdIns an den Positionen vier und fünf des Inositolrings (Stevenson et al., 2000). PtdIns(4,5)P₂ dient in eukaryotischen Zellen nicht nur als Substrat der Phospholipase C (PLC) sondern auch als eigenständiges Signalmolekül und ist an verschiedenen biologischen und regulatorischen Prozessen beteiligt (Munnik et al., 1998; Stevenson et al., 2000). Die Funktion von PtdIns(4,5)P₂ im tierischen Modell ist deutlich besser untersucht als seine Funktion in Pflanzen. Aus der Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ durch PLC gehen zwei wichtige Botenstoffe (*second messengers*) hervor, Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Berridge, 1983; Berridge und Irvine, 1984; Balla, 2006). InsP₃ bewirkt die Ausschüttung von Calcium (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern (Drobak und Ferguson, 1985; Alexandre und Lassalles, 1990; Berridge, 1993). Im Tiermodell ist DAG an der Regulation der Proteinkinase C beteiligt (Amadio et al., 2006), die in Pflanzenzellen aber fehlt (Munnik et al., 1998). Das intakte PtdIns(4,5)P₂-Lipid ist als Ligand an der Regulation pflanzlicher und tierischer Ionenkanäle und ATPasen beteiligt (Varsanyi et al., 1983; Memon et al., 1989; Memon und Boss, 1990; Starling et al., 1995). Im pflanzlichen Modell wurde die Regulation von Kaliumkanälen beschrieben (Liu et al., 2005). Im tierischen Modell konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Ansammlung von PtdIns(4,5)P₂ während der Zellteilung stattfindet (Martelli et al., 2002). In *Arabidopsis* wird angenommen, dass PtdIns(4,5)P₂ während der Zellteilung an der Zellplatte lokalisiert. Eine weitere Funktion von PtdIns(4,5)P₂ ist die Regulation des Aktincytoskeletts (Lassing und Lindberg, 1985; Shibasaki et al., 1997; Staiger et al., 1997; Raucher et al., 2000; Caroni, 2001; Doughman et al., 2003; Hilpela et al., 2004). PtdIns(4,5)P₂ interagiert mit einigen aktinbindenden Proteinen, wie z.B. Profilin, Gelsolin, α -Aktinin oder Cofilin (Staiger et al., 1997) und reguliert dadurch ihre Funktionen. Zusätzlich gibt es verschiedene Proteine die spezifische PtdIns(4,5)P₂-Bindungsstellen besitzen. Ein bekanntes Beispiel sind Proteine, die eine Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne besitzen (Lemmon et al., 2002; Lemmon, 2003). Eine wichtige Rolle spielt PtdIns(4,5)P₂ auch bei der Vesikelbildung und bei der Endocytose (Toker, 1998).

PtdIns(3,5)P₂

Das isomere PtdIns(3,5)P₂ spielt in machen Eukaryoten wahrscheinlich eine Rolle bei der Antwort auf hyperosmotischen Stress (Dove et al., 1997). Die genaue Funktion ist aber bislang ungeklärt.

PtdIns(3,4)P₂

Über physiologische Effekte von PtdIns(3,4)P₂ ist in Pflanzen bislang nichts bekannt.

PtdIns(3,4,5)P₃

Das aus tierischen Organismen bekannte Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) wurde bislang in Pflanzen nicht detektiert und soll an dieser Stelle daher nicht im Detail beschrieben werden.

1.3 Enzyme des PI-Stoffwechsels**PI-Bildung und -Transport**

Der Vorläufer aller PIs ist PtdIns, das im ER durch das Enzym Phosphatidylinositolsynthase (PI-Synthase) gebildet wird (Ohlrogge und Browse, 1995; Justin et al., 2002). PtdIns wird durch einen bislang unbekanntem Mechanismus an verschiedene zelluläre Orte transportiert. Mögliche Mechanismen sind zielgerichteter Transport durch Vesikelfluss oder eine Verteilung durch Lipidtransferproteine (Vincent et al., 2005; Phillips et al., 2006).

In verschiedenen zellulären Membranen sind spezifische PI-Kinasen und PIP-Kinasen lokalisiert, die PtdIns in seine phosphorylierten Derivate, wie z.B. PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂, umsetzen (Stevenson et al., 2000; Doughman et al., 2003). Die phosphorylierten Formen des PtdIns werden als Polyphosphoinositide bezeichnet. Die beschriebenen Möglichkeiten der enzymatischen Umsetzung von PIs sind in Abb. 6 dargestellt.

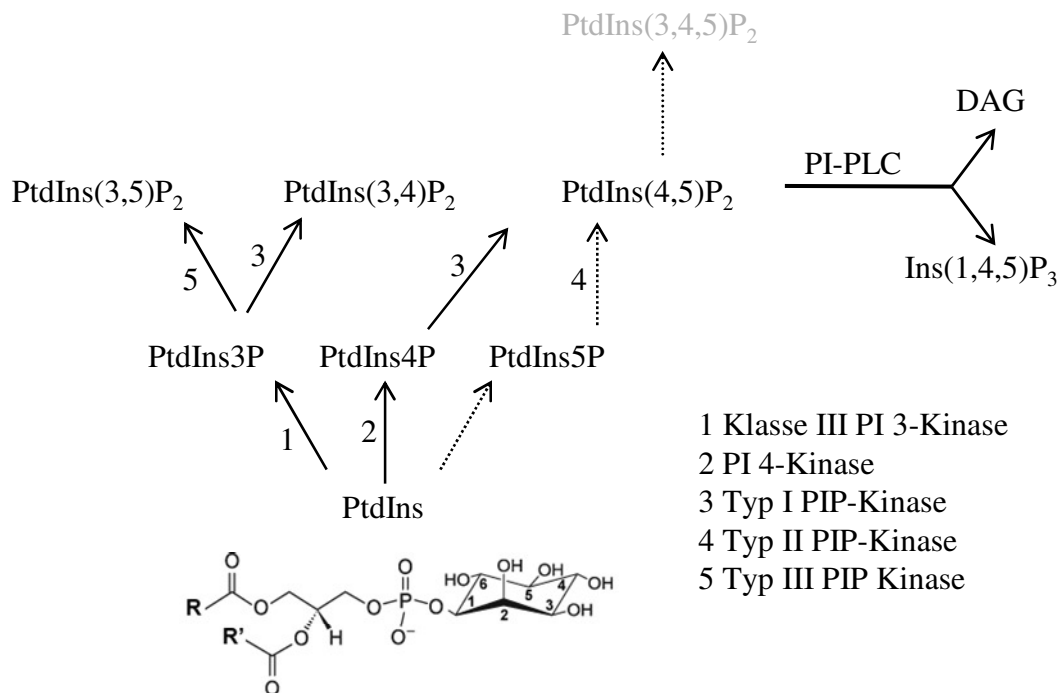


Abbildung 6: Biosynthese von PIs. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der Synthese von PIs und die Lipidkinasen, die diese Reaktionen katalysieren. PtdIns(4,5)P₂ wird durch Typ I aus PtdIns4P gebildet. In Pflanzen nicht bekannt sind die Typ II PIP-Kinasen die aus PtdIns5P PtdIns(4,5)P₂ bilden. PtdIns5P ist in Pflanzen nachgewiesen worden, aber seine Biosynthese ist bislang unklar. PtdIns(3,4,5)P₃ (grau) konnte bislang nicht in Pflanzen nachgewiesen werden. Pflanzen besitzen keine Kinasen, die PtdIns4P zu PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ phosphorylieren können (nach Mueller-Roeber und Pical, 2002). Gestrichelte Pfeile stellen Reaktionen dar, die in Pflanzen nicht vorkommen. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns3P, Phosphatidylinositol-3-phosphat; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns5P, Phosphatidylinositol-5-phosphat; PtdIns(3,5)P₂, Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdIns(3,4)P₂, Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat.

PI 4-Kinasen

PI 4-Kinasen assoziieren peripher mit Membranen und katalysieren die Phosphorylierung von PtdIns zu PtdIns4P. PI 4-Kinasen wurden in verschiedenen Spezies gefunden; in löslichen Fraktionen der halophilen Alge *Dunaliella salina* (Einspahr et al., 1988¹; Einspahr et al., 1988²) und *Daucus carota* (Karotte) (Okpodu et al., 1995), in Plasmamembranen von *Catharanthus roseus* (Madagaskar-Immergrün) (Heim und Wagner, 1986), in *Spinacia oleracea* (Spinat) (Westergren et al., 1999) und in verschiedenen zellulären Kompartimenten von *Arabidopsis* (Stevenson et al., 1998; Xue et al., 1999). Im Genom von *Arabidopsis* sind zwei Typen von PtdIns 4-Kinasen bekannt, Typ II beinhaltet die PI 4-Kinasen der Unterfamilie γ und Typ III die PI 4-Kinasen der Unterfamilie α und β , die sich in der Größe und Sensitivität gegenüber Detergenzien und Adenosin unterscheiden (Mueller-Roeber und Pical, 2002).

Unterfamilie α

Mitglieder der Unterfamilie α besitzen eine Größe von 60-200 kDa und zeichnen sich durch eine PH-Domäne aus, die zwischen einer helikalen und einer katalytischen Domäne liegt. Wird die PH-Domäne in Bakterien exprimiert, bindet das rekombinante Proteinmodul *in vitro* PtdOH, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ (Stevenson et al., 1998).

Unterfamilie β

PI 4-Kinasen der Unterfamilie β besitzen eine Größe von 120 kDa (Xue et al., 1999). Verschiedene Domänen sind innerhalb dieser Proteine konserviert, am C-terminalen Ende des Proteins liegt eine katalytische Domäne mit 230 Aminosäureresten, hinzu kommt eine helikale Domäne, die in ihrer Ausprägung zwischen verschiedenen Isoformen variieren kann (Xue et al., 1999).

Unterfamilie γ

In *Arabidopsis* konnten acht Gene für weitere mögliche PI 4-Kinase Isoformen einer γ -Unterfamilie gefunden werden, die Sequenzähnlichkeiten zur menschlichen PI 4-Kinase Typ II Isoform α aufweisen (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Für keines der kodierten Genprodukte wurde allerdings bisher katalytische Aktivität gezeigt (Dr. Rafaelo Galvao, persönliche Mitteilung).

PI 3-Kinasen

PI 3-Kinasen wurden in Verbindung mit der Regulation der Transkription in Zellen von Karotten-Suspensionskulturen beschrieben (Bunney et al., 2000). Sowohl PI 3- als auch PI 4-Kinase-Aktivität wurde ausserdem in isolierten plastidären Hüllmembranen gefunden (Bovet et al., 2001). In Pflanzen wurde eine PI 3-Kinase-Aktivität mit der Knöllchenbildung während der Stickstofffixierung in Verbindung gebracht (Drobak et al., 1999).

Alle PI 3-Kinasen besitzen drei konservierte Domänen, eine katalytische Domäne, eine helikale Domäne und eine C2 Domäne, die als Ca²⁺-abhängige oder unabhängige Lipidbindungsdomäne bezeichnet wird (Rizo und Sudhof, 1998). PI 3-Kinasen werden in drei Klassen eingeteilt (Mueller-Roeber und Pical, 2002). In tierischen Organismen vorkommende PI 3-Kinasen der Klassen I und II unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität und die Fähigkeit, auch PtdIns-Mono- oder Bisphosphate zu phosphorylieren (Mueller-Roeber und Pical, 2002). In Pflanzen ist nur die Klasse III

der PI 3-Kinasen bekannt, die ausschließlich PtdIns phosphorylieren kann und mit vakuolären Transportprozessen, Zellvermehrung und Regulation des Aktincytoskeletts in Verbindung steht (Meijer und Munnik, 2003). Die Klasse III der PI 3-Kinasen beinhaltet in *Arabidopsis* nur eine identifizierte PI 3-Kinase (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Das Enzym scheint eine evolutionär-ursprüngliche Form der PI 3-Kinasen darzustellen (Heilmann et al., 2000).

PIP-Kinasen

Die Synthese von PtdInsP₂-Isomeren aus PtdInsP wird durch PIP-Kinasen katalysiert. Diese Enzyme bilden eine Familie von Lipidkinasen, die in 3 Klassen (Typ I bis III) eingeteilt wird. Die Einteilung in die Klassen erfolgt dabei nach der Substratspezifität (Hinchliffe et al., 1998; Mueller-Roeber und Pical, 2002).

Typ I

Typ I-Enzyme sind die PI4P 5-Kinasen, deren Hauptaktivität die Phosphorylierung von PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P₂ ist (Mueller-Roeber und Pical, 2002). In geringerem Maße wird auch PtdIns3P zu PtdIns(3,4)P₂ umgesetzt. Die katalytische Domäne der PIP-Kinasen ist hoch konserviert, besitzt aber eine variable Region, die in allen Mitgliedern der PIP-Kinasen der Typen I und II vorkommt. Die variablen Regionen pflanzlicher Enzyme sind deutlich länger als nicht-pflanzlicher Enzyme, und ihre Funktion ist bislang unklar. Anhand ihrer unterschiedlichen Domänstrukturen werden Typ I PIP-Kinasen in die Unterfamilien A und B eingeteilt (Mueller-Roeber und Pical, 2002).

Arabidopsis PIP-Kinasen der Unterfamilie A besitzen eine katalytische Domäne und eine Dimerisierungsdomäne. Die PIP-Kinasen der Unterfamilie B enthalten ebenfalls die konservierte katalytische Domäne und eine Dimerisierungsdomäne, haben aber desweiteren eine dritte konservierte Domäne am N-Terminus. Charakteristisch für die PIP-Kinasen der Unterfamilie B ist die Anwesenheit dieser konservierten Domäne, die als „Membrane Occupation und Recognition Nexus“-Domäne (MORN) bezeichnet wird und bis zu acht sich wiederholende Motive („MORN-Repeats“) enthält (Mueller-Roeber und Pical, 2002).

Typ II

PIP-Kinasen vom Typ II bilden die PI5P 4-Kinasen und setzen PtdIns5P zu PtdIns(4,5)P₂ um (Clarke et al., 2007). In Pflanzen ist keine Typ II PIP-Kinase bekannt (Mueller-Roeber und Pical, 2002).

Typ III

PI3P 5-Kinasen phosphorylieren die Reaktion von PtdIns3P zu PtdIns(3,5)P₂. Im *Arabidopsis* Genom sind vier Typ III PIP-Kinasen kodiert, die jedoch bisher nicht näher untersucht sind (Mueller-Roeber und Pical, 2002).

PI-spezifische Phospholipase C

Die Hydrolyse von PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ kann *in vitro* durch PI-Phospholipase C (PI-PLC) katalysiert werden. Durch die Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ wird die lösliche Kopfgruppe als Ins(1,4,5)P₃ abgespalten, während das Restlipid DAG in der Membran verbleibt. In *Arabidopsis* sind sieben PI-PLC Gene bekannt (*AtPLC1-AtPLC7*) (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Basierend auf Daten von *in vitro* Tests wurden pflanzliche PLCs in zwei Typen eingeteilt, die beide Ca²⁺ für ihre Aktivität benötigen. Eine lösliche PLC kommt hauptsächlich im Cytosol pflanzlicher Zellen vor und bevorzugt PtdIns als Substrat. Das zweite Enzym ist in der Plasmamembran lokalisiert, bevorzugt PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ als Substrat und benötigt nur geringere Konzentrationen an Ca²⁺ zur vollen Aktivität als das lösliche Enzym (Drobak, 1992). Antikörper gegen die PI-PLC aus *Arabidopsis* erkennen ein 66 kDa großes Protein, welches in der Plasmamembran angereichert ist und nicht im Cytosol nachgewiesen werden kann (Otterhag et al., 2001).

1.4 Regulation physiologischer Prozesse durch PIs

PIs sind an verschiedenen physiologischen Prozessen eukaryotischer Zellen beteiligt (Drobak, 1993; Stevenson et al., 2000; Meijer und Munnik, 2003; Balla, 2006). Während des Membran- und Vesikeltransportes vom ER zur Plasmamembran und vom ER zur Vakuole sind PIs wahrscheinlich wichtig für das Abschnüren und Andocken von Membranen (Cremona und De Camilli, 2001; Wenk und De Camilli, 2004). PIs spielen eine wichtige Rolle in Signaltransduktionwegen und bei der Aktivierung von Enzymen oder Membranproteinen. In den folgenden Paragraphen sollen einige PI-abhängige Prozesse näher erläutert werden, die aus Pflanzen bekannt sind.

PIs und die Funktion von Spaltöffnungen

Pflanzliche stomatale Schließzellen können durch die Gabe von Ca^{2+} oder Injektion von InsP_3 zum Schließen angeregt werden (Gilroy et al., 1990). Ca^{2+} (Schroeder und Hagiwara, 1990), InsP_3 (Blatt et al., 1990) und Guanosin 5-O-(3-thiotrisphosphat) (Fairley-Grenot und Assmann, 1991) reduzieren den Kaliumeinstrom über die Plasmamembran der Schließzellen. Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) stimuliert das Schließen von Spaltöffnungen oder verhindert das Öffnen durch Erhöhung der Ca^{2+} -Gehalte (Hetherington, 2001). Durch die Gabe von ABA verringern sich die Gehalte von $\text{PtdIns}4\text{P}$ und $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, die Gehalte von InsP_3 hingegen steigen an (Lee et al., 1996). Der Öffnungsmechanismus von Spaltöffnungen kann auch durch exogene Zuführung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ beeinflusst werden. Diese Steuerung ist nur spezifisch durch $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ möglich, andere PIs zeigen keine Wirkung (Lee et al., 2007). Obwohl die Kontrolle der Spaltöffnungen eindeutig $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -abhängig ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen bislang unklar.

PIs und Zellpolarität

Die Anwesenheit von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ in der Plasmamembran ist wichtig für das Wachstum von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren (Braun et al., 1999; Kost et al., 1999; Vincent et al., 2005; Dowd et al., 2006; Preuss et al., 2006; Kusano et al., 2008; Stenzel et al., 2008).

Die Aktivität der PI 4-Kinase spielt eine wichtige Rolle im gerichteten Wachstum von Wurzelhaaren (Preuss et al., 2006). Die PI 4-Kinase-Aktivität an exocytotischen Vesikeln in polar wachsender Pflanzenzellen führt zu einer erhöhten Anwesenheit von $\text{PtdIns}4\text{P}$ an den Vesikeln (Preuss et al., 2006). Durch die PIP-Kinasen kann $\text{PtdIns}4\text{P}$ zu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ phosphoryliert werden. Mögliche Funktionen von plasmamembranassoziiertem $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ wurden für Wurzelhaare und Pollenschläuche postuliert (Bubb et al., 1998; Kost et al., 1999; Vincent et al., 2005; Kusano et al., 2008; Stenzel et al., 2008).

Der Verlust der zellulären Polarität in *Arabidopsis*-Wurzelhaaren, in denen die *Arabidopsis* PIP-Kinase-Isoform 3 (PIP5K3) überexprimiert wird (Stenzel et al., 2008), ähnelt Phänotypen von Pollenschläuchen, in denen infolge einer Inaktivierung der PLC erhöhte $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Gehalte vorliegen (Dowd et al., 2006). Verschiedene Hypothesen werden zur Kontrolle polarer Wachstumsprozesse durch $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ diskutiert. Neben einem offensichtlichen Einfluß auf die Dynamik des Aktincytoskeletts, der

schon weiter oben besprochen wurde, ist vor allem der Einfluß von PtdIns(4,5)P₂ auf den zielgerichteten Vesikelfluss entscheidend für die Polarität einer Zelle, da über den Vesikelfluss das polare Spitzenwachstum ermöglicht wird (Stenzel et al., 2008). Einige Details dieses Prozesses, die durch PtdIns(4,5)P₂ gesteuert werden können, werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

In tierischen Zellen spielen PIs eine wichtige Rolle in der Membransignaltransduktion an den Synapsen. Die Bildung von PtdIns(4,5)P₂ ist dabei eine Voraussetzung für die Ausschüttung von Neurotransmittern (Milosevic et al., 2005). Ebenso spielt PtdIns(4,5)P₂ eine wichtige Rolle in der Herstellung von Clathrinbeschichtungen an Vesikeln und dem Cytoskelettrückgrat in den endocytotischen Zonen der Synapsen (Jost et al., 1998). Es gibt Hinweise auf einen Mechanismus zur Entwicklung von synaptischen Vesikeln während der Exo- und Endocytose, der durch PIs reguliert wird (Cremona und De Camilli, 2001). Verschiedene Proteine, die an der Exocytose beteiligt sind, binden spezifisch PtdIns(4,5)P₂, u.a. die Familie der Synaptogamine (Schiavo et al., 1996) und Ca²⁺-abhängige Proteine für die Sekretion (CAPS) (Loyet et al., 1998). Der schnelle enzymatische Auf- und Abbau von PtdIns(4,5)P₂ erlaubt den Zellen eine flexible Dynamik des Vesikelflusses. Durch die Änderungen in den PtdIns(4,5)P₂ Gehalten können physiologische Prozesse innerhalb von Sekunden und Minuten ohne vorherige Synthese oder Abbau von Proteinen geändert werden (Milosevic et al., 2005). SNARE („soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein“)-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Fusion eukaryotischer Membranen (Lipka et al., 2007; Lang und Jahn, 2008). Intrazellulärer Transport von sekretorischen Vesikeln, integralen Membranproteinen und Lipiden benötigen alle die Bewegung und Fusion von Membranvesikeln (Pfeffer, 2007). Die Fusion von Transportvesikeln an Zielmembranen wird von einem Komplex verschiedener SNARE-Proteine vermittelt, der sich aus Proteinkomponenten der Zielmembran („target-SNARE“) und der fusionierenden Vesikelmembran („vesicle-SNARE“) zusammensetzt. PtdIns(4,5)P₂ ist *in vitro* nötig für die Bildung funktionaler SNARE-Komplexe (Vicogne et al., 2006). PtdIns(4,5)P₂ spielt so neben PtdOH eine wichtige Rolle in der Regulation exocytotischer Membranfusion in neuronalen Zellen. Durch die Struktur der großen Kopfgruppe verändert PtdIns(4,5)P₂ die Membraneigenschaften der inneren Membraneinzelschicht und bewirkt eine positive Krümmung. Völlig entgegengesetzt ist die Veränderung der Membraneigenschaften durch PtdOH, welches zu einer negativen Krümmung der Membran führt. Während einer Membranfusionsreaktion stabilisiert

PtdOH im ersten Schritt die äußere Membraneinzelschicht. PtdIns(4,5)P₂ ist wichtig im nächsten Schritt, in dem die cytoplasmatische Einzelschicht der Membran eine positive Krümmung annimmt. Die entstehende Membranwölbung ist eine Voraussetzung für die Fusion zweier Membranen (Vicogne et al., 2006).

1.5 PIs im pflanzlichen Stoffwechsel und in der pflanzlichen Stressantwort

Neben den bisher beschriebenen regulatorischen Funktionen von PIs, die in fast allen Zellen eines Organismus für einen geregelten Stoffwechsel nötig sind, spielen PIs auch eine Rolle in adaptiven Reaktionen nach Stress und in der Stresswahrnehmung. PIs wurden ursprünglich in tierischen Zellen entdeckt (Berridge, 1983), mittlerweile wurden sie auch in Pflanzen beschrieben (Drobak et al., 1999) und zunächst vor allem mit Stressantworten in Verbindung gebracht. In Säugerzellen bewirkt die Bindung zwischen spezifischen Rezeptoren der Plasmamembran mit ihrem Antagonisten über eine Signalkaskade die Aktivierung einer PLC, wobei GTP-bindende Proteine (G-Proteine) eine bedeutende Rolle spielen (Spiegelberg und Hamm, 2007). Die beteiligten G-Proteine gehören zu den heterotrimeren G-Proteinen, die in Säugern zahlreich, in Pflanzen aber nur wenig verbreitet sind (Jones und Assmann, 2004; Temple und Jones, 2007). Wie schon weiter oben erwähnt, werden pflanzliche PLCs nicht durch G-Proteine, sondern durch Ca²⁺-Signale aktiviert (Mueller-Roeber und Pical, 2002). Die Natur der postulierten Ca²⁺-Signale ist umstritten, doch in Analogie zur Situation in Hefe wird angenommen, dass im Zuge von Membranänderungen, z.B. bei hyperosmotischem Stress, mechanoaktivierte Ca²⁺-Kanäle einen Einstrom aus dem Außenmedium vermitteln (Drobak und Watkins, 2000; Kinnunen, 2000).

Die aktivierten PLCs spalten PtdIns(4,5)P₂ in InsP₃ und DAG. Das wasserlösliche InsP₃ breitet sich in der Zelle aus und setzt weiteres Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei (Berridge, 2005). Obwohl der spezifische InsP₃-Rezeptor in Pflanzen bislang nicht identifiziert wurde, ist dennoch bekannt, dass InsP₃ auch in Pflanzen in der Lage ist, Ca²⁺-Ausschüttung aus intrazellulären Kompartimenten hervorzurufen (Alexandre und Lassalles, 1990; DeWald et al., 2001). Während es sich bei diesem intrazellulären Kompartiment in tierischen Zellen in erster Linie um das ER handelt, so wird für Pflanzenzellen angenommen, dass auch die Vakuole oder der Zellkern das Ca²⁺-Reservoir darstellen können (Allen et al., 1995; Muir und Sanders, 1997).

DAG verbleibt in der Membran und bedingt in Säugerzellen die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). In Pflanzen wird freigesetztes DAG durch eine DAG-Kinase

rasch zu PtdOH umgesetzt, das ebenfalls Signalfunktion hat (Meijer und Munnik, 2003). Es werden also nach Stress gleichzeitig zwei Kaskaden in Gang gesetzt: Die erste führt zu einer Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und damit zur Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver Ereignisse, die andere führt in Tierzellen zu Proteinphosphorylierungen sowohl durch Ca^{2+} -sensitive Proteinkinasen als auch durch die aktivierte PKC (Amadio et al., 2006), bzw. in Pflanzen zur Freisetzung von PtdOH (Meijer und Munnik, 2003). InsP_3 und DAG werden als Signalmoleküle schnell metabolisiert, so dass die Signale nur kurzlebig sind (Nishizuka, 1988; Berridge und Irvine, 1989; Rhee et al., 1989; Shears, 1989; Carpenter und Cantley, 1990; Downes und Macphee, 1990).

Ein Anstieg im InsP_3 -Spiegel von Pflanzenzellen konnte nach verschiedenen externen Stimuli gezeigt werden (Stevenson et al., 2000; Meijer und Munnik, 2003). So wurden beispielsweise in Mais und Hafer nach Gravistimulation sowohl transiente als auch dauerhafte Anstiege im intrazellulären InsP_3 -Gehalt detektiert (Perera et al., 1999; Perera et al., 2001). Korrelierend zum InsP_3 -Muster wurde in gravistimulierten Maispflanzen ein Anstieg der spezifischen PIP5-Kinase-Aktivität in der Plasmamembran nachgewiesen (Perera et al., 1999). Es wird vermutet, dass der biphasische Mechanismus eines schnellen und eines langsamen InsP_3 -Anstieges der Pflanze ermöglicht, zwischen einem temporären Umstoß, z.B. durch Wind, und einem dauerhaften Umknicken zu unterscheiden (Perera et al., 1999; Stevenson et al., 2000; Perera et al., 2001). Anhand von Experimenten mit Salzstress an verschiedenen Algen, pflanzlichen Zellkulturen und *Arabidopsis* konnte die Rolle des PI-Signalweges in Reaktion auf osmotischen Stress (Smolenska-Sym und Kacperska, 1996; Heilmann et al., 1999; Heilmann et al., 2001), ebenso wie das Zusammenspiel von PtdIns(4,5) P_2 -Synthese, InsP_3 -Produktion und Ca^{2+} -Mobilisierung (DeWald et al., 2001) gezeigt werden. Änderungen in PIs und InsP_3 und deren Abhängigkeit von einem Anstieg in Jasmonsäure (JA) nach Verwundung wurde ebenfalls demonstriert (Mosblech et al., 2008).

Änderungen der InsP_3 -Gehalte werden in Pflanzen auf eine andere Weise reguliert als in tierischen Zellen. PtdIns4P und PtdIns(4,5) P_2 sind die direkten Vorläuferlipide von InsP_3 . Während im tierischen System die Aktivierung der PLC zur vermehrten Produktion von InsP_3 und DAG führt (Berridge, 2005), wird die InsP_3 -Produktion in Pflanzen eher durch erhöhte PtdIns P_2 -Synthese auf der Stufe der PIP5-Kinasen angetrieben (Perera et al., 2002). In höheren Pflanzen sind die Gehalte an PtdIns(4,5) P_2

im Vergleich zu denen in Säugerzellen niedrig (Stevenson et al., 2000), was darauf hinweist, dass die Phosphorylierung von PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P₂ eine Schrittmacherreaktion bei der Signalerzeugung darstellt. Eine wichtige regulatorische Rolle wird daher den verschiedenen PI4-Kinasen und PIP5-Kinasen zugemessen (Heilmann et al., 1999; Perera et al., 1999; Heilmann et al., 2001; Perera et al., 2002; Meijer und Munnik, 2003), die das Substrat für eine oder mehrere PLCs bereitstellen.

Transgene Pflanzen mit gestörtem PI Stoffwechsel als Werkzeuge zur Erforschung der PI-Funktion

Um die Funktion von PIs in der pflanzlichen Stressantwort untersuchen zu können, wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen erzeugt, die das menschliche Gen für die Typ I Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase (InsP 5-Ptase) konstitutiv exprimieren (Perera et al., 2002; Perera et al., 2006). Diese InsP 5-Ptase ist gut charakterisiert (Laxminarayan et al., 1994) und hydrolysiert *in vitro* spezifisch das lösliche InsP₃, aber keine Inositolphospholipide. Das Enzym ist in Pflanzenzellen mit der Plasmamembran assoziiert und hydrolysiert damit primär InsP₃-Moleküle, die an der Plasmamembran entstehen (Perera et al., 2002). InsP₃-Signale, die hier durch PLC-Aktivität produziert werden, werden also unmittelbar nach ihrer Entstehung durch die InsP 5-Ptase hydrolysiert und sofort abgebaut. Stimulationsexperimente zeigten, dass in *InsP 5-Ptase*-Pflanzen im Gegensatz zu Kontrollpflanzen kein Anstieg im InsP₃-Gehalt nach Stimulation auftrat (Perera et al., 2002; Perera et al., 2006; König et al., 2007). Auch die Basalgehalte an InsP₃ waren im Vergleich zu Kontrollpflanzen stark reduziert. Die transgenen Pflanzen zeigten unter normalen Wachstumsbedingungen keinen äußerlich sichtbaren Phänotyp. Am stärksten zeigten sich die Veränderungen im InsP₃-Gehalt in der Expressionslinie 2-8 (Perera et al., 2006), welche daher im Rahmen dieser Arbeit für funktionelle Studien verwendet wurde.

1.6 Verschiedene regulatorische Funktionen von PIs sind in distinkten Pools voneinander getrennt

Signaltransduktionsprozesse benötigen regulatorische Proteine in spezifischen Bereichen der Membranen, wo sich Proteinkomplexe bilden, die die zelluläre Antwort organisieren. Eine große Anzahl von regulatorischen Proteinen ist bekannt, die PtdIns(4,5)P₂ oder andere PIs spezifisch und mit großer Affinität binden. Die

Lokalisierung der Phosphoinositidsynthese könnte eine entscheidene Rolle in räumlich begrenzten Signalabläufen darstellen (Kost et al., 1999).

Der PI-Stoffwechselweg ist, ähnlich wie andere Stoffwechselwege, kein linearer Prozess von Reaktionen, sondern ein Netzwerk aus vielen enzymatischen Regulationen, die aufeinander abgestimmt sind. Die Komplexität des PI-Stoffwechsels wird auch an der Bindung von PIs an viele zelluläre Proteine deutlich (Memon et al., 1989; Memon und Boss, 1990; Fukami et al., 1992; Drobak et al., 1994; Hilgemann und Ball, 1996; Shibasaki et al., 1997; Staiger et al., 1997; Sun et al., 1997; Fan und Makielski, 1999; Hilgemann et al., 2001), die in Transport (Kauffmann-Zeh et al., 1995; Kearns et al., 1998) und Biosynthese von PIs eine Rolle spielt (Stevenson et al., 1998). Lipid-Protein-Komplexe definieren einzelne subzelluläre Domänen oder Pools, die verschiedene zelluläre Funktionen unterstützen (Toker, 1998).

Bereits 1987 wurde im Rahmen einer Studie an menschlichen Erythrozyten über die Anwesenheit von distinkten PI-Pools spekuliert. In der Plasmamembran könnten zwei Pools von PIs koexistieren, ein „aktiver“ und ein „inaktiver“ Pool, wobei der „inaktive“ Pool durch Aktivierung spezifischer Lipidkinasen zum Umsatz gelangen könnte (King et al., 1987).

In Säugerzellen tragen zwei verschiedene Reaktionswege zur Synthese von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ bei: Zusätzlich zur Phosphorylierung von $\text{PtdIns}4\text{P}$ durch Typ I $\text{PI}4\text{P}$ 5-Kinasen, die einen sehr etablierten Reaktionsweg bilden, findet auch eine Phosphorylierung von $\text{PtdIns}5\text{P}$ an der Position 4 am Inositol Ring durch eine Typ II $\text{PI}5\text{P}$ 4-Kinase statt, und es wurde postuliert, dass $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ aus jedem der beiden Synthesewege unterschiedliche Funktionen wahrnimmt (Ciruela et al., 2000).

Es gibt einige Hinweise, dass PI-Pools existieren, die unabhängig voneinander reguliert werden. Im Pollenschlauchwachstum findet man beispielsweise $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ an der apikalen Spitze der Plasmamembran (Kost et al., 1999; Dowd et al., 2006). Erste Hinweise, dass $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ „Mikrodomänen“ in der Plasmamembran von Pollenschläuchen vorkommen und mehr als nur eine regulatorische Einheit darstellen, kamen durch die Beobachtung unterschiedlicher Phänotypen nach Überexpression von Typ A und B $\text{PI}4\text{P}$ -5-Kinasen in der apikalen Plasmamembrandomäne wachsender Pollenschläuche (Till Ischebeck und Dr. Ingo Heilmann, persönliche Mitteilung).

$\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ kann an verschiedenen subzellulären Lokalisationen pflanzlicher Zellen detektiert werden, an der Ausstülpung auswachsender Wurzelhaare, ebenso im Cytoskelett von wachsenden Mais-Wurzelhaaren. Hingegen wurde $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ in

Acanthamoeba hauptsächlich begrenzt auf die Plasmamembran gefunden (Bubb et al., 1998). PI 4-Kinase-Aktivität, die eine Voraussetzung für die Produktion von PtdIns(4,5)P₂ ist, wurde als cytoskelettassoziiert beschrieben.

In *Catharanthus roseus* Suspensionskulturen wurden Änderungen in den Gehalten von radioaktiv markierten PIs in Abhängigkeit des Alters der Kultur beobachtet. Diese Daten zeigten, dass PIs im Verlauf des Wachstumszyklus eines Organismus unterschiedlich reguliert werden (Heim und Wagner, 1986). Analoge Studien waren auch an der einzelligen Rotalge, *Galdieria sulphuraria*, durchgeführt (Heilmann et al., 1999; Heilmann et al., 2001).

Neben einer räumlichen oder zeitlichen Trennung von PI-Pools mit verschiedenen Funktionen kann auch die Stressinduzierbarkeit auf eine Sonderrolle der dann vorübergehend gebildeten Lipide hinweisen. Die physiologische Rolle für die ansteigende PtdIns(4,5)P₂-Synthese nach Salzstress ist bislang nicht bekannt.

1.7 Interaktionen von PIs mit Proteinen über spezifische Lipidbindungsdomänen

PIs sind also in verschiedenen subzellulären Bereichen lokalisiert, in der Plasmamembran, in Endosomen oder im Zellkern, und dienen als Liganden für PI-bindene Proteine. Viele Proteine weisen Domänen auf, die PIs spezifisch binden können (Lemmon, 2003). Hierzu gehören z.B. die schon weiter oben erwähnte PH-Domäne, die Fab1p-YOPB-Vps27p-EEA1 (FYVE)-Domäne und die phox-Homologie-Domäne (PX-Domäne). Diese Domänen findet man gehäuft in Proteinen die an intrazellulären Signalwegen, Membrantransport und Umstrukturierung des Cytoskeletts beteiligt sind. Die wichtigsten PI-bindenden Proteindomänen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

PH-Domäne

PH-Domänen sind in vielen Proteinen, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind gefunden worden, einschließlich der pflanzlichen PI 4-Kinasen der α -Familie (Stevenson et al., 1998). PH-Domänen sind wenig konservierte Proteinmodule mit einer ungefähren Länge von 100 Aminosäuren (Lemmon, 2003). Trotz der Sequenzunterschiede ist die Tertiärstruktur ähnlich. Obwohl die exakten Funktionen von PH-Domänen weitgehend unbekannt sind, konnte gezeigt werden, dass sie durch

ihre Bindung an PIs wie PtdIns4P, PtdIns(4,5)P₂ oder PtdIns(3,4,5)P₃ möglicherweise Enzymaktivitäten regulieren.

Die N-terminale Region der PH-Domäne der Phospholipase C- δ_1 (PLC- δ_1) (Lomasney et al., 1996), β -adrenergic Rezeptor Kinase (Pitcher et al., 1995), β -spektrin (Hyvonen et al., 1995), Pleckstrin, Tsk (T-cell-specific-kinase) und Ras GTPase-aktivierender Proteine (Harlan et al., 1994) binden jeweils verschiedene PIs oder auch lösliche Inositolphosphate.

Die Membranzusammensetzung beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung, von Proteinen mit PH-Domänen, wobei PtdCho und PtdIns eine besonders wichtige Rolle spielen (Hama et al., 1999). Die Bindung von Proteinen wie Gelsolin, Profilin und Aktin an das Cytoskelett wird ebenfalls über PH-Domänen vermittelt (Staiger et al., 1993; Staiger et al., 1997). Die Aktivität der PI4-Kinase α , kann ihre Funktion bei der Regulation von Membranverteilung, Organisation des Cytoskeletts und Signaltransduktion nur in Anwesenheit ihrer PH-Domäne erfüllen (Stevenson-Paulik et al., 2003). Die PH-Domäne scheint an der Bindung der *Arabidopsis* PI 4K α 1 an das Cytoskelett beteiligt zu sein und ermöglicht die Ausbildung von feinen F-Aktin Filamenten. Die Aktinpolymerisation ist durch die Entfernung der PH-Domäne aus der *Arabidopsis* PI 4K α 1 gestört. In Insektenzellen konnte gezeigt werden, dass heterolog exprimierte *Arabidopsis* PI 4K α 1 an perinukleäre Membranen lokalisiert, und dass die PH-Domäne für diese Lokalisierung notwendig ist. Die PH-Domäne alleine zeigt eine Lokalisierung mit Membranen außerhalb des Kerns und der Plasmamembran (Stevenson-Paulik et al., 2003). Im tierischen System konnte eine Lokalisierung der PI4K α mit dem ER und dem Zellkern gezeigt werden (Nishikawa et al., 1998).

Van Rossum et al (2005) konnte zeigen, dass das menschliche Protein TRPC3 (transienter Rezeptor in der Protein Familie von Kationenkanälen) und PLC- γ 1 interagieren und binden dabei eine intermolekulare PH-Domäne, die die Expression von TRPC3-Kanälen an der Plasmamembran durch die Bindung spezifischer Lipide kontrolliert (van Rossum et al., 2005). Nur in Anwesenheit beider Domänen kann PtdIns(4,5)P₂ gebunden werden (van Rossum et al., 2005).

FYVE-Domäne

Klassische FYVE-Zink-Finger-Domänen wurden in PI3P 5-Kinasen und Lipasen von *Arabidopsis* gefunden, und es konnte eine Bindungsspezifität für PtdIns3P gezeigt werden (Drobak und Heras, 2002; Heras und Drobak, 2002).

PX-Domäne

Die PX-Domänen gehören ebenfalls zu den PI-bindenden Domänen. Es konnten spezifische Reste identifiziert werden, die mit der Bindung an PIs zusammenhängen. PI 3-Kinasen, welche hauptsächlich im Endosom und in vakuolären Strukturen eukaryotischer Zellen lokalisieren, weisen eine PX-Domäne mit PtdIns3P-Bindungseigenschaften auf (Lemmon, 2003). PX-Domänen ähneln FYVE-Domänen, und es ist nicht überraschend, dass Proteine, die PX- oder FYVE-Domänen besitzen, in Verbindung mit den gleichen Stoffwechselwegen stehen (Lemmon, 2003).

1.8 Aufbau und Regulation von PI-Pools

Trotz verfügbarer Daten zur spezifischen Lipidbindung verschiedener PI-bindender Proteindomänen ist die genaue Organisation des PI-Netzwerks eukaryotischer Zellen bislang nicht klar. Wie die verschiedenen regulatorischen Funktionen in der Signalwirkung von PIs verteilt und aufrechterhalten werden und wie unabhängige Pools aufgebaut und aufrechterhalten werden, ist wenig untersucht.

Die verschiedenen Lokalisierungen von PI 4-Kinasen zeigen, dass Lipidkinasen verschiedene PtdIns4P-Pools bilden können und dass verschiedene PI 4-Kinase-Isoformen nicht-überlappende physiologische Funktionen haben. Die Regulation der PtdIns4P-Pools innerhalb einer Zelle bestimmt die Funktionen der PI4-Kinase in Pflanzen und erlaubt neue Einblicke in ihre individuelle Membranverteilung und Signaltransduktionswege. Die Verteilung von PtdIns(4,5)P₂ innerhalb der Zelle wurde durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter PH-Domänen der menschlichen PLC δ_1 aufgedeckt (Varnai und Balla, 1998; Balla et al., 2000; Balla und Varnai, 2002). Auch PIP-Kinasen, die PtdIns(4,5)P₂ produzieren, wurden in verschiedenen subzellulären Lokalisationen beschrieben, u.a. der Plasmamembran und Endomembranen (Perera et al., 1999; Westergren et al., 2001; Perera et al., 2002; Im et al., 2007).

Die bislang gefundenen Spekulationen über PI-Pools haben also ihre Erklärungen im Zusammenhang mit der Biosynthese von PIs und den beteiligten Enzymen. Viele Vertreter von PI-Phosphatasen sind wichtige Vermittler in zellulären Signaltransduktionsprozessen (Vanhaesebroeck et al., 2001; Whisstock et al., 2002). Diese Phosphatasen haben eindeutige Substratspezifitäten und besitzen Sensitivitäten hinsichtlich der assoziierten Fettsäuren und Kopfgruppen (Schmid et al., 2004).

Auch für andere rekombinante PI-modifizierende Enzyme wurden Präferenzen für bestimmte Substratspezies beschrieben, so z.B. für eine PIP-Kinase und eine PLC aus

Insektenzellen, die bei ihren Substraten eine Fettsäurespezifität aufweisen (Carricaburu und Fournier, 2001). Es ist eine Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass verschiedene PI-Pools unterschiedliche PI-Spezies enthalten, die sich durch ihre assoziierten Fettsäuren unterscheiden.

„Lipid-Rafts“

Die genaue subzelluläre Verteilung von PIs in verschiedenen Membranen oder „Mikrodomänen“ ist wahrscheinlich für die Funktion bestimmter regulatorischer Prozesse entscheidend. Eine besondere Form von Lipidmikrodomänen stellen die „Lipid-Rafts“ dar, die als Membrandomänen charakteristische Lipidzusammensetzung haben (Gandhavadi et al., 2002; Martin und Konopka, 2004; Mongrand et al., 2004; Bhat und Panstruga, 2005; Borner et al., 2005). Anhand von biophysikalischen und biologischen Studien wurde ein Modell der Plasmamembranstruktur aufgestellt, in dem Cholesterol und Sphingolipide gemeinsam in bestimmten Membrandomänen vorkommen. Diese Domänen beinhalten außerdem vorwiegend gesättigte Phospholipide (Simons und Vaz, 2004) und werden als „Lipid-Rafts“ bezeichnet. „Lipid-Rafts“ werden als Triton X-100-unlösliche Membranen definiert. Diese Plasmamembrandomänen kommen in tierischen Zellen, aber auch in Blättern und Zellkulturen höherer Pflanzen vor.

„Lipid-Rafts“ spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen wie der Signaltransduktion (Simons und Toomre, 2000), Exocytose (Salaun et al., 2004), Endocytose (Parton und Richards, 2003), Apoptose (Garcia et al., 2003) und der Regulation des Aktincytoskeletts (Wickstrom et al., 2003).

Für den PI-Stoffwechsel sind „Lipid-Rafts“ relevant, weil gezeigt werden konnte, dass in Hefe die Lokalisierung der PIP-Kinase, Mss4, die für die essentielle Bildung von PtdIns(4,5)P₂ verantwortlich ist (Desrivieres et al., 1998), durch Sphingolipide bedingt wird (Kobayashi et al., 2005). In Abwesenheit komplexer Sphingolipide kann PtdIns(4,5)P₂ nicht am korrekten Ort, der Plasmamembran, gebildet werden, und die Zelle stirbt. Bistlang ist nicht klar, ob die sphingolipidabhängige Funktion von PIP-Kinasen nur in Hefe vorkommt oder ob diese Situation auch auf andere Eukaryoten und Pflanzen zutrifft.

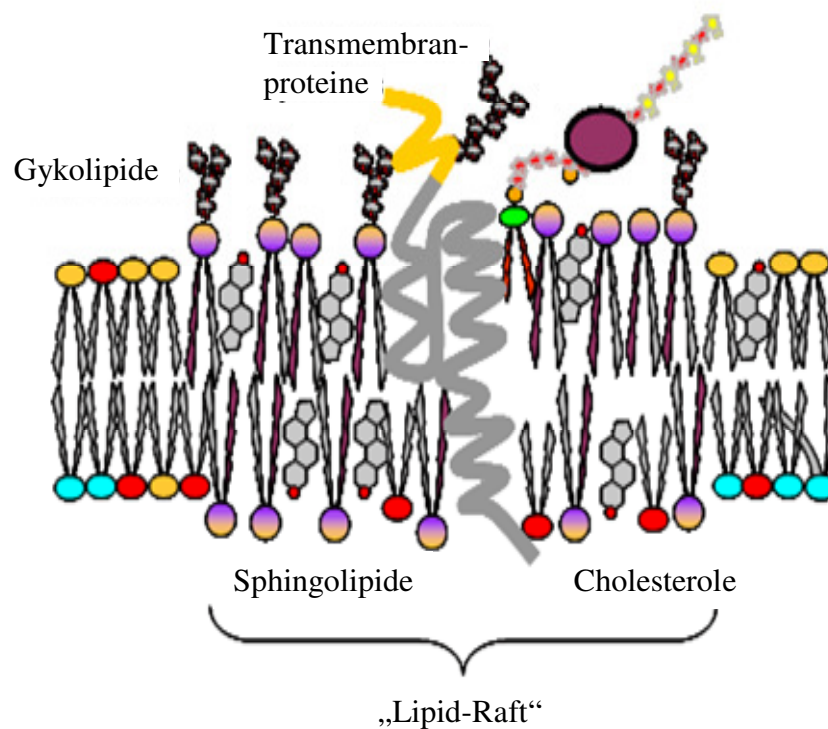


Abbildung 7: Aufbau eines „Lipid-Rafts“. Als „Lipid-Raft“ bezeichnet man eine Lipidmikrodomäne, in der Cholesterole und Sphingolipide, neben gesättigten Phospholipiden gemeinsam vorkommen. „Lipid-Rafts“ werden als Triton X-100-unlösliche Plasmamembrandomänen definiert, die in tierischen und pflanzlichen Zellen vorkommen (Simons und Vaz, 2004). Quelle der Abbildung: http://www.steve.gb.com/science/lipids_and_membranes.html.

1.9 Zeitliche und räumliche Anordnung von PIs in eukaryotischen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die Fettsäurezusammensetzung von PIs für eine Poolbildung relevant ist.

Betrachtet man die räumliche Anordnung und die Sortierung der Lipide anhand des Vorkommens im ER und der Plasmamembran, sind beide Regionen deutlich unterschiedlich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung, dennoch sind sie verbunden durch den endozytotischen und exozytotischen Membranfluss. Diese beiden Prozesse sind verantwortlich für das Sortieren von Proteinen und Lipiden innerhalb der Zelle. Bestimmte Lipide kommen in zisternenartigen oder vesikelartigen Regionen vor, die sich vorübergehend bilden oder von Donormembranen abschnüren (Mukherjee et al., 1999; Mukherjee und Maxfield, 2004; Holthuis und Levine, 2005; van Meer, 2005). Cooke und Deserno konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen lokaler

Membrankrümmungen und der Verteilung bestimmter Lipide besteht (Cooke et al., 2005; Cooke und Deserno, 2006). *In vivo* Experimente haben gezeigt, dass Lipide mit einem höheren Grad an Unsättigung (Abb. 9C) vermehrt in Membransysteme sortiert werden, in denen zisternenartige und tubuläre Membranausprägungen auftreten (Mukherjee et al., 1999). In stark gekrümmten Membranregionen treten verschiedene Lipide auf, die sich in ihrer Gestalt unterscheiden. Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, wie sie in planaren Doppellipidmembranen häufig vorkommen, und wie sie sich in stark gekrümmten Membranregionen sammeln, können Vesikel (Roux et al., 2005) bilden. Ein hilfreiches Modell zur Veranschaulichung der Einflüsse der Lipidstruktur auf Membraneigenschaften liefert die geometrische Annäherung der Lipidform (Abb. 8). Lipide haben eine zylindrische Struktur, wenn die Querschnittsfläche der Kopfgruppe ähnlich der Querschnittsfläche der Fettsäuren ist (Kooijman et al., 2003). Ein Beispiel für ein zylindrisches Lipid ist PtdCho. Sind die Querschnittsflächen der Lipidkopfgruppe und die der Fettsäurereste unterschiedlich, hat das Konsequenzen für die Eigenschaften der gebildeten Membranen. Wenn die Querschnittsflächen der Kopfgruppen größer sind als die der Fettsäuren (Abb. 8A), haben die Lipide invers-konische Strukturen und begünstigen eine positive Krümmung, z.B. für die Vesikelbildung (Kooijman et al., 2003). Ein Beispiel für invers-konische Lipide sind PIs.

Wenn die Querschnittsfläche der Kopfgruppen kleiner ist als die der Fettsäuren, erhält man konische Lipide (Abb. 8C), die die Bildung einer negativen Krümmung in Membranen begünstigen (Kooijman et al., 2003). Ein Beispiel für ein konisches Lipid ist PtdEtn (Abb. 8).

Die Größe der Lipide ist nicht nur definiert durch die chemische Struktur der Lipidkopfgruppe und der Fettsäurekette, sondern ebenso durch Umgebungsparameter wie den pH-Wert, die Salzkonzentration, die Temperatur oder die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen (van den Brink-van der Laan et al., 2004 b).

In tierischen Zellen bestehen Membranen zu etwa 50 mol % aus zylindrischen Lipiden, wie PtdCho, zu etwa 20 mol % aus den konischen PtdEtn, PtdSer und PtdIns (van Meer, 2005).

Die chemischen Zusammensetzungen der zwei Einzelschichten einer Lipiddoppelschicht sind komplex und können unterschiedlich sein. Nahezu alle anionischen Lipide in eukaryotischen Zellen beschichten die dem Cytoplasma

zugewandte Einzelschicht, während sich in extrazellulären Umgebungen viele Lipide mit großen glykosylierten Kopfgruppen finden. Unterschiede in der Doppelschichtasymmetrie zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Membranen sind wichtig für die Aktivität von endogenen antimikrobiellen Faktoren, die bakterielle Membranen zerstören, aber harmlos gegenüber eukaryotischen Zellen sind (Sato und Feix, 2006, 2006).

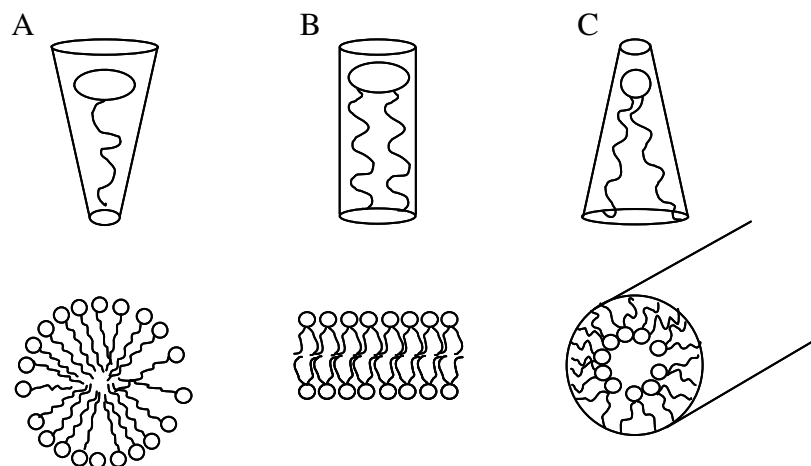


Abbildung 8: Darstellung der Gestalt von Lipiden. A, Lipide mit invers-konischer Struktur neigen zu positiven Krümmungen und bilden Vesikel. B, Zylindrische Lipide bilden Doppellipidmembranen. C, Lipide mit konischer Struktur bilden Einzelschichten mit negativen Krümmungen. Abbildung modifiziert nach van den Brink-van der Laan et al., 2004 a.

1.10 Einfluß assoziierter Fettsäuren auf subzelluläre Verteilung und Funktion von PIs

Die Beobachtungen, dass die Fettsäurezusammensetzung eines Lipids seine laterale Mobilität bedingt (Mukherjee et al., 1999), lässt sich auch auf PIs übertragen (Cho et al., 2006) (Abb. 9).

Im tierischen System enthalten die Lipide PtdIns(4,5)P₂, PtdIns4P und PtdIns hauptsächlich Kombinationen von sechs Fettsäuren: 16:0 (Palmitat), 18:0 (Stearat), 18:1 Δ^9 (Oleat), 18:2 $\Delta^{9,12}$ (Linolsäure), 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ (Linolensäure) und 20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ (Arachidonsäure). DAG und PtdOH, die in tierischen Zellen aus der Reaktion der PLC entstehen, sind zum großen Teil polyungesättigt (Abb. 9C), während Lipide, die durch die Phospholipase D entstehen, eher gesättigt oder monoungesättigt sind (Pettitt et al., 2006) (Abb. 9A und B). 18:1 Δ^9 , 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ sind die Hauptfettsäuren von

PIs in den rektalen Epidermiszellen von Küchenschaben (Carricaburu und Fournier, 2001). Die PIP-Kinase, die für die Phosphorylierung von PtdIns4P an der Position 5 verantwortlich ist, um PtdIns(4,5)P₂ zu produzieren, hat im tierischen Modell eine Substratspezifität für Lipidsubstrate, die 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ enthalten (Carricaburu und Fournier, 2001).

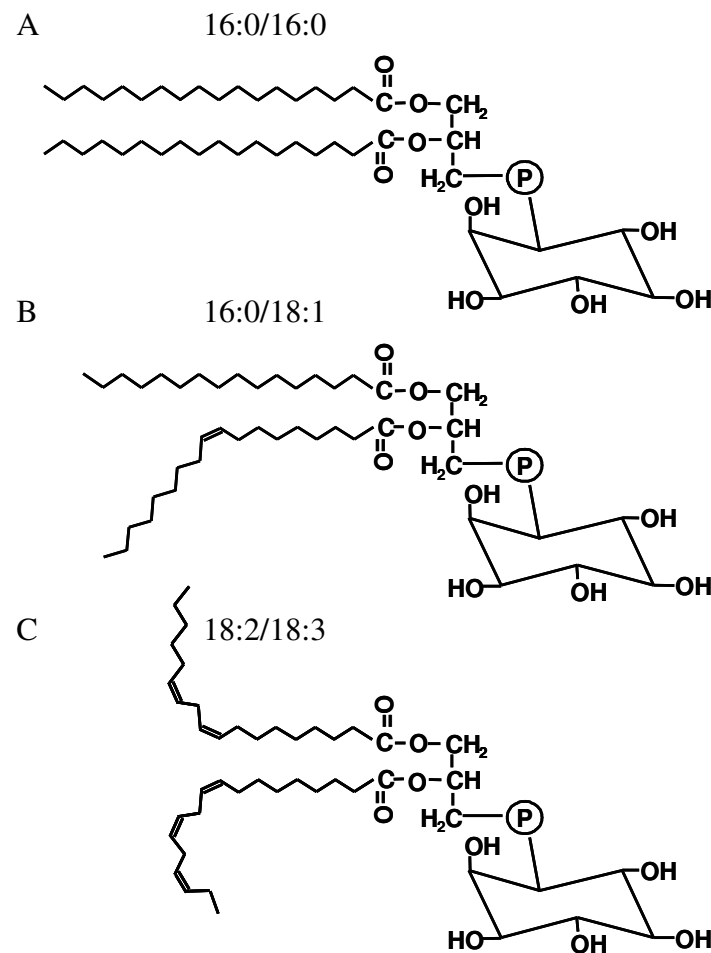


Abbildung 9 : PtdIns mit verschiedenen assoziierten Fettsäuren. PtdIns besteht aus einem Inositolring und ist über ein Glycerinrückgrat mit verschiedenen Fettsäuren assoziiert. Die Fettsäuren können sich durch ihren Grad in der Sättigung unterscheiden. A, gesättigte Fettsäuren 16:0/16:0 assoziiert mit PtdIns; B, gesättigte Fettsäure 16:0 und einfach ungesättigte Fettsäure 18:1 assoziiert mit PtdIns; C, ungesättigte Fettsäuren 18:2/18:3 assoziiert mit PtdIns. PtdIns, Phosphatidylinositol.

1.11 Probleme der PI-Analytik

Lipidextrakte pflanzlicher Proben enthalten oft komplexe Mischungen von Lipiden, die möglichst vollständig aufgetrennt und quantifiziert werden sollen. Oftmals lässt sich eine solche Analyse nicht durch eine einfache und einzige Prozedur erhalten, sondern es ist eine Kombination von Techniken notwendig.

Lipidklassen lassen sich in der Regel durch bestimmte Lösungsmittelgemische extrahieren, und ihre Eigenschaften unterscheiden sich in der Chromatographie gut, so dass man einzelne Lipidklassen anhand von Lipidstandards identifizieren kann. Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine verbreitete Methode für die analytische Auftrennung von Lipidklassen. Die Fettsäurezusammensetzung von Lipiden kann dann durch Gaschromatographie (GC) bestimmt werden (Christie, 2003).

Die Analyse von PI-Spezies wird durch die strukturellen Ähnlichkeiten der verschiedenen Inositolphosphatkopfguppen erschwert. Traditionelle Identifikationsmethoden für PIs nutzten die radioaktive Markierung der Kopfguppen mit [³²P]P_i (Pical et al., 1999) oder [³H]-Inositol (Cho et al., 1992), sowie Deacylierung und Auftrennung der Kopfguppen durch Ionenaustauschchromatographie, um PIs zu identifizieren und zu quantifizieren. [³H]-Markierung und anschließende Deacylierung der Kopfguppen wurde ebenfalls angewendet, um PIs zu analysieren (Brearley und Hanke, 1994). Bei dieser Methode geht allerdings die Information, welche Fettsäuren mit den Analyten assoziiert sind, verloren.

Ein spezifischer Nachweis für PtdIns(4,5)P₂ kann auch über einen Immunoblot oder Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) durchgeführt werden (Chen et al., 2002; Zini et al., 2005). Ein kommerziell erhältliches Antiserum gegen PtdIns(4,5)P₂ zeigte dabei nur geringe Kreuzreaktivität mit anderen Phospholipiden.

Eine sensitive Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von PI-monophosphaten und -bisphosphaten mit unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen aus Totallipidextrakten durch Elektrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) wurde von verschiedenen Gruppen beschrieben (Wenk et al., 2003; Pettitt et al., 2006), ist jedoch wegen des instrumentellen Aufwandes nicht immer praktikabel.

1.12 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob unabhängige PI-Pools durch direkte biochemische Analyse nachweisbar sind. Für die Analyse sollte getestet werden, ob PIs sich durch eine Kombination klassischer Methoden der Lipidanalytik ohne entscheidenden instrumentellen Aufwand analysieren lassen. Zunächst sollten PI-Spezies aus Pflanzen anhand ihrer Fettsäurezusammensetzung charakterisiert werden, dann sollte die physiologische Funktion der PIs untersucht werden. Um mögliche physiologische Funktionen zu ermitteln, sollten PIs unter Standard- mit jenen unter

Stressbedingungen verglichen und getestet werden, ob nach hyperosmotischem Stress gebildetes PtdIns(4,5)P₂ subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden kann. Die erhaltenen Ergebnisse sollten möglichst über eine unabhängige Methode verifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Bromphenolblau Na-Salz (BPB)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Carbenicillin	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Diisopropylamin	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
DNA Größenmarker Generuler 1kb Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Hefe-Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalaktosylpyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Szintillationsflüssigkeit	Zinsser Analytics, Frankfurt, Deutschland
Select Pepton 140	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
α -[32 P]-dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
Fettsäure-Methylester-Mischung (F.A.M.E Mix C4-C24)	Sigma, München, Deutschland

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Steinheim, Deutschland) oder Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.2 Filter und Membranen

Hybond-N, Nylon, 0,45 µm	GE Healthcare/Amersham, Düren, Deutschland
Cellulose Acetat Filter, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Madistone, KY, USA
Kieselgel-Dünnschichtplatten	Merck, Darmstadt, Deutschland
Si-60, 20 x 20 cm	
Lipidbindungsstreifen („PIP-Strips“)	Echelon, Salt Lake City, UT, USA

2.3 Enzyme

Enzyme

GoTaq-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
MasterAmp <i>Tfl</i> -DNA-Polymerase	EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA
Takara <i>Ex Taq</i> TM DNA Polymerase	Takara Mirus Bio, Madison, WI, USA
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland

DNA und Proteingrößenmarker

GeneRuler TM 1 kb DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland

Reaktionsansätze

Big Dye Terminator v1.1 Cycle	
Sequenzier-Kit Big Dye Terminator v1.1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Cycle Sequencing Kit	
[³ H] BioTrak Assay System für D-my-	Amersham Biosciences Europa,

Inositol-1,4,5-trisphosphat	Deutschland
pGEM-T easy Ligation Kit	Promega, Heidelberg, Deutschland
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
GFX PCR DNA & Gel band purification Kit	GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland
Plasmid Midi Core Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gateway [®] LR Clonase [™] II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Die Enzyme und Reaktionsansätze wurden nach Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet, wenn nicht anders angegeben.

2.4 Antiseren

Tabelle 1: Verwendete primäre Antiseren

1. Antikörper	verwendete Verdünnung	Quelle	Zitat
Maus- α Clathrin	1:1000	Sigma	(Liu et al., 1995)
Maus- α gMDH	1:5000	Dr. C. Gietl	(Gietl et al., 1996)
Hase- α Aktin	1:1000	Sigma	
Hase- α H ⁺ -ATPase	1:5000	Prof. Dr. M. Boutry	(Morsomme et al., 1998)
Hase- α TGA	1:5000	Prof. Dr. C. Gatz	
Hase- α BiP	1:5000	A. Vitale	(Pedrazzini et al., 1997)
Hase- α V-ATPase	1:2000	Dr. R. Ratajczak	(Ratajczak et al., 1998)
Hase- α MBP	1:10000	Sigma	

Die sekundären Antiseren sind alle mit alkalischer Phosphatase (Voller et al., 1976) konjugiert.

2.5 Sequenzen, Plasmide, Vektoren und Bakterien

In Tabelle 2 sind die Identifikationsnummern der in dieser Arbeit verwendeten Gene aus *Arabidopsis* aufgelistet.

Tabelle 2: Identifikationsnummern (*Arabidopsis* genome identifier, agi) der genomischen Loci verwendeter *Arabidopsis*-Sequenzen

Gen	agi-Nummer	Referenz
<i>PIP1</i>	At1g21980	Elge et al., 2001
<i>PPIK2</i>	At1g77740	Stenzel et al., 2008
<i>PIP3</i>	At2g26420	Stenzel et al., 2008
<i>PIP4</i>	At3g56960	Mueller-Roeber und Pical, 2002
<i>PIP5</i>	At2g41210	Mueller-Roeber und Pical, 2002
<i>PIP6</i>	At3g07960	Mueller-Roeber und Pical, 2002
<i>PIP7</i>	At1g10900	Stenzel et al., 2008
<i>PIP8</i>	At1g60890	Stenzel et al., 2008
<i>PIP9</i>	At3g09920	Stenzel et al., 2008
<i>ARC3</i>	At1g75010	Shimada et al., 2004
<i>Clathrin</i>	At2g40060	Holstein, 2004
<i>Aktin8</i>	At1g49240	Bustin et al., 2000
<i>RD20</i>	At2g33380	Takahashi et al., 2001
<i>HVA</i>	At4g24960	Takahashi et al., 2001

Im Folgenden werden Plasmide und Bakterienstämme aufgelistet, die in den weiter unten beschriebenen Experimenten verwendet wurden.

Tabelle 3: Verwendete Vektoren

Vektor	Promotor	Selektionsmarker	Bezugsquelle	Modifikation
pGEMTeasy	-	Amp ^R	Promega, Mannheim, Deutschland	-
petM41	-	Km ^R	Dr. A. Dickmanns	-
pUC18ENTRY	-	Amp ^R	Dr. E. Hornung	pUC18 Rückgrat mit MCS vom pENTR2b Vektor und die attL1 und attL2 Sequenzen des Gateway [®] -Systems
pCAMBIA3300-1GS	35S	Km ^R	Dr. E. Hornung	enthält Polylinker zwischen CaMV 35S-Promotor und CaMV 35S-Polyadenylierungssignal (E. Hornung, unveröffentlicht)

Bei den verwendeten *Escherichia coli*-Zellen handelte es sich um *E. coli* XL1blue, Genotyp *endA1, hsdR17, supE44, thi-1, rec A1, gyrA96, relA1, lac, [F', proAB, lacI^qZΔ15, Tn10(tet^R)]*, bezogen von Stratagene (La Jolla, CA, USA).

Bei den verwendeten Rosetta II Zellen handelte es sich um einen *E. coli* BL21 Stamm mit dem Genotyp *F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE2 (Cam^R)* von der Firma Novagen (Darmstadt, Deutschland).

2.6 Bakterienmedium für *E. coli*

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; (Leh und Brent, 1988))

0,1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut)

0,05 % (w/v) Hefeextrakt

0,17 M NaCl

Das Volumen wurde mit doppelt-distilliertem Wasser (ddH₂O) aufgefüllt, der pH 7,5 mit 1 M NaOH eingestellt, und das Medium anschließend bei 120 °C für 20 min autoklaviert (Autoklav, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland).

LB-Festmedium

Flüssiges LB-Medium wurde mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und autoklaviert.

Je nach Verwendungszweck wurden nach dem Abkühlen 50 µg mL⁻¹ Antibiotikum und/oder 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktosylpyranosid (IPTG) und 0,004 % 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal) für die Blau-Weiß-Selektion hinzugefügt.

2.7 Verwendete Oligonukleotide

s. Anhang

2.8 Pflanzenlinien

Kontrollpflanzen *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ökotyp Columbia-0

(Wildtyp)

InsP 5-Ptase *HsInsP-5Ptase* transgene Linie 2-8 (Perera et al., 2006); *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 transformiert mit *Agrobacterium tumefaciens*, Vektor pKYL71-35S² (enthält einen modifizierten 35S-Promotor, 6-His-Tag, die menschliche *Typ I InsP 5Ptase* *XbaI*-kloniert, die 3'-UTR der kleinen Rubisco-Untereinheit aus *Pisum sativum* als Terminator und eine pflanzliche Kanamycin-Resistenz-Kassette); transgene Samen für *InsP 5Ptase*-Pflanzen waren ein Geschenk von Dr. I. Perera, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.

2.9 Stammlösungen für hydroponisches Medium

Stammlösungen für hydroponisches Medium

Makroelemente

0,25	M	KNO ₃
13,6	mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
16,2	mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
26	mM	(NH ₄) ₂ HPO ₄

Mikroelemente

9,7	mM	H ₃ PO ₄
0,21	mM	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O
0,9	mM	MnSO ₄ x H ₂ O
11,8	mM	ZnSO ₄ x 7H ₂ O
2,1	mM	CoCl ₂ x 6H ₂ O
0,2	mM	CuSO ₄ x 5H ₂ O

Vitaminlösung

0,4	mM	Nicotinsäure
0,24	mM	Pyridoxin-HCl
29,6	µM	Thiamin-HCl
2,6	mM	Glycin
22,2	mM	myo-Inositol
4	mM	C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈
73	mM	Saccharose

Die Lösungen wurden durch Filtration (0,2 µm) sterilisiert.

Für das Medium wurden die Stammlösungen nach folgendem Schema vermischt:

	mL/L
Makroelemente	100
Mikroelemente	1
Vitaminlösung	1
Glycin	1
myo-Inositol	5
C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	5

Nach Zugabe der Saccharose wurde der pH-Wert mit NaOH auf 5,8 eingestellt, aufgefüllt wurde mit ddH₂O. Für Festmedium wurden 2,8 % (w/v) Gelrite (Roth) dazugegeben, anschließend wurde das Medium bei 120 °C für 20 min autoklaviert (Autoklav, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland).

2.10 Stammlösungen für hydroponisch wachsende Pflanzen

Stammlösungen

1 M	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH 7,2
1 M	MgCl ₂ x 6H ₂ O
1 M	MgSO ₄ x 7H ₂ O
1 M	Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O
1 M	KNO ₃
1 M	CaCl ₂
1 M	KCl

Spurenelemente

46 mM	H ₃ BO ₃
9 mM	MnCl ₂ x 2H ₂ O
750 µM	ZnSO ₄ x 7H ₂ O
318 µM	CuSO ₄ x 5H ₂ O
120 µM	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
ad 1 L ddH ₂ O	

Fe-Na-EDTA

80 mM	FeCl ₃ x 6H ₂ O
46 mM	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O
ad 1 L ddH ₂ O	

Stammlösungen, Spurenelemente und Fe-Na-EDTA-Lösung wurden nach folgendem Schema vermischt:

	Volumen der Stammlösung		Endkonzentration	
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	30	mL	0,5	mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	120	mL	2	mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	60	mL	1	mM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	210	mL	3,5	mM
KNO ₃	180	mL	3	mM
<u>Spurenelemente</u>	50	mL		
H ₃ BO ₃			38,5	μM
MnCl ₂ ·2H ₂ O			7,5	μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O			0,625	μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0,265	μM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O			0,1	μM
<u>Fe-Na-EDTA</u>	36	mL		
FeCl ₃ ·6H ₂ O				
FeCl ₃			48	μM
Na ₂ EDTA			27,4	μM
ddH ₂ O	60	L		

2.11 Wachstumsbedingungen und Kultivierung von Pflanzen

Pflanzen wurden auf Erde (Frühstorfer Erde Typ: T25 Str. 1 (Fein), Industrie Erdwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod, Deutschland) bei 22-25 °C ausgesät und für 5-7 Tage mit einer durchsichtigen Plastikhaube abgedeckt. Pro 500 mL-Topf wurden drei Pflanzen angezogen. Die Anzucht erfolgte in YORK-Klimakammern (Kälteanlage YORK Refrigeration, YORK Industriekälte GmbH & Co. KG, Mannheim, Deutschland) bei einer Lichtintensität von etwa 130-150 μmol Photonen m⁻²s⁻¹ (4 x 1,5 m-Leuchtstofflampen 58 W) unter Kurztagsbedingungen von 8 h Licht und 16 h Dunkelheit und einer Luftfeuchte von etwa 60 %. Nach den ersten drei Wachstumswochen wurde einmal pro Woche mit Wuxal Super (Manna, Ammerbuch, Deutschland) gedüngt. Bei Bedarf wurde gegen Pilzbefall mit einer Mischung aus gleichen Teilen Baymat, Antracol WG, Euparen M WG (Bayer Garten, Langenfeld, Deutschland) und Topas (Syngenta Agro, Maintal, Deutschland) gesprüht.

Arabidopsis Pflanzen für Salzstressversuche wurden zunächst steril 2-3 Wochen in Weckgläsern auf Festmedium für hydroponisch wachsende Pflanzen (s. 2.9) angezogen. Die *Arabidopsis* Pflanzen wurden zunächst in Pflanzenanzuchtskammern (Percival CU-36L/D -Klimaschränke, CLF Laborgeräte GmbH, Emersacher, Deutschland) bei einer Lichtintensität von etwa 130-150 μmol Photonen m⁻²s⁻¹ (4 x 1,5 m-Leuchtstofflampen 58 W) unter einem Regime von 14 h Licht und 10 h

Dunkelheit angezogen. Nach 3-4 Wochen wurden die Pflanzen in hydroponische Kulturen überführt.

Die hydroponischen Kulturschalen (14/6-2H, Innenmaß HöhexBreitexTiefe 100x430x275 mm; Schäfer, Hannover, Deutschland) wurden mit 12 L ddH₂O befüllt und anschließend die Pflanzen mit Schaumstoffstopfen in vorgebohrte Öffnungen der Einlegeplatte gehängt (Abb. 10). Die Pflanzen wurden über einen Plastikschauch (Durchmesser 1-2 mm) mit Luft begast (~ 0,1 bar pro Schale). Nach drei Tagen wurde das ddH₂O gegen Nährlösung für hydroponisch wachsende Pflanzen (s. 2.10.) ersetzt. Je nach Bedarf wurden die Pflanzen mit 1-2 mL Fe-Na-EDTA und KNO₃ (s. 2.10) gedüngt. Die hydroponischen Kulturbedingungen entsprachen denen der Pflanzen auf Erde (s.o.).

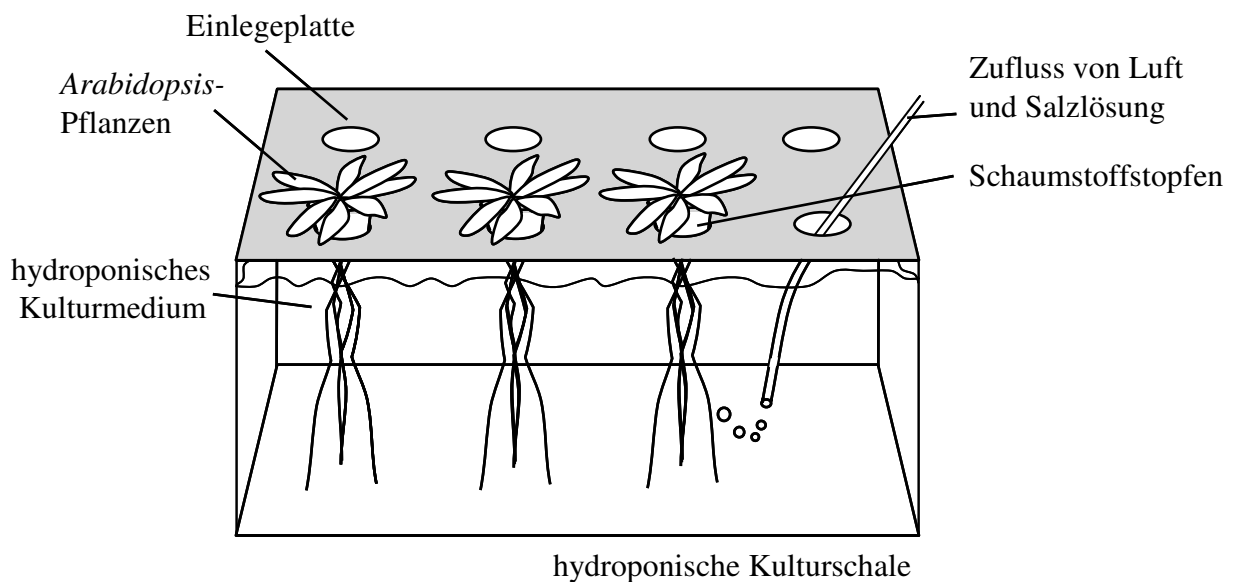


Abbildung 10: Aufbau der hydroponischen Kultur mit wachsenden Pflanzen. Die hydroponische Kulturschale wurde mit 12 L ddH₂O befüllt. Die *Arabidopsis*-Pflanzen aus Weckgläsern wurden mit Hilfe von Schaumstoffstopfen in die Ausbohrungen der Einlegeplatte gehängt, so dass die Wurzeln ins ddH₂O reichten und die Pflanzen oberhalb der Einlegeplatte wachsen konnten. Durch einen Schlauch wurden die Wurzeln mit Luft begast. Nach drei Tagen wurde das ddH₂O gegen Nährlösung für hydroponisch wachsende Pflanzen (s. 2.10.) ersetzt.

2.12 Ernte der Pflanzen

Pflanzen, die für subzelluläre Fraktionierungen bestimmt waren, wurden vor jeder Präparation frisch geerntet. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit einer Schere direkt

unterhalb der Rosettenblätter abgeschnitten, unmittelbar in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei Präparationen, bei denen die Organellen kein Einfrieren vertrugen, wurden die Rosettenblätter direkt in den jeweiligen vorgekühlten Aufschlußpuffern aufgenommen und unverzüglich mit der Präparation begonnen.

2.13 Anreicherung subzellulärer Fraktionen

Die subzelluläre Fraktionierung von Pflanzenmaterial beinhaltet drei prinzipielle Schritte. Der erste Schritt ist die Homogenisierung, in der der Zusammenschluss des Gewebeverbandes zerstört wird und in dem die Zellen aufgebrochen werden. Es wird ein „Homogenat“ erzeugt, in dem zunächst alle Zellbestandteile in gleichmäßiger Verteilung vorliegen. Der zweite Schritt beinhaltet die Anreicherung bestimmter Organellen aus dem Homogenat. Eine Trennung kann durch verschiedene Techniken erreicht werden, z.B. anhand der Partikelgröße durch Filtration, der Dichte durch Dichtezentrifugation in Saccharosegradienten oder anhand von Oberflächeneigenschaften bei der wässrigen Phasenpartitionierung. Ziel des zweiten Schrittes ist es, eine möglichst vollständige angereicherte Fraktion der gewünschten subzellulären Strukturen zu erzielen und gleichzeitig andere zelluläre Strukturen auszuschließen. Im dritten Schritt wird die erhaltene Fraktion auf ihre Reinheit untersucht. Hierzu werden charakteristische Markerenzyme über verschiedene Methoden nachgewiesen, wie z.B. über Immundetektion oder Enzymtests.

Der Aufschlußpuffer dient vor allem dem Schutz der isolierten Strukturen vor lytischer Degradierung. Da beim Aufschluß von Pflanzenmaterial die Zerstörung der Vakuole nicht vermieden werden kann, die lytische Enzymaktivitäten und saure Bestandteile enthalten, muß das Aufschlußmedium Komponenten enthalten, die die Degradation zellulärer Strukturen verhindern oder hemmen. So sind z.B. osmotisch stabilisierende Substanzen (Mannitol oder Saccharose 0,2-0,4 M), und Chelatoren (EDTA oder EGTA; 1-5 mM) für zweiwertige Ionen wie Calcium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}) wichtig, genauso wie der Einsatz von Proteaseinhibitoren (Aprotin, Leupeptin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)). Zusätzlich werden auch bis zu 0,2 % (w/w) fettsäurefreies Bovines Serum Albumin (FA-BSA) als kompetitives Substrat für Proteasen zugesetzt, um die Degradation der Proben zu minimieren. Bei der Anreicherung von subzellulären Fraktionen ist das Arbeiten bei niedrigen Temperaturen (auf Eis) wichtig.

Es gibt verschiedene Methoden pflanzliches Material mechanisch zu homogenisieren, von Rasierklingen über Mörser bis hin zum Polytron und Potter. Einzeller wie Algen oder Suspensionskulturen lassen sich gut durch schnelles Schütteln mit Glasperlen (Durchmesser: 0,3-0,5 mm) und die so entstehenden Scherkräfte oder durch plötzliche Druckveränderungen mittels „Frenchpress“ aufschließen. Die jeweiligen verwendeten Aufschlußmethoden sind in den folgenden Abschnitten für jedes Experiment gesondert angegeben.

2.13.1 Mikrosomen und Plasmamembranen

(Heilmann et al., 2001)

Geerntetes Pflanzenmaterial (50-100 g) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend zu feinem Pulver gemörsert. Um einen optimalen Aufschluss zu erreichen, wurde das Pulver in einem doppelten Volumen Aufschlußpuffer aufgenommen und 10-20-mal durch Auf- und Abbewegungen im Potter fein zerrieben. Durch Zugabe von 1-5 % Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) konnte eine Erhöhung der Reibewirkung erzielt werden.

Das Pflanzenhomogenat wurde in 50 mL Zentrifugengefäßen (SS34-Röhrchen, Sorval) für 15 min bei 3700 x g zentrifugiert (Festwinkelrotor, JA-25.50, Beckmann Zentrifuge Avanti™). Der Überstand wurde in ein neues 50 mL Zentrifugengefäß überführt und für 45 min bei 25500 x g zentrifugiert. Der entstandene Niederschlag repräsentierte die gesamten zellulären Membranen (Mikrosomen).

Die Mikrosomenpräparation wurde in 1 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) aufgenommen und auf Zweiphasen-Gradienten (s.u.) gegeben. Für die Isolierung von Plasmamembranen wurden Zweiphasen-Gradienten mit einer Dextrankonzentration von 6,3 % verwendet. Die Gradienten wurden 80-mal invertiert und dann bei 800 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Plastikpasteurpipette abgenommen und in ein neues 50 mL Zentrifugengefäß überführt. Die so angereicherten Plasmamembranen wurden dreimal mit THM-Puffer gewaschen. Dann wurde der Plasmamembran-Niederschlag in 50 mL THM-Puffer resuspendiert und bei 41000 x g für 20 min bei 4 °C sedimentiert.

Aufschlußpuffer

200 mM Saccharose
 30 mM Tris-HCl, pH 7,4
 14 mM β -Mercaptoethanol
 2 mM Dithiothreitol (DTT)
 3 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
 3 mM Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)
 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
 1, 5 % (w/v) Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)
 1 mg/100 mL Leupeptin

Aufbau der Zweiphasen-Gradienten

Vorgekühlte 15 mL Glasreaktionsgefäße wurden auf einer Waage in folgender Reihenfolge mit den angegebenen Gewichten der einzelnen Komponenten der Zweiphasen-Systeme befüllt (Abb. 12).

Dextrankonzentration			6,3 %
20	%	Dextran	2,52 g
40	%	Polyethylenglycol (PEG)	1,26 g
50	mM	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5	0,70 g
1	M	Saccharose	1,75 g
		ddH ₂ O	0,77 g

THM-Puffer

30 mM Tris-HCl, pH 7,4
 15 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)

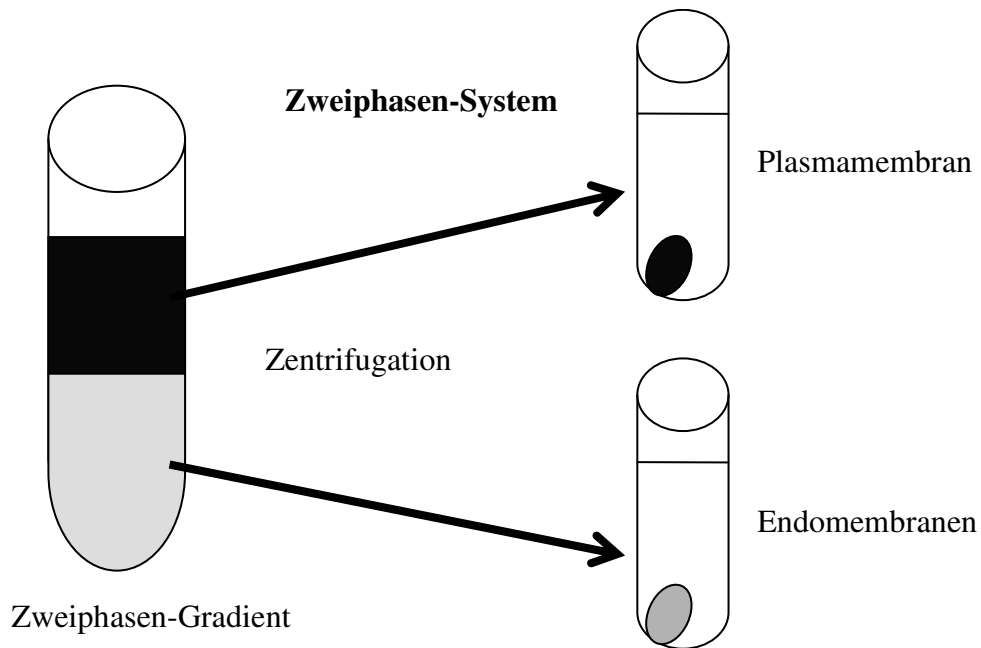


Abbildung 11: Aufbau eines Zweiphasen-Gradienten. Auf das Dextran-PEG-Gemisch wurde die Probe geladen, nach Zentrifugation trennt sich das Gemisch in zwei Phasen des Gradienten. Aus der oberen und unteren Phase können durch Zentrifugation Plasmamembran und Endomembranen angereichert werden.

2.13.2 Plasmamembranen und Detergenzien-unlösliche Membranen aus BY2-Zellen¹

Tabak (*Nicotiana tabacum*) Bright Yellow 2 (BY2) Suspensionskulturen wurden in 100 mL Kolben für 5 Tage bei 28 °C in BY2-Zellkulturmedium im Dunkeln angezogen und bei 220 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden alle sieben Tage umgesetzt (1/25 der Ausgangskultur umgesetzt in frisches Medium) und anschließend Plasmamembranen angereichert (Rochester et al., 1987). Aus den angereicherten Plasmamembranen wurden von Fabienne Furt (Bordeaux, Frankreich) Detergenzien-unlösliche Membranen (DIM) isoliert (Lefebvre et al., 2007).

¹ Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit F. Furt und Dr. S. Mongrand (CNRS, Bordeaux, Frankreich) durchgeführt. Isolierte Plasmamembranen und DIMs wurden mir dabei zur Analyse zur Verfügung gestellt.

BY2-Zellkulturmedium

4,4	g/L	Murashige und Skoog Medium
87,6	mM	Saccharose
2,72	mM	KH ₂ PO ₄
2,5	mM	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)
0,9	µM	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D)
2,9	µM	Thiamin
0,27	M	myo-Inositol

2.13.3 Endoplasmatisches Retikulum

(Gomord et al., 1997)

Pflanzenmaterial (50-100 g) wurde mit einer Rasierklinge kleingeschnitten, und pro 10 g Pflanzenmaterial wurden 10 mL vorgekühlter Homogenisationspuffer dazugegeben. Das so erhaltene Homogenat wurde durch eine Lage Miracloth filtriert und anschließend bei 6000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und größere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde auf ein 8 mL Kissen einer 50 %-igen Saccharoselösung (w/w) gegeben und das Reaktionsgefäß mit Homogenisationspuffer aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 100000 x g für 60 min bei 4 °C in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Membranen sammelten sich dabei an der Phasengrenze zum Saccharosekissen. Die Membranphase wurde vorsichtig mit einer Plastikpasteurpipette abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und mit Homogenisationspuffer ohne Saccharose weiter so verdünnt, dass die Endkonzentration der Saccharose unter 15 % (w/w) lag. Ein Gradient aus 8 mL 40 %, 10 mL 35 % und 9 mL 15 % Saccharose wurde hergestellt, mit den resuspendierten Membranen überschichtet und bei 100000 x g für 120 min bei 4 °C in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die rauhen ER-Membranen sammelten sich als Interphase zwischen den Saccharoseschichten mit 35 % und 40 %. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen und die Membranen in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Reaktionsgefäße wurden mit Homogenisationsmedium aufgefüllt und die Membranen bei 100000 x g für 60 min erneut sedimentiert. Der Niederschlag repräsentierte die angereicherte ER-Fraktion.

Basispuffer

40	mM	Hepes-NaOH, pH 7,5
10	mM	KCl

Homogenisationspuffer

0,4 M Saccharose
1 mM DTT
0,1 mM EDTA
3 mM MgCl₂
in Basisbuffer

Saccharoselösungen

40 %, 35 % bzw. 15 % (w/w) Saccharose in Basispuffer
0,1 mM EDTA
3 mM MgCl₂

50 % Saccharose in Basispuffer

3 mM EDTA
0,1 mM MgCl₂

2.13.4 Zellkerne

(modifiziert nach Hawes und Satiat-Jeunemaitra, 1994)

Pflanzenmaterial (50-100 g) wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff für 10-12 min fein gemörsert. Pro 10 g Pulver wurden 10 mL vorgekühlter Puffer A dazugegeben und das Gemisch für 30 s inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat durch Nylonnetze mit kleiner werdender Porengröße (250-80-20 µM) filtriert. Pro 10 mL Filtrat wurden 0,284 mL 20 % (w/w) Triton X-100 zugegeben und das Gemisch für 5 min auf Eis ruhen gelassen. Je 8 mL Filtrat wurden auf ein 15 mL Percollkissen (s.u.) gegeben und bei 3000 x g für 15 min und bei 4 °C zentrifugiert. Mittels dieser Methode sammelten sich Cytosol und lysierte Organellen an der Oberfläche, die Zellkerne sammelten sich an der grau-grünen Interphase zum Percollkissen, und im Pellet fanden sich Stärkekörner und große Zellwandfragmente. Percollkissen und Interphase wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen, im Volumenverhältnis 1:1 mit Puffer B verdünnt und bei 4 °C und 3000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in 10 mL Puffer B resuspendiert und bei 4 °C und 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Niederschlag repräsentierte die angereicherte Zellkernfraktion.

Puffer A

25	mM	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)
10	mM	KOH, pH 6,2
5,5	M	Glycerin
600	mM	Sorbitol
0,05	% (w/v)	Triton X-100
0,1	mg/mL	FA-BSA
0,5	mM	Dieethyldithiocarbamat (DEDTC)
0,1	mg/mL	Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)
5	mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
0,5	mM	Spermidin
0,2	mM	Spermin
0,5	mM	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (AEBSF)
10	mM	β -Mercaptoethanol

Puffer B

25	mM	MES
10	mM	KOH, pH 6,0
2	M	Glycerin
0,1	mg/mL	FA-BSA
0,5	mM	DEDTC
0,1	mg/mL	PVP-40
5	mM	EDTA
0,5	mM	Spermidin
0,2	mM	Spermin
10	mM	β -Mercaptoethanol

Percollkissen

25	mM	MES
8	mM	KOH, pH 6,2
2	M	Glycerin
2,0	% (w/v)	Triton X-100
0,1	mg/mL	FA-BSA
0,5	mM	DEDTC
0,1	mg/mL	PVP-40
5	mM	EDTA
0,5	mM	Spermidin
0,2	mM	Spermin
0,5	mM	AEBSF
10	mM	β -Mercaptoethanol
82	% (w/w)	Percoll

2.13.5 Aktincytoskelett

(Abe und Davies, 1991)

Pflanzenmaterial (50-100 g) wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Pro 1 g Frischgewicht wurde 1 mL Cytoskelett-Isolationspuffer (CSP)

dazugegeben. Das Homogenat wurde bei 1000 x g für 4 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand anschließend bei 40000 x g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5 mL CSP mit 1 % (w/w) Triton X-100 resuspendiert und auf Eis bei 110 rpm für 20 min geschüttelt. Die Tritonunlösliche Fraktion enthielt F-Aktin und wurde anschließend bei 50000 x g für 20 min bei 4 °C pelletiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit CSP plus Triton X-100 gewaschen, beim dritten Waschschrift wurde nur mit CSP gewaschen. Der erhaltene Niederschlag repräsentierte die angereicherte F-Aktin-Fraktion.

Cytoskelett-Isolationspuffer (CSP)

5	mM	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
3,2	mM	KOH, pH 7,5
10	mM	Magnesiumacetat
2	mM	EGTA
1	mM	PMSF
0,5	%	Polyoxyethylen Tridecylether (PTE)

2.13.6 Peroxisomen²

(Lopez-Huertas et al., 1999) (mit Unterstützung von Dr. Sigrun Reumann vor Ort)

Pflanzenmaterial (100 g) wurde mit einem scharfen Messer klein geschnitten und anschließend in einem großen Mörser (25 cm Ø) in einem Volumenverhältnis von 1:3 (Frischgewicht:Puffer) mit eiskaltem Aufschlußpuffer versetzt und zerrieben. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Das Homogenat wurde durch drei Lager Miracloth filtriert und das Volumen des Filtrates bestimmt. Das Filtrat wurde auf 50 mL Zentrifugengefäße verteilt und bei 4000 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugengefäße überführt und bei 25500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 mL Aufschlußpuffer aufgenommen und mit einem Pinsel durch Überschwemmen mit dem Aufschlußpuffer gelöst. Der direkte Kontakt zwischen Pinsel und Niederschlag wurde dabei vermieden. Die aus zwei bis acht Parallellproben resuspendierten Niederschläge wurden vereinigt, und in einem Glaspotter durch langsames und vorsichtiges Bewegen 10-15-mal homogenisiert. Drei bis vier mL (nicht mehr als 1 g Frischgewicht) der Suspension wurden auf einen Saccharosegradienten von 60 %-15 % Saccharose gegeben und die Gradienten bei 100000 x g in einem Ausschwingrotor für 120 min bei

² Analysen angereicherter Peroxisomen lieferten nur schwer auswertbare Ergebnisse, die letztendlich nicht weiter verfolgt wurden. Die Isolierung wird aber der Vollständigkeit halber dennoch beschrieben.

4 °C zentrifugiert. Die Peroxisomen wurden bei dieser Behandlung als grüne Bande an der Interphase zwischen 60 % und 50 % Saccharose sichtbar. Die Interphase wurde mit einer Plastikpasteurpipette entfernt und in einem Glaspotter durch 10-maliges Bewegen von grünen Partikeln getrennt. Die Saccharosekonzentration der peroxisomenhaltigen Interphase wurde mit einem Refraktometer (Zeiss, Göttingen, Deutschland) bestimmt und mit 15 % Saccharoselösung auf eine Endkonzentration von 48 % eingestellt. Die so behandelten Fraktionen wurden auf je ein 2 mL 60 % Saccharosekissen geschichtet, mit 10 mL vorgekühlter 45 % Saccharoselösung überschichtet und die Reaktionsgefäße mit 35 % Saccharoselösung aufgefüllt. Die Gradienten wurden bei 100000 x g für 120 min bei 4 °C zentrifugiert. Die angereicherten Peroxisomen sammelten sich als Niederschlag am Boden des Gradienten.

Aufschlusspuffer

50	mM	Tricin, KOH, pH 7,5 (1 M Stock)
0,45	M	Saccharose
1	mM	EDTA (200 mM Stock)
10	mM	KCl (1 M Stock)
1	mM	MgCl ₂ (1 M Stock)
0,1	% (w/v)	BSA
0,6	% (w/v)	PVP
5	mM	DTT (frisch)

Saccharoselösungen

(w/w) Saccharose	pro 100 mL		
	Saccharose (g)	Tricin (5 mM)	EDTA (1 mM)
25 % Saccharose	27,6	0,5 mL	1 mL
60 % Saccharose	78	0,5 mL	1 mL

Alle weiteren Saccharosekonzentrationen wurden durch gegenseitiges Verdünnen aus 60 % und 25 % Saccharose erstellt.

2.13.7 Clathrin-beschichtete Vesikel (CCVs)

(Robinson und Hinz, 2001)

Pflanzenmaterial (50-70 g) wurde in vorgekühltem Aufschlusspuffer (1 g Pflanzenmaterial pro 1 mL Aufschlusspuffer) aufgenommen und im Polytron (PCU-2, Typ 10203500, Kinematic, Luzern, CH) bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min auf Eis aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch drei Lagen Miracloth filtriert und anschließend bei 8000 x g für 50 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und anschließend bei 186000 x g in einer Ultrazentrifuge für 90 min bei 4 °C

zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in ein bis zwei Volumina Puffer A aufgenommen und in einem Glaspotter mit 10-15 Bewegungen homogenisiert. Die so resuspendierten Niederschläge wurden mit gleichen Volumina Ficoll/Saccharoselösung vermischt und bei 43000 x g für 40 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren im klaren Überstand die CCVs angereichert. Der Überstand wurde mit drei bis vier Volumina kaltem Puffer A plus 0,1 mM PMSF verdünnt und die CCVs dann durch eine weitere Ultrazentrifugation bei 186000 x g für 90 min bei 4 °C sedimentiert.

Aufschlusspuffer

200	mM	Saccharose
30	mM	Tris-HCl, pH 7,4
14	mM	β-Mercaptoethanol
2	mM	DTT
3	mM	EDTA
3	mM	EGTA
1,5	% (w/v)	PVPP
1	mM	PMSF
1	mg/100mL	Leupeptin

Puffer A

0,1	M	MES, pH 6,5
0,5	mM	MgCl ₂
1,0	mM	EGTA
0,02	%	Natriumazid (NaN ₃)
0,1	mM	PMSF wurde erst kurz vor Gebrauch zugegeben

Protease-Inhibitoren

0,1	M	PMSF in MeOH
2	μM	Leupeptin
0,7	μM	Pepstatin
2	μg/mL	Aprotinin

Ficoll/Saccharoselösung

12,5	%	Ficoll 400
12,5	%	Saccharose
in Puffer A, pH 6,5		

Da sich Ficoll nur schlecht löste, wurde die Lösung über Nacht bei 4 °C gerührt und für weitere Schritte bei 4 °C aufbewahrt.

2.14 Nachweis für Plasmamembrananreicherung durch Bindung von Concanavalin A

(Berkowitz und Travis, 1981)

Concanavalin A (Con A) aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) ist ein Lektin, welches spezifisch Mannosyl- und Glukosylreste, die mit Membranen assoziiert sind, bindet. Diese Bindung kann als Nachweis für das Vorliegen von Plasmamembranen dienen (Berkowitz und Travis, 1981). Das hier verwendete Con A (FITC-Con A, Sigma, München, Deutschland) war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert, das bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden konnte.

Angereicherte Fraktionen von Mikrosomen und Plasmamembranen wurden für 80 min bei Raumtemperatur im Reaktionspuffer mit Con A (16 %) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen bei 20000 x g für 15 min bei 4 °C sedimentiert und zweimal mit Reaktionspuffer ohne Sorbitol gewaschen. 50 µL der markierten Membranen wurden in jeweils eine Vertiefung auf eine 96-Mikrotiterplatte (Bio-Tek, Bad Friechshall, Deutschland) verteilt und die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzgerät bei 525 nm (Synergy HT, Bio-Tek, Bad Friechshall, Deutschland) und einer Anregung von 488 nm, gemessen.

Reaktionspuffer

0,25	M	Sorbitol
1	mM	Tris-Hepes, pH 7,2

2.15 Nachweis für Zellkernanreicherung durch DAPI Färbung

Die angereicherte Fraktion der Zellkerne wurde in 2-5 mL ddH₂O aufgenommen und mit 1 mg/mL 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. DAPI-Färbung wurde bei 358 nm angeregt und die Emission bei 460 nm im Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Olympus BX51). Anschließend wurden die angereicherten Zellkerne unter dem Mikroskop in der Zählkammer ausgezählt.

2.16 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinmengen wurden mittels Proteinbestimmung nach Bradford photometrisch bei 595 nm quantifiziert (Bradford, 1976). Dabei wurde BSA als Eichprotein verwendet.

2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die eindimensionale Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). Hierzu wurde ein Gemisch aus Proteinen mit fünffach konzentriertem Ladepuffer versetzt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Das verwendete Laemmli-System bestand aus einem Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration vom gewünschten Auftrennungsbereich abhing, und einem Sammelgel, mit dem das auspolymerisierte Trenngel überschichtet wurde. Das Trenngel wurde im unpolymerisierten Zustand zwischen zwei Glasplatten gegossen und sofort mit reinem Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol entfernt, das Sammelgel eingegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach Polymerisation konnte der Probenkamm entfernt werden. Pro Geltasche wurden 10-20 µL der denaturierten Proben aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte in der Gelelektrophoreseapparatur (Mini PROTEAN[®]3, Biorad, Hercules; USA, Abb. 12A) zunächst für 20 min bei einer Stromstärke von 25 mA bis zum Erreichen des Trenngels und anschließend für 40-45 min bei 60 mA.

SDS-Polyacrylamidgele wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Nachdem die Gele für etwa 30 min in der Färbelösung gefärbt waren, wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt. Coomassiegefärbte Proteingele wurden digital dokumentiert. Die Intensitäten von Proteinbanden wurden mit dem Aida Image Analyzer v3.24 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde die Hintergrundfärbung subtrahiert

SDS-PAGE-Puffer

Tris-HCl, pH = 8,45	3	M
SDS	0,3	% (w/v)

Trenngel (10 %)

SDS-PAGE-Puffer	1,65	mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	1,7	mL
25 % Ammoniumpersulfat (APS) (w/v)	25	µL
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5	µL
ddH ₂ O	1,65	mL

Sammelgel (4,8 %)

SDS-PAGE-Puffer	1,55	mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	1,2	mL
25 % APS (w/v)	25	µL
TEMED	25	µL
ddH ₂ O	4	mL

SDS-Probenpuffer (5x)

Tris-HCl, pH 6,8	225	mM
Glycerin	5	%
SDS-Lösung	5	%
Bromphenol-Blau	0,05	%
DTT	250	mM

Coomassie-Färbelösung

MeOH	40	% (v/v)
Essigsäure	10	% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G250	0,25	% (w/v)

Entfärbelösung

MeOH	10	% (v/v)
Essigsäure	7	% (v/v)

2.18 Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen auf Nylonmembranen

Um spezifische Proteine mit Hilfe von Antikörpern immunologisch nachzuweisen, trennt man sie zuerst über SDS-PAGE elektrophoretisch auf. Anschließend werden die Proteine im Elektroblobverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen („Blot“). Für das Blotten wurde eine Nassblot-Apparatur (Elektrophoreseapparatur, Biorad, München, Deutschland) verwendet (Abb. 12A).

A



B

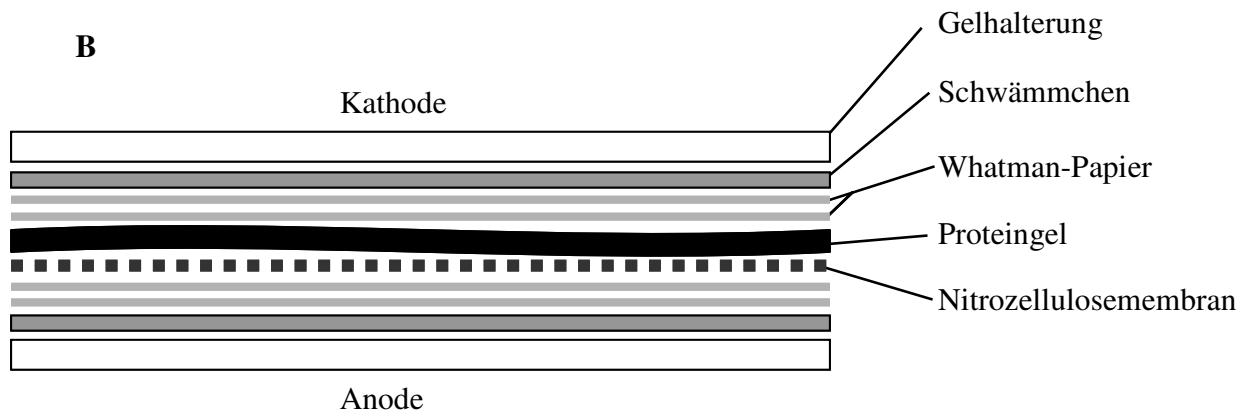


Abbildung 12: Bestandteile der Nassblot-Apparatur und Aufbau eines Immun-Blots. A, Folgende Bestandteile waren in der verwendeten Nassblot Apparatur von der Firma Biorad enthalten, Eisakku, Schwämmchen, Gelhalterung, Gelhalterungskassette und die Blot-Apparatur. B, Aufbau eines Western Blots. Details im Text.

Die Gelhalterung wurde in eine Schale mit Transferpuffer gelegt. Auf die untere schwarze Seite der Halterung (Minuspol) wurde ein angefeuchtetes Schwämmchen gelegt. Dann wurden zwei Whatman-Papiere, die ebenfalls mit Transferpuffer getränkt waren, auf die Schwämmchen platziert. Anschließend wurde das Gel auf das Whatman-Papier gelegt. Beim Auflegen der Nitrozellulosemembran (Nitrozellulosemembran Roti-Nylon 0,2 Transfermembran, 0,2 μm ; Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde eine Markierung an der Nylonmembran angebracht und darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Auf die Nylonmembran wurden zwei Whatman-Papiere und ein Schwämmchen, die ebenfalls in Transferpuffer getränkt waren

geschichtet (Aufbau s. Abb. 12B). Die Gelhalterung wurde durch eine Schiebvorrichtung an der Halterung verschlossen und die Gelhalterung in die Gelhalterungskassette eingesetzt, die dann zusammen mit dem Eisakku in die Blotapparatur gestellt wurde. Die Blotapparatur wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und für 1 h bei 60 V angeschlossen.

2.19 Immundetektion spezifischer Proteine

Zur Immundetektion wurden jeweils zwei verschiedene Antiseren zur indirekten Detektion verwendet. Das primäre Antiserum band dabei spezifisch an das Protein und wurde selbst vom sekundären Antiserum gebunden. Das sekundäre Antiserum enthielt Antikörper die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Mit Hilfe der Substrate Natriumnitro-Tetrazoliumblau (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (X-Phosphat) bildet die alkalische Phosphatase einen rosa-violetten Farbstoff, der als unlösliche Substanz ausfällt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurde diese nach dem Blotten zunächst über Nacht in einer Blockierungslösung (5 % (w/v) BSA in TBS-Puffer) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 2 min in TBST-Puffer gewaschen und über Nacht mit dem primären Antiserum inkubiert und danach 3 x für je 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie für 3 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der anschließend dreimal für je 10 min mit TBST-Puffer ausgewaschen wurde. Membranen wurde für 10 min in TBS-Puffer und 15 min in AP-Puffer gewaschen, bevor sie mit den Färbesubstraten inkubiert wurden, bis eine ausreichende Färbung sichtbar wurde. Die Färbereaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Intensität mit ddH₂O gestoppt.

Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer:

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

10 x TBS-Puffer:

Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
NaCl	500 mM

10 x TBST-Puffer:

Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	0,1 % (w/v)

Transferpuffer (Westernblot):

Tris	0,582 % (w/v)
Glycin	0,293 % (w/v)
SDS	0,375 % (w/v)
MeOH	20 % (v/v)

Färbelösung:

10 mL AP-Puffer

35 µL X-Phosphat (50 mg/mL in 100 % Dimethylformamid, DMF)

45 µL NBT (75 mg/mL in 70 % DMF)

Gele und Blots wurden digital aufgenommen und gespeichert.

2.20 Lipidanalytik**2.20.1 Spezifischer Kopfgruppennachweis für PtdIns(4,5)P₂**

Zum Nachweis des salzinduzierten PtdIns(4,5)P₂-Anstiegs wurden 50 mg gemörsertes Pflanzenmaterial nach der Methode von Chilvers (Chilvers et al., 1991) mit dem Kit „D-myo-Inositol(1,4,5)P₃ [³H] Biotrak Assay System“ (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers auf den Gehalt von PtdIns(4,5)P₂ getestet. Diese Analysen wurden von Alina Mosblech durchgeführt und mir als Kontrolldaten zur Verfügung gestellt.

2.20.2 Fettsäurebestimmung von PIs

Zur biochemischen Analyse der Lipidmuster der angereicherten Organellen und salzgestressten Pflanzen wurden Lipidextrakte hergestellt und über DC aufgetrennt. Die einzelnen Lipide konnten dann direkt sichtbar gemacht werden (s. 2.20.4) oder wurden aus den Kieselgelplatten extrahiert und durch GC qualitativ und quantitativ analysiert. Die nötigen Arbeitsschritte sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.20.3 Quantitative Extraktion anionischer Phospholipide durch saure Lipidextraktion

(Cho et al., 1992)

Mindestens 0,5 g gemörsertes Pflanzenmaterial oder angereicherte Organellenfraktionen wurden in Wheaton-Glasgefäße mit Teflon-Schraubverschluss überführt, in denen 2 mL Extraktionslösung vorgelegt war. Die Proben wurden über

Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ extrahiert. Zur Phasenbildung wurde 1 mL ddH₂O zugegeben und die Proben gut durchmischt. Um eine schnellere Phasentrennung zu erzielen, wurden die Proben bei 800 x g für 2 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und die organische Phase mit einer Glaspasteurpipette in ein neues Glasgefäß überführt. Die wässrige Phase wurde mit 1 mL CHCl₃ reextrahiert und mit der ersten CHCl₃-Phase vereinigt. Die organischen Phasen wurden mit 1,5 mL Waschlösung rückextrahiert, abgenommen und in ein drittes Glasgefäß überführt. Die Proben wurden unter Stickstoffstrom bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ verdampft und für die weitere Bearbeitung in 500 µL CHCl₃ aufgenommen.

Extraktionslösung

CHCl₃:MeOH:HCl (1 N) (40:80:1) (v/v/v)

Waschlösung

HCl (0,5 M) in MeOH:ddH₂O (1:1) (v/v)

2.20.4 Trennung von Lipiden durch DC

Um einzelne Lipidklassen voneinander getrennt untersuchen zu können, wurden diese zunächst über DC separiert. Hierzu wurden die Proben 1 cm vom unteren Rand einer Kieselgel-Platte (S60, 20x20 cm, Merck) entfernt nebeneinander aufgetragen. Das Auftragen erfolgte mit einem automatischen Auftragsroboter (TLC Sampler 4, CAMAG, Muttenz, CH). Zur Identifizierung der Lipide wurden zusätzlich authentische Standards mitaufgetragen. Um einen möglichst gleichmäßigen Chromatographielauf zu erhalten, mussten die Chromatographiekammern mit dem jeweiligen Laufmittel gesättigt sein. Deshalb wurde Laufmittel schon etwa 1 h vor dem Lauf in die Laufkammern gefüllt. Die Sättigung der Laufkammer wurde durch ein senkrecht stehendes Filterpapier unterstützt.

Nachdem die chromatographische Trennung abgeschlossen war, wurden die Platten aus der Laufkammer genommen und im Abzug an der Luft getrocknet. Plattenabschnitte mit den Standards wurden mit einem Glasschneider abgeschnitten und für 8 s in eine wässrige Lösung aus 0,6 mM Kupfersulfat (CuSO₄) und 8 % Phosphorsäure (H₃PO₄) getaucht. Nach kurzem Trocknen wurden die Plattenabschnitte auf einer Heizplatte auf $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, um die Lipide durch Veraschung des Kohlenstoffes sichtbar zu machen. Die verkohlten Lipidstandards dienten als Orientierungshilfe, um die zu analysierenden Lipide von der restlichen, ungefärbten Platte auszukratzen. Das ausgekratzte Silikapulver wurde in 10 mL Wheaton-Glasgefäße überführt und durch Zugabe der Extraktionslösung über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aus dem Kieselgel extrahiert. Die in der

Extraktionslösung gelösten Lipide wurden in ein neues Wheaton-Glasgefäß überführt und im Stickstoffstrom bis zur Trockene verdampft.

Laufmittel

Zur Trennung von Phospholipiden: Methylacetat/2-Propanol/CHCl₃/MeOH/KCl (25 % wässriger Lösung) (25:25:25:10:9) (v/v/v/v/v)

Zur Trennung von PIs: CHCl₃/MeOH/NH₄OH/ddH₂O (57:50:4:11) (v/v/v/v)

Zur Trennung von Glykolipiden: Aceton/Toluol/ddH₂O (91:30:7) (v/v/v)

Tabelle 4: verwendete Lipidstandards

Standard	eingesetzte Menge	Lösungsmittel	Quelle
DAG	5 µg	CHCl ₃	Sigma
DGDG	5 µg	CHCl ₃	Sigma
MGDG	5 µg	CHCl ₃	Sigma
PtdCho	5 µg	CHCl ₃	Sigma
PtdEtn	5 µg	CHCl ₃	Sigma
PtdGro	5 µg	CHCl ₃	Sigma
PtdIns	5 µg	CHCl ₃	Avanti
PtdIns(4,5)P ₂	5 µg	CHCl ₃	Avanti
PtdIns4P	5 µg	CHCl ₃	Avanti
PtdOH	5 µg	CHCl ₃ :MeOH (2:1)	Sigma

2.20.5 Transmethylierung veresterter Fettsäuren mit Natriummethoxid

Um die Gesamtgehalte komplexer Lipide anhand der Gehalte veresterter Fettsäuren analysieren zu können, wurden diese mit Natriummethoxid transmethyliert. Das Alkoholat Natriummethoxid diente bei dieser Umesterung als Nucleophil, das die Esterbindung zwischen der Fettsäure und dem Lipidrückgrat angriff. Hierfür wurde der im Wheaton-Gefäß getrocknete Lipidmantel in 333 µL MeOH/Toluol (2:1) aufgenommen, mit 167 µL 0,5 M Natriummethoxid und 5 µg internem Standard (Tripentadecanoin) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mL 5 M NaCl-Lösung und von 50 µL 32 %-iger HCl gestoppt. Die entstandenen Fettsäuremethylester wurden zweimal durch Zugabe von 2 mL n-Hexan extrahiert und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die Hexanphase wurde mit 2 mL ddH₂O gewaschen und unter Stickstoff verdampft. Die Fettsäuren wurden in 100 µL Acetonitril aufgenommen und im

Stickstoffstrom auf ein Volumen von 5 μL eingengt. Die Proben wurden bis zur gaschromatographischen Messung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.20.6 Gaschromatographische Analyse von Fettsäuregemischen

Die GC dient zur Auftrennung von Stoffgemischen in ihre einzelnen chemischen Bestandteile. Da es sich bei der mobilen Phase dieser Chromatographieart um ein inertes Gas (hier Helium) handelt, ist sie nur auf Substanzen anwendbar, die gasförmig sind oder sich verdampfen lassen. Die Trennungswirkung beruht auf einer unterschiedlich starken Adsorption der Analyten an die stationäre Phase (hier mit Polyimid beschichtetes Quarzglas). Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor. Zur Detektion wurden die Analyten dabei in eine Knallgasflamme geleitet und dort thermisch ionisiert, was zu einem definierten elektrischen Signal führt. Alternativ wurde ein Gaschromatograph gekoppelt an ein Massenspektrometer verwendet. Hierbei werden die Analyten durch Elektronenbeschuss ionisiert und gegen einen Detektor beschleunigt. Aus der gemessenen Ladung konnte dann die Masse der entstandenen Fragmente ermittelt werden.

Chromatographiebedingungen:

Die Proben wurden in einem GC6890 Gaschromatographen mit Flammen- Ionisations-Detektor (Agilent, Böblingen, Deutschland), bestückt mit einer 30 m x 250 μm DB-23 Säule (Agilent) analysiert. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Die Proben wurden bei einer Temperatur von $220\text{ }^\circ\text{C}$ injiziert. Nach 1 min bei $150\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Ofentemperatur mit einer Geschwindigkeit von $8\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ auf $200\text{ }^\circ\text{C}$, dann mit einer Geschwindigkeit von $25\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ auf $250\text{ }^\circ\text{C}$ erhöht und anschließend für 6 min konstant auf $250\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Die Fettsäuren wurden anhand eines bekannten Standardgemisches (Fettsäure-Methylester-Mischung, F.A.M.E. Mix, C4-C24) identifiziert und über den Vergleich mit internem Standard quantifiziert.

2.21 Analyse spezifischer Protein-Lipid-Interaktionen

Um spezifische Lipid-Protein-Interaktionen nachzuweisen, wurden käuflich erhältliche Lipidbindungsstreifen eingesetzt. Die Lipidbindungsstreifen bestehen aus einer

2 x 6 cm großen hydrophoben Membran, auf der 15 verschiedene biologisch aktive Lipide immobilisiert sind. Durch Inkubation rekombinanter Proteine oder Peptide mit den Lipidbindungsstreifen kann getestet werden, ob die Proteine an die immobilisierten Lipide binden. Gebundene Proteine lassen sich anschließend durch Immundetektion nachweisen. Die Lipidbindungsstreifen wurden über Nacht bei 4 °C mit 3 %-FA-BSA in TBST blockiert. Anschließend wurden verschiedene rekombinante Proteine in einer Konzentration von 0,5 µg/mL in 3 %-FA-BSA auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal für 10 min mit 3 %-FA-BSA in TBST gewaschen. Das primäre Antiserum wurde in 3 %-FA-BSA in TBST auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Das primäre Antiserum wurde dreimal für 10 min mit 3 %-FA-BSA in TBST abgewaschen. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben und für 2-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde dreimal für 10 min mit 3 %-FA-BSA in TBST abgewaschen. Anschließend wurde die Membran für 10 min in AP-Puffer inkubiert, worauf die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase folgte, wie in Abschnitt 3.19. für die Immundetektion beschrieben.

2.22 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Um cDNA-Bereiche zu klonieren, wurde Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und gewünschte cDNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die cDNA-Fragmente wurden über präparative Agarosegele isoliert oder direkt aus den PCR-Ansätzen gereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation in den pGEM[®]-T Easy-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland). Für die weitere Klonierung in verschiedene Expressionsvektoren (s. 2.5.) wurden die cDNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen aus dem pGEM[®]-T Easy-Vektor rausgeschnitten. Die hierfür notwendigen Schnittstellen wurden zuvor bei der Amplifikation mit geeigneten Primern in die Sequenz eingeführt. Die cDNA-Fragmente wurden über die entsprechenden Schnittstellen in den Expressionsvektor ligiert. Anschließend konnten die Konstrukte in verschiedene Zielorganismen, wie *E. coli* oder Zwiebelepidermiszellen transformiert werden. Die Vorgehensweise wird in den folgenden Abschnitten im Detail erläutert.

2.22.1 Herstellung von DEPC-behandeltem ddH₂O

RNA ist besonders anfällig gegenüber Degradation. Deswegen wurden alle verwendeten Lösungen mit ddH₂O angesetzt, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma) behandelt wurde. Dazu wurde 1 mL DEPC zu einem Liter ddH₂O gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das verbliebene DEPC wurde durch Autoklavieren zerstört.

2.22.2 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Für die Präparation der zu analysierenden RNA wurde die Methode von Logemann (Logemann et al., 1987) folgendermaßen modifiziert:

Gefrorenes Pflanzenpulver (5-10 mL) wurde in vorgekühlte 50 mL-Plastikgefäße gefüllt, auf Eis mit 10 mL Extraktionspuffer (4 M Guanidinisothiocyanat; 50 mM Na-Citrat, pH 4; 0,5 % (w/w) N-Lauryl-Sarcosyl; 0,1 % β-Mercaptoethanol (v/v)) und 10 mL ddH₂O-gesättigtem Phenol versetzt und durchmischt. Phenol wurde vor der Verwendung zum Extrahieren von Proteinen mit einer wässrigen Lösung gesättigt, um einen Verlust der wässrigen Nukleinsäurelösung durch Übergang in die phenolische Phase zu vermeiden. Anschließend wurden 4 mL CHCl₃ hinzu gegeben, die Proben für 5-10 min erneut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurde für 10 min bei 4 °C und 3200 x g zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues 50 mL-Plastikgefäß überführt, mit 10 mL Isopropanol versetzt, durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3200 x g wurde der Niederschlag über Nacht mit 5-10 mL 75 % EtOH (v/v) (mit DEPC-ddH₂O angesetzt) bei -20 °C gewaschen. Am nächsten Tag wurde erneut für 10 min bei 4 °C und 3200 x g zentrifugiert und der Niederschlag an der Luft getrocknet. Auf den trockenen Niederschlag wurden zunächst 100 µL DEPC-ddH₂O gegeben, für 0,5–1 h inkubiert, die Lösung in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und die optische Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt (Photometer Ultrospec. 1100 pro, GE Healthcare Life Science München, Deutschland). Es wurden erneut 100 µL DEPC-ddH₂O auf den Niederschlag gegeben und die Lösung in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und die OD bestimmt. Anschließend wurden die beiden Volumina zusammengeführt und die Endkonzentration berechnet. Zur Bestimmung der OD wurden 5 µL RNA-Extrakt mit 995 µL DEPC-ddH₂O

gemischt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei $40 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$.

2.22.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Revert Aid H.minus M-MuLV, MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) wurde in der extrahierten Gesamt-RNA enthaltene mRNA nach Herstellerangaben in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Enzym benutzt eine RNA-Matrize, um ausgehend von einem Primer cDNA zu synthetisieren (Gerard und d'Alessio, 1993). Für die vollständige und spezifische Transkription am 3'-Ende wurde ein Oligo(dT)₁₈-Primer verwendet. Die verwendete Reverse Transkriptase Revert Aid H.minus M-MuLV besitzt eine Punktmutation in der RNase H-Domäne, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, vollständige cDNA auch im Bereich der 5'-Enden zu erhalten, da der Abbau der RNA-Matrizen verlangsamt wird. $5 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurden zusammen mit $0,5 \mu\text{g}$ Oligo(dT)₁₈ Primern mit DEPC-ddH₂O auf ein Endvolumen von $11,5 \mu\text{L}$ gebracht, für 5 min bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert (Heizblock Thermomixer HTM 130, HLC Bio Tech, Bovenden, Deutschland), um Sekundärstrukturen der RNA zu brechen, und wurde anschließend auf Eis abgekühlt, damit die Primer-Anlagerung stattfinden kann. Für jede Probe wurden $4 \mu\text{L}$ fünffach konzentrierter Reaktionspuffer, $2 \mu\text{L}$ dNTP-Mix (10 mM je dNTP), $0,5 \mu\text{L}$ (20 U) Ribonukleaseinhibitor dazupipettiert und die Proben mit DEPC-ddH₂O auf ein Endvolumen von $18 \mu\text{L}$ gebracht. Dieses Gemisch wurde für 5 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, anschließend wurden 100 U Reverse Transkriptase hinzugefügt und für 60 min bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion der Reversen Transkriptase wurde durch Erhitzen auf $70 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min und anschließendes Abkühlen auf Eis gestoppt.

2.22.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten oder RNA. Als Lauf- und Gelpuffer diente 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,3; 2 mM EDTA). 1% (w/v) Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer mit Hilfe der Mikrowelle aufgeköcht und zum Polymerisieren in eine Gelapparatur gegossen.

Die aufzutragenden Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, $0,5 \text{ M}$ Saccharose, 250 mM EDTA, $0,4 \%$ Orange G)

versetzt. Als Größenmarker dienten 3-4 μL einer 1 kb-DNA-Leiter. Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophoreseapparatur bei einer Spannung von 70-100 V (miniPROTEAN 3-Elektrophoreseapparatur, Biorad, München, Deutschland).

Zum Anfärben der DNA wurde das Agarosegel nach Beenden des Laufs für 10-15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (etwa $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) inkubiert und anschließend unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) im Gel-Detektionssystem AIDA (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) sichtbar gemacht und fotografiert (Programm DIANA).

2.22.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöcken nach Elektrophorese erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. DNA-Fragmente wurden alternativ auch direkt aus den PCR-Ansätzen über das *Nucleo-Spin Extract II Kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.22.6 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA-Fragmente zu analytischen oder präparativen Zwecken zu restringieren, wurden Restriktionsenzyme verwendet. Es wurde die gewünschte Menge an DNA (2-4 μg) mit der erforderlichen Menge an Restriktionsenzym (10-20 U) für 1-2 h unter nach Herstellerangaben für das Enzym optimalen Bedingungen (Puffer, Temperatur, BSA-Zusatz) inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde entweder durch Hitzeinaktivierung bei $75 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min oder durch Zugabe von DNA-Ladepuffer (s.2.22.4.) mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung gestoppt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die dafür angepassten Enzymmengen und Reaktionsbedingungen verwendet. War ein Parallelverdau aufgrund der empfohlenen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut. Der erste Verdau erfolgte dann mit dem Enzym, das den Restriktionspuffer mit der geringeren Salzkonzentration benötigt. Dabei wurde das Volumen des Restriktionsansatzes halbiert, um beim zweiten Verdau die Salzkonzentration für das zweite Enzym anpassen zu können.

2.22.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Wahrscheinlichkeit von Religationen zu verhindern, wurden die verwendeten Vektoren vor der Ligation dephosphoryliert.

Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (1 U pro pmol 5'-Enden) in mitgeliefertem Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch getrennt und aus dem Gel extrahiert (s. 2.22.5).

2.22.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurden 40 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µL in Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase inkubiert. Die Ligation fand über Nacht bei 4 °C statt.

2.22.9 Klonierung mit dem Gateway System®

Die Gateway® Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, welche sich die gerichtete Rekombination des Bakteriophagen Lambda zur Nutze macht, um einen schnellen und effizienten Austausch von DNA in gewünschte Zielvektoren zu ermöglichen. Die gerichtete Rekombination erfolgt über flankierende Adaptersequenzen des zu transformierenden Gens (attL1 und attL2), die den Austausch des zwischen den Zieladaptoren attR1 und attR2 befindlichen Genabschnitts des Zielvektors bewirken. Die attL × attR Reaktion wurde durch den LR Clonase™ II Enzym Mix vermittelt. CcdB ist ein Gen, welches das Wachstum von *E. coli* unterdrückt und so eine Gegenselektion nicht rekombinierter Zielvektoren bewirkt.

In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden jeweils 75 ng DNA vorgelegt und mit 1 x TE Puffer auf 4,5 µL aufgefüllt. Der LR Clonase™ II Enzymmix wurde auf Eis aufgetaut und gründlich gemischt. Dann wurden zu jedem Reaktionsansatz 0,5 µL Clonase™ dazugegeben und für eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Anschließend konnte die Reaktion mit 1 µL Proteinase K-Lösung abgestoppt werden und direkt für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet werden.

Das für Clathrin kodierende cDNA-Fragment wurde als NcoI/NotI -Fragment in den Eingangsvektor pENTR2b-EYFP (von Dr. Irene Stenzel) gebracht. Die cDNA Fragmente für die MORN-Domänen der PIP-Kinasen wurden mit den folgenden Restriktionsenzymen in den Expressionsvektor pET-M41 kloniert: PIPK1, 3 und 4,

NcoI/NcoI; PIPK2, PciI/PciI; PIPK5 und 6, BspHI/NotI; PIPK7 bis 9, NcoI/NotI. Das ARC3-Fragment wurde als EcoRI/NotI-Fragment in den pET-M41 Vektor kloniert.

Reaktionsansatz

Eingangsvektor	75 ng DNA
Zielvektor	75 ng DNA
TE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0)	ad 4,5 μ L
Clonase™	0,5 μ L

Reaktionen wurden bei 25 °C für 60 min inkubiert und mit 1 μ L Proteinase K gestoppt.

2.22.10 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

(Inoue et al., 1990)

Für eine Transformation müssen *E. coli*-Zellen für die DNA-Aufnahme kompetent gemacht werden. 500 mL LB-Medium wurden mit 5–10 *E. coli*-Kolonien angeimpft und für 2 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (Schüttler, New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland). Anschließend wurde die Kultur bei 20-25 °C inkubiert und das Wachstum photometrisch über die Zunahme der OD₆₀₀ verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gekühlt und bei 1000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde in 8 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Es folgte eine erneute Abkühlung für 10 min auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C für 10 min. Der Niederschlag wurde in 8 mL eiskaltem TB-Puffer mit 7 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. In 200-500 μ L Aliquots wurden die nun kompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

TB-Puffer

10 mM PIPES-KOH, pH 6,7, sterilfiltriert
15 mM CaCl ₂
250 mM KCl
Zugabe erst nach pH-Werteinstellung
55 mM MnCl ₂

2.22.11 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 100 μ L kompetente XL-1 blue *E. coli*-Zellen zu je 10 μ L Ligationsansatz gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert, dann für 90 s einem 42 °C-Hitzeschock im Wasserbad ausgesetzt und danach für 5 min auf Eis inkubiert. Es

wurden 300 µL LB-Medium + Glukose (20 mM) + MgCl₂ (20 mM) hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Pro Ansatz wurden Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (37 °C Inkubatorschrank Memmert, Schwabach, Deutschland).

2.22.12 Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte in Einzelkolonien („Kolonie-PCR“)

Zur Selektion positiver Klone wurden einzelne Bakterienkolonien mit sterilen Zahnstochern von einer LB-Platte abgenommen und direkt im PCR Ansatz resuspendiert. Anschließend wurde der Zahnstocher über eine LB-Platte geführt um im Falle eines positiven Nachweises des gewünschten DNA-Fragments, eine Flüssigkultur animpfen zu können.

2.22.13 Vermehrung von *E. coli*-Zellen zur Plasmidisolierung („Minipräparation“)

Um genügend Plasmid-DNA für die Restriktionsanalyse positiver Transformanten für weitere Analysen zu erhalten, wurde aus Flüssigkulturen per Minipräparation Plasmid-DNA isoliert. *E. coli*-Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann im Reagenzglas bei etwa 1000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Niederschläge wurden in 300 µL Puffer P1 (0,05 M Tris, 0,01 M Na₂EDTA, 100 mg RNase A (70 U mg⁻¹); pH 8,0, eingestellt mit HCl) resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen basisch zu lysieren, wurden 300 µL Puffer P2 (0,2 M NaOH, 0,1 % (w/w) SDS) hinzugefügt und anschließend zur Neutralisation 300 µL Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5, eingestellt mit Essigsäure). Die Proben wurden mehrfach invertiert und für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, 750 µL Isopropanol hinzugefügt und gemischt. Anschließend wurde bei 16000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Niederschlag in 500 µL 75 % EtOH aufgenommen, gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min wurde der Niederschlag im Heizblock bei etwa 50 °C getrocknet und in 50 µL ddH₂O aufgenommen.

Die Plasmidisolierung wurde alternativ in kleinem Maßstab mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) oder in größerem Maßstab mit

dem Midi-Präparation Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.22.14 DNA-Sequenzierung

cDNA-Konstrukte und die Übergänge verschiedener Leserahmen bei der Konstruktion von Plasmiden für Fusionsproteine wurden durch Sequenzierung überprüft.

Aus Flüssigkulturen wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid-Kits Plasmid-DNA isoliert. Die Sequenzier-PCR wurde mit dem Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt und folgendermaßen für 10 µl angesetzt: 1,5 µL Sequenzier-Puffer, 1,5 µL Reaktions-Mix, 1 µM Primer vorwärts (M13_uni, Sequenz s. 2.8.), oder 1 µM Primer rückwärts (M13_rev, Sequenz s. 2.8.), 1 µL Plasmid-DNA; das Programm für die Sequenzier-PCR lief über 25 Zyklen bei einer Denaturierungstemperatur von 96 °C für 10 s, einer Annealingtemperatur von 55 °C für 10 s und einer Elongationstemperatur von 60 °C für 4 min. Die Sequenzierung wurde von Herrn Andreas Nolte (Abteilung Entwicklungsbiochemie, Universität Göttingen) durchgeführt.

2.23 Bestimmung spezifischer Transkriptmengen durch RNA-DNA-Hybridisierung („Northern Blot“)

Bei der Northern Blot Analyse wird durch Gelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran übertragen, auf der dann die Menge spezifischer Transkripte durch Hybridisierung der gebundenen RNA mit radioaktiv markierten spezifischen cDNA-Sonden quantifiziert werden kann (DNA/RNA-Hybridisierung).

2.23.1 Denaturierende Elektrophorese von RNA in formaldehydhaltigen Agarosegelen

Die RNA für den Northern Blot wurde unter denaturierenden Bedingungen im 1,5 %-igen Formaldehyd-Gel mit 1 x N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Puffer elektrophoriert. Nach dem Aufkochen wurde die Agarose unter Rühren auf etwa 50 °C abgekühlt, dann wurden 3 mL 37 %iges Formaldehyd/100 mL hinzugefügt (Endkonzentration 1,11 %). Anschließend wurden die Gele gegossen und für 1-2 h auspolymerisieren gelassen. RNA-Proben geringer Konzentration, die bei einer Menge

von 20 µg ein größeres Volumen als 10 µL besaßen, wurden lyophilisiert (Lyophilisator Lyovac GT 3, Leybold Heraeus, Hanau, Deutschland) und anschließend in 10 µL DEPC-ddH₂O aufgenommen. Die RNA wurde mit je 12,5 µL Formamid (65,79 % (v/v)), 2,5 µL 10 x MOPS-Puffer (13,16 % (v/v)) und 4 µL Formaldehyd (21,05 % (v/v)) versetzt und für 15 min auf 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt. Vor dem Auftragen wurden die Proben jeweils mit 3 µL 6 x Ladepuffer (0,1 % Xylencyanol, 580 mM Saccharose, 250 mM EDTA, 0,72 mM Bromphenolblau) versetzt. Nach Beladen des Gels erfolgte die Elektrophorese bei 200 mA für etwa 2,5 h.

2.23.2 Amplifizierung von cDNA-Sonden für Hybridisierungsexperimente

Nach Identifizierung der korrekten Plasmid-DNA wurden die cDNA-Fragmente durch PCR amplifiziert.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde ungereinigt auf ein präparatives Gel aufgetragen, nach elektrophoretischer Auftrennung mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Amersham Purification Kit (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Zur Kontrolle wurden von jedem aufgereinigten Fragment 4 µL DNA-Lösung erneut auf ein Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht fotografiert. Die Sonden wurden ausgehend von cDNA hergestellt. Das ubiquitär exprimierte Gen für β-Aktin (*ACT8*) ist als Referenzgen anerkannt (Bustin, 2000) und wurde als Beladungskontrolle für die relative Quantifizierung verwendet.

2.23.3 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

DNA-Sonden wurden über zufälligen Einbau α-[³²P] markierten dCTPs markiert („random priming“). Für die Reaktion wurde das „Megaprime DNA Labelling System“ von Amersham Biosciences nach dem Standardprotokoll des Herstellers verwendet. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe von „ProbeQuantumG-50 Micro Columns“ über Gelfiltration aufgereinigt, um nicht eingebaute [³²P] markierte Nukleotide zu entfernen. Nach der Reinigung wurden die Fragmente für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gestellt.

2.23.4 Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Nylonmembranen („Blot“)

Um spezifische Transkripte in Gesamt-RNA über RNA-DNA-Hybridisierung nachweisen zu können, musste die isolierte RNA elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen („Blot“) und fixiert werden. Die für Northern Blots benötigte RNA wurde wie unter 5.21.1. beschrieben aus gefrorenem Pflanzenpulver extrahiert. Die RNA-Extrakte wurden bis zur Gelelektrophorese und Übertragung auf die Membran bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um die Proben auf Abbau durch RNAsen zu überprüfen, wurden etwa $10\text{ }\mu\text{g}$ RNA in 1,5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, die RNA durch Inkubation in Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und unter UV-Licht die Konzentration der Banden nach Augenmaß abgeschätzt. Für die Auftragung auf die Blot-Gele wurden ca. $20\text{ }\mu\text{g}$ RNA eingesetzt.

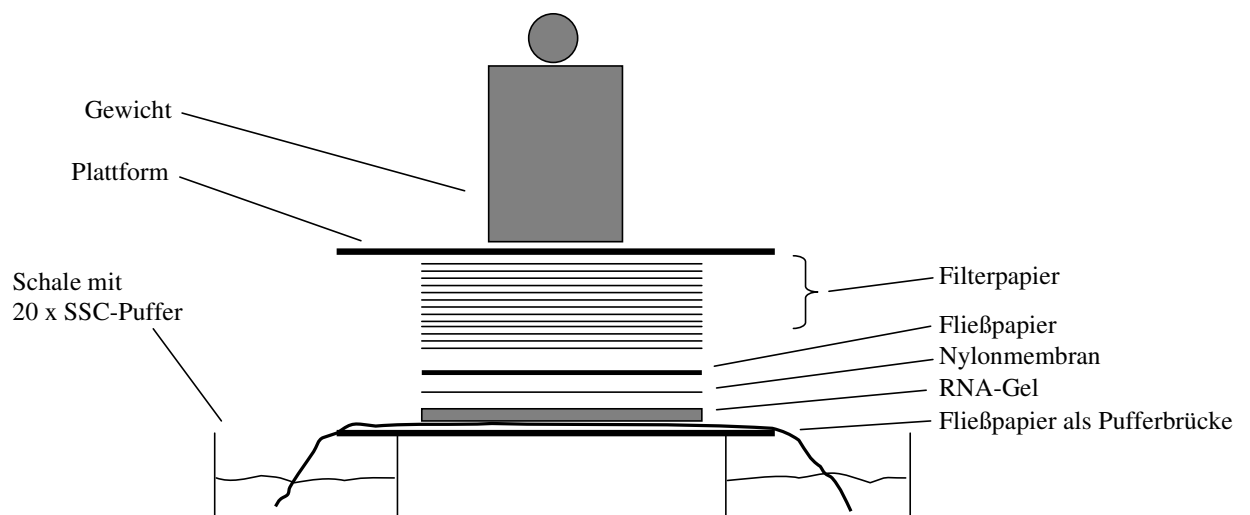


Abbildung. 13: Versuchsaufbau zum RNA-Transfer ("Blot"). RNA wurde wie abgebildet durch die Saugkraft des Filterpapiers mit dem Pufferstrom aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Weitere Details im Text.

Aus den RNA-Gelen wurde die RNA durch Kapillarkräfte auf die Nylonmembran übertragen. Eine Glasplatte wurde als Plattform über zwei mit 20 x SSC-Puffer (300 mM NaCl; 34 mM Na-Citrat; pH 7, eingestellt mit HCl) gefüllte Glasschalen gelegt, auf die Glasschale als Pufferbrücke ein Band aus Fließpapier (Whatman), das an beiden Enden in die mit Puffer gefüllten Glasschalen hineintauchte und mit Puffer getränkt war (s. Abb. 13). Das RNA-Gel wurde mit der zurechtgeschnittenen und in ddH_2O angefeuchteten Nylonmembran (Nylonmembran Roti-Nylon 0.2 Transfermembran $0,2\text{ }\mu\text{m}$; Roth, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt. Beim Auflegen wurde darauf geachtet,

dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden, die den Transfer durch Kapillarkräfte behindern können. Einige Schichten zurechtgefaltetes Fließpapier sowie ein Stapel von 5–10 cm gefaltetem Filterpapier wurden auf die Nylonmembran gelegt, um die dem Transfer zugrunde liegende Saugwirkung zu erzeugen. Auf den Filterpapierstapel wurde eine Glasplatte gelegt, die mit einem Gewicht beschwert wurde. Das Filterpapier um das Gel herum wurde mit Parafilm abgedeckt, um zu verhindern, dass ein Puffersog an Gel und Membran vorbei entsteht. Die Apparatur wurde für etwa 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei die RNA durch die Saugkraft des Filterpapiers aus dem Gel auf die Membran übertragen wurde. Nach Abbau des Blots wurde die Membran kurz unter ddH₂O abgespült und anschließend bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der RNA wurden die Membranen für 2 h bei 80 °C gebacken. Danach wurden die Membranen bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur an einem trockenen und dunkeln Ort aufbewahrt.

2.23.5 RNA-DNA-Hybridisierung zur Detektion spezifischer Transkripte auf RNA-Blots

Um unspezifische Bindungen bei der Hybridisierung zu minimieren, erfolgte zunächst die Prähybridisierung. Hierfür wurden die Membranen in Glasröhren mit Schraubverschluss gegeben, in denen sie für 2-3 h bei 65 °C in etwa 30 mL Prähybridisierungspuffer (250 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 7 % (w/w) SDS; 1 mM EDTA) im Hybridisierungssofen rotierten.

Die Lösungen mit den denaturierten und radioaktiv markierten Sonden wurden direkt zum Prähybridisierungspuffer hinzugegeben; die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen zweimal mit einem Puffer niedriger Stringenz („Low Stringency Buffer“: 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 5 % (w/w) SDS, 1mM EDTA) bei 65 °C für etwa 30-60 min gewaschen.

2.23.6 Visualisierung der spezifischen Hybridisierungssignale

Die markierten und gewaschenen Membranen wurden für 48 h auf einen Phosphorschirm aufgelegt und mit Hilfe eines Phospho-Imagers (FLA-300, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) mit der Software BAS-Reader v3.14 (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) und Aida Image Analyzer v3.24 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet. Dabei wurde die Hintergrundintensität subtrahiert.

Anschließend wurden die Membranen zusammen mit einem Röntgenfilm (Röntgenfilm Biomax MS Film, Kodak, Stuttgart, Deutschland) in einer Filmkassette bei -80 °C für 21 Tage exponiert, um schwächere Signale hervorzuheben. Die Röntgenfilme wurden mit einem automatischen Röntgenfilmentwickler (Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) entwickelt.

2.24 Transiente Expression fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine in Zwiebelepidermiszellen (*Allium cepa*)

Bei der Transformation von Pflanzen durch biolistische Bombardierung wurden mit DNA beschichtete Goldpartikel (Microcarrier) durch eine Helium-getriebene Partikelkanone in intakte Pflanzenzellen eingebracht (Klein et al., 1988; Klein et al., 1989). Bei Eintritt in die Pflanzenzellen wurde die DNA von den Partikeln abgestreift. Die Expression der eingeführten rekombinanten DNA begann, als die DNA in den Zellkern oder in die Plastiden gelangte.

2.24.1 Vorbereitung von Goldpartikeln für die DNA-Präparation

25 mg Goldpartikel (Durchmesser 1 µm, Bio-Rad Laboratories, München) wurden mit 1 mL 70 %-igem EtOH versetzt, für 5 min gemischt und nach 1 min absetzen kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend folgte ein dreimaliges Waschen des Goldniederschlags mit je 1 mL ddH₂O. Die Suspension wurde für 2 min gemischt, der Überstand nach 1 min absetzen kurz zentrifugiert und verworfen. Der Goldniederschlag wurde in 1 mL sterilem ddH₂O resuspendiert, in 50 µL Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert (Endkonzentration 50 mg mL⁻¹).

2.24.2 DNA-Präzipitation auf Goldpartikel

Eine Midipräparation des zu exprimierenden Vektors wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Plasmid Midi Core Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurden auf ein 50 µL Aliquot mit 2,5 mg Goldpartikeln (siehe vorherigen Abschnitt), 5 µg DNA, 50 µL CaCl₂ (2,5 M) und 20 µL Spermidin-Lösung (0,1 M) gegeben, wobei der Ansatz zwischen jedem Schritt für 1 min gemischt wurde, um die Goldpartikel in Suspension zu halten. Die DNA wurde durch einen 10 s Zentrifugationsschritt bei 10000 x g auf das Gold gefüllt, der Überstand wurde

verworfen. Die DNA-beschichteten Goldpartikel wurden zweimal mit 200 μL 75 % Ethanol gewaschen und in 60 μL 96 % Ethanol resuspendiert. Jeweils 15 μL der Goldpartikel wurden aliquotiert und an der Luft getrocknet.

2.24.3 Biolistische Transformation von Zwiebelzellen

Handelsübliche Speisezwiebeln (Tegut, Göttingen, Deutschland) wurden geviertelt und zwei bis drei übereinanderliegende „Zwiebelhautschichten“ in einer mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischale aufbewahrt.

Der biolistische Gentransfer erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „1000/He biolistic particle delivery system, PDS“ (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Berstscheibe (1350 psi) und die passenden Stop-Gitter wurden in 2-Propanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Berstscheibe wurde zur besseren Abdichtung des Gerätes feucht eingesetzt werden. Die Trägerscheiben für die Goldpartikel wurden in die Haltevorrichtungen eingebaut und die Petrischalen mit der Zwiebel in die dritte Ebene geschoben. Nach dem Schließen des Geräts konnte ein Vakuum mit einem Unterdruck von 27 Zoll Quecksilbersäule angelegt werden. Anschließend wurde der Schuss mit Helium als Treibgas ausgelöst. Nach der Bombardierung wurden die Zwiebelabschnitte in der feuchten Petrischale abgedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Die obere Epidermiszellschicht wurde abgezogen und mikroskopiert.

2.25 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskoparbeiten wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Olympus BX51/ Filtersatz YFP-F41028, CFP-F31044) oder einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (Carl Zeiss, LSM 510 meta) durchgeführt, ausgestattet mit einem 30 mW Dioden-Laser (405 nm) 30 mW, Ar-Laser (458, 477, 488, 514 nm) und den Bandpassfiltern BP470-500 nm und BP530-600 nm, wie bei Stenzel et al. beschrieben (Stenzel et al., 2008). Das System ermöglicht eine Simultananregung mit bis zu drei verschiedenen Wellenlängen. Die selektive Detektion des objektemitteerten Lichtes (Fluoreszenz/ Reflexion) wurde durch verschiedene Strahlenteiler und Filter realisiert. Als Objektiv wurde das Ölimmersionsobjektiv Plan-Apochromat 63/1.40 verwendet. Die gezeigten Aufnahmen wurden mit der Carl Zeiss Bedienungssoftware (LSM 510) und dem LSM Image Browser erstellt und ausgewertet.

3. Ergebnisse

Durch eine Kombination klassischer Methoden der Lipidanalytik wurden PI-Spezies aus Pflanzen untersucht. Es konnten Hinweise auf zwei unabhängige PI-Pools gefunden werden, die sich durch ihre Fettsäurezusammensetzung unterscheiden. Die physiologische Funktion der PIs wurde unter Standard- und Stressbedingungen untersucht. Durch klassische Fraktionierungsverfahren auf Organellenebene sollte die physiologische Funktion weiter eingegrenzt werden. Die Fluoreszenzmikroskopie sollte als unabhängige Methode die biochemischen Daten unterstützen.

3.1 Eine neue Methode zur direkten Quantifizierung und Charakterisierung von PI-Spezies über DC und GC

Die Analyse pflanzlicher PIs wird durch das Vorhandensein einer Vielzahl verschiedener sekundärer Metaboliten erschwert, und derzeitige Lipidanalysetechniken waren bislang nicht erfolgreich, um pflanzliche PIs zu analysieren (Welti und Wang, 2004). Die Analytik von PIs wurde bislang hauptsächlich zur Trennung von Kopfgruppenspezies verwendet, wobei die assoziierten Fettsäuren meist außer Acht gelassen wurden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher getestet werden, ob klassische Methoden der Lipidanalytik wie DC und GC zur Analyse von PIs und ihrer Fettsäurezusammensetzung herangezogen werden können. Die Charakterisierung verschiedener PI-Klassen ist schwierig, da nur geringe physikalische Unterschiede zwischen Kopfgruppenisomeren bestehen.

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung und Charakterisierung von PI Spezies anhand ihrer Fettsäurezusammensetzung durchgeführt. Bereits bekannte Methoden und Techniken wurden angewendet, um gleichzeitig sowohl die Kopfgruppe als auch die Fettsäurezusammensetzung der PIs zu untersuchen. Da diese Kombination von Methoden bislang für PIs keine Anwendung gefunden hatte, wurden zunächst Experimente zur Auflösung und Wiederfindungsrate durchgeführt.

PIs und andere Phosphoglyceride wurden durch DC getrennt (Abb. 14). Die Verwendung spezieller Laufmittel für die Trennung polarer Lipide (siehe 2.20.4) erlaubte die Unterscheidung von PI-Kopfgruppenisomeren.

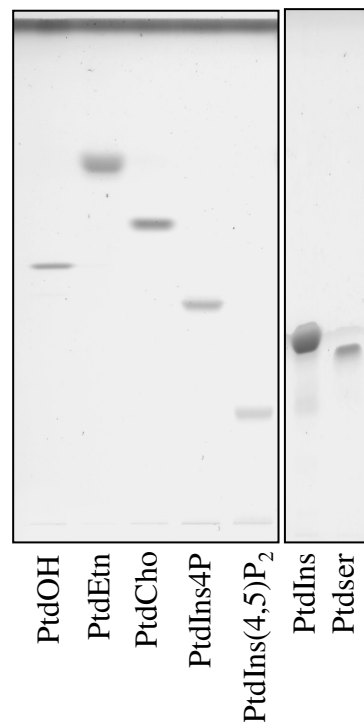


Abbildung 14: DC-Trennung verschiedener Phospholipidstandards. Verschiedene Phospholipidklassen wurden mit geeigneten Laufmitteln getrennt. Das Laufmittel für PtdOH, PtdEtn, PtdCho, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ war CHCl₃:MeOH:NH₄OH:H₂O (57:50:4:11) (v/v/v/v) (links) und für PtdIns und PtdSer Methylacetat:CHCl₃:Isopropanol:MeOH:0,25% KCl (25:25:25:10:9) (v/v/v/v/v) (rechts). PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdOH, Phosphatidsäure; PtdSer, Phosphatidylserin. Die Abbildung stellt eine repräsentative Auftrennung der Phospholipidstandards dar.

3.1.1 Bestimmung der Retentionsfaktoren (R_f-Werte)

Tabelle 5: Bestimmung der R_f-Werte

Aufstellung der R_f-Werte für die Trennung von PtdCho, PtdEtn, PtdIns, PtdIns4P, PtdOH und PtdSer durch das Laufmittel A, Methylacetat, CHCl₃:Isopropanol:MeOH:0,25% KCl (25:25:25:10:9) (v/v/v/v/v). PtdIns(4,5)P₂ wurde durch das Laufmittel B, CHCl₃:MeOH:NH₄OH:ddH₂O (57:50:4:11) isoliert. Die Daten stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten dar.

Lipid	Laufmittel	R _f -Wert
PtdCho	A	0,2 ± 0,043
PtdEtn	A	0,43 ± 0,082
PtdIns	A	0,29 ± 0,035
PtdIns4P	A	0,07 ± 0,008
PtdOH	A	0,36 ± 0,064
PtdSer	A	0,30 ± 0,047
PtdIns(4,5)P ₂	B	0,29 ± 0,017

(n=3)

Die R_f -Werte einzelner Lipide sind in Tabelle 5 angegeben. Um das Auflösungsvermögen der Dünnschichttrennung zu dokumentieren, wurden Experimente mit den biologisch relevanten Kopfgruppenisomeren PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4,5)P₂ durchgeführt (Abb. 15A). Die verwendeten synthetischen Lipide unterschieden sich in ihrer Fettsäurezusammensetzung: PtdIns(3,5)P₂ lag als 1,2-Dioleoyl-Lipid, PtdIns(4,5)P₂ als 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-Lipid vor. Die Lipide wurden zunächst einzeln auf ihre Fettsäurezusammensetzung analysiert, dann vermischt und durch DC wieder getrennt. Das nach der DC-Trennung erhaltene Fettsäuremuster wies auf nur geringe Kontaminierung mit dem jeweils anderen Lipid hin (Abb. 15B).

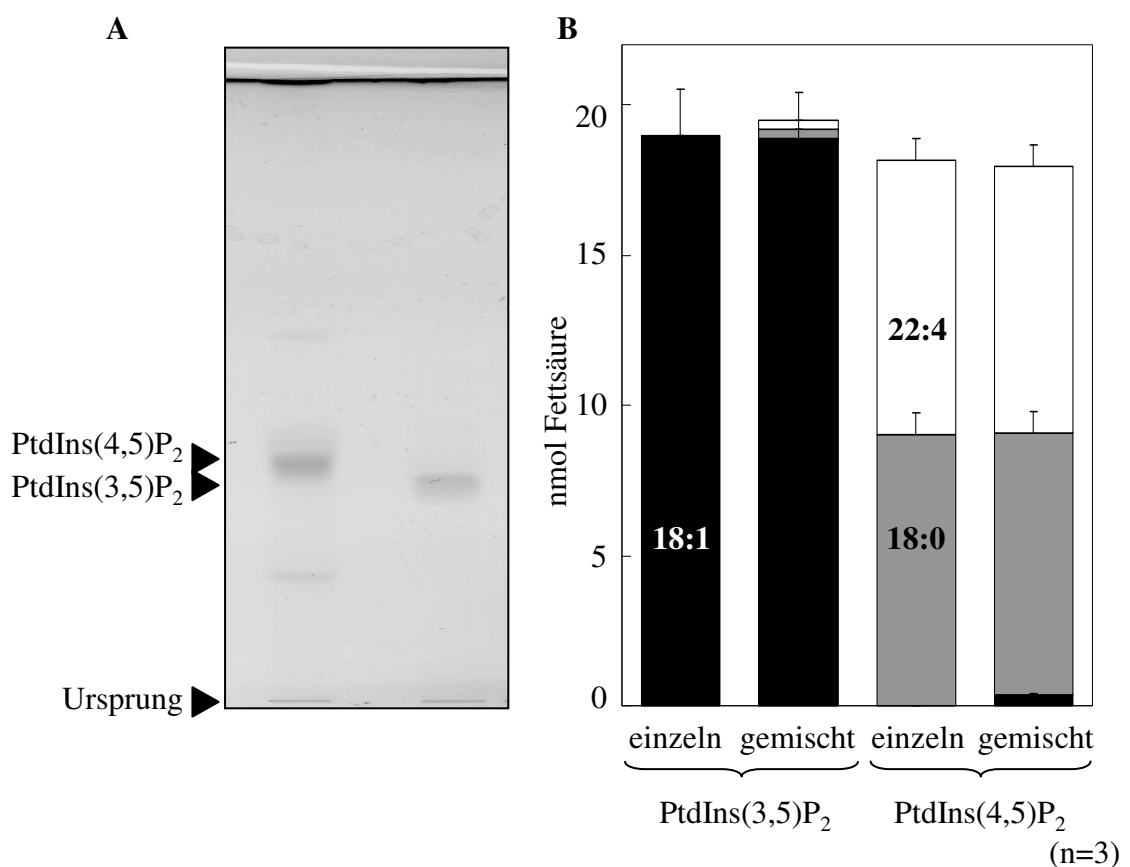


Abbildung 15: Auftrennung von PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,5)P₂. A, Die beiden Lipide wurden auf Kalium-Oxalat-aktivierte DC aufgetragen, in CHCl₃:MeOH:ddH₂O:Essigsäure (10:10:3:1) (v/v/v/v) getrennt, in CuSO₄-Lösung getaucht und anschließend verascht (s. 2.20.4.). A, Zeigt eine DC-Platte mit PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,5)P₂, der Ursprung stellt die Auftragshöhe dar. B, Die parallel analysierten Proben unterschieden sich in ihrer Fettsäurezusammensetzung. PtdIns(4,5)P₂ lag als 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-Lipid und PtdIns(3,5)P₂ als 1,2-Dioleoyl-Lipid vor. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.

3.1.2 Wiederfindungsrate

Da Lipide zur Reisolierung aus Dünnschichtplatten ausgekratzt wurden, ist die Wiederfindungsrate ein kritischer Punkt für quantitative Analysen. Um die Wiederfindungsrate von PIs nach Reisolierung aus Silikapulver zu ermitteln, wurden 10 µg PIs auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und in verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt. Die Lipide wurden ausgekratzt, in Lösungsmittel aufgenommen, in Glasgefäße überführt und unter N₂ getrocknet. Als Kontrolle wurden je 10 µg der gleichen PIs direkt in ein Glasgefäß gegeben. Die ausgekratzten Lipide und die Kontrolllipide wurden einer quantitativen Analyse unterzogen (Tabelle 6). Die Ergebnisse lieferten eine Wiederfindungsrate von ~91,6 % unabhängig vom Laufmittel für die Isolierung der Lipide. Nach allen Extraktions- und Aufbereitungsschritten für die GC wurden von 10 µg Lipid 8,8 bis 9,7 µg wiedergefunden, es fand ein mittlerer Verlust von etwa 8 mol % der eingesetzten Lipide statt.

Tabelle 6: Wiederfindungsrate von PIs nach DC.

Fettsäuremethylester wurden aus 10 µg Kontrolllipiden und Lipiden, die aus einer Silikaplatte ausgekratzt wurden, hergestellt. Die Fettsäureprofile wurden durch GC mit einem internen Standard quantifiziert. Die Wiederfindungsrate wurde durch die Division der Gesamtfläche der GC-Peaks von Kontrolllipiden und der reisolierten Lipide berechnet. Verwendete Laufmittel: A, CHCl₃:MeOH:NH₄OH:H₂O (57:50:4:11) (v/v/v/v); B, CHCl₃:MeOH:H₂O:Essigsäure (10:10:3:1) (v/v/v/v). Die Dünnschichtplatten wurden vor der Verwendung mit Kalium-Oxalat aktiviert.

Lipid	Menge [µg]	Laufmittel	R _F -Wert	Laufstrecke [cm]	Wiederfindungsrate nach DC [%]	Verlust durch DC [%]
PtdIns3P	10	A	0,66	10,6	92 ± 1	8 ± 1
PtdIns4P	10	A	0,59	9,4	91 ± 2	9 ± 2
PtdIns5P	10	A	0,53	8,5	93 ± 2	7 ± 2
PtdIns(3,5)P ₂	10	B	0,37	5,9	95 ± 2	5 ± 2
PtdIns(3,4)P ₂	10	B	0,40	6,4	91 ± 3	9 ± 3
PtdIns(4,5)P ₂	10	B	0,43	6,9	93 ± 2	7 ± 2
PtdIns(3,4,5)P ₃	10	B	0,21	3,4	86 ± 2	14 ± 2

(n=3)

3.2 PI-Spezies und assoziierte Fettsäuren in *Arabidopsis*: PIs waren stärker gesättigt als PtdIns

Im nächsten Schritt wurden *Arabidopsis*-Rosettenblätter als biologische Proben auf PtdIns und PIs getestet. Da bislang keine Informationen über die Fettsäurezusammensetzung von PIs in Pflanzen verfügbar waren, wurden die einzelnen Lipide zunächst aus unstimulierten *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert und analysiert (Abb. 16).

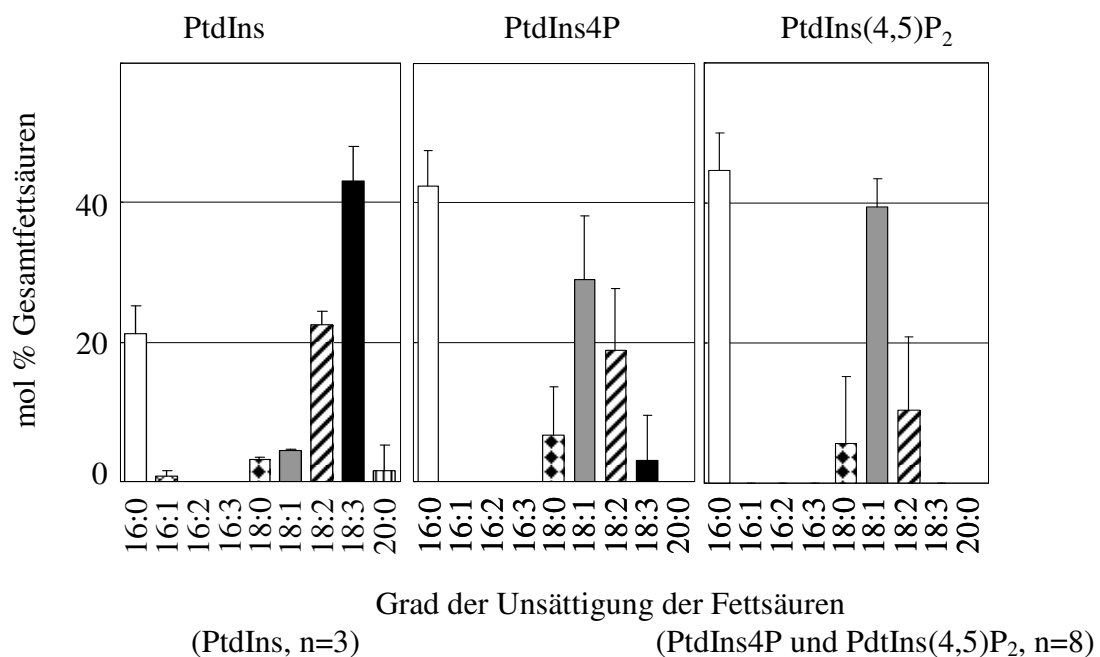


Abbildung 16: Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs aus *Arabidopsis*-Rosettenblättern. Totallipide wurden über DC getrennt, die Lipide isoliert, die Fettsäuren transmethyliert und durch GC analysiert. Für die Lipide PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ wurden die Fettsäurezusammensetzung in mol % der Gesamtfettsäuren abgebildet. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten für PtdIns bzw. PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ von acht Experimenten. Die Balken zeigen die assoziierten Fettsäuren, die in der Abbildung beschriftet sind (unten).

Die Untersuchungen der isolierten Phospholipide auf ihre Fettsäurezusammensetzung ergab, dass PIs eine andere Fettsäurezusammensetzung hatten als die Struktur lipide PtdEtn, PtdCho (Abb. 21) und PtdIns (Abb. 16). PtdIns war mit einem 18:2 $\Delta^{9,12}$ - und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ -Anteil von zusammen 65 % der Gesamtfettsäuren hoch ungesättigt und enthielt neben 16:0 andere gesättigte oder monoungesättigte Fettsäuren nur in geringen

Mengen. Der Grad der Unsat tigung von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ war dagegen geringer, die Hauptfettsäuren waren hier 16:0 und 18:1Δ⁹ mit einem Wert von 70-85 mol % der Gesamtfettsäuren. Hingegen waren 18:2Δ^{9,12} und 18:3Δ^{9,12,15} summiert nicht mehr als 10-12 mol %.

3.3 Vergleich verschiedener subzellulärer Kompartimente von *Arabidopsis*-Blättern, *Arabidopsis*-Zellkulturen und Tabak-Zellkulturen (NT1)

Da die Biosynthese von PtdIns im ER stattfindet, die von PIs aber auch in anderen Organellen ablaufen kann, wurde getestet, ob Lipide in verschiedenen angereicherten Organellenpräparationen ähnliche Unterschiede zeigten. Aus *Arabidopsis*-Rosettenblättern wurden verschiedene Organellen angereichert, um PtdEtn, PtdCho, PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ auf ihre Fettsäurezusammensetzung zu analysieren. Die angereicherten Organellen waren das ER, die Plasmamembran, das Cytoskelett, die Zellkerne und die CCVs.

3.4 Charakterisierung angereicherter subzellulärer Fraktionen über Lipidanalyse, Markertests und Immundetektion

Lipidanalyse

Zur Unterscheidung der subzellulären Fraktionen aus *Arabidopsis* auf Lipidebene wurden jeweils Gesamtlipidextrakte hergestellt, über DC aufgetrennt, und die Muster verglichen (Abb. 17).

Im Vergleich zum Lipidmuster der mikrosomalen Fraktion (MP) waren alle angereicherten Organellenfraktionen in bestimmten Lipiden abgereichert. Die ER-Fraktion enthielt im Vergleich zur Mikrosomenfraktion deutlich geringe Anteile der plastidären Lipide MGDG, DGDG sowie PtdGro und Sterolglykoside. Die Plasmamembranfraktion enthielt im Vergleich zur Mikrosomenfraktion weniger MGDG, DGDG, PtdGro und PtdCho. PtdEtn schien sich in Plasmamembran und ER anzureichern. Sowohl die F-Aktin-Fraktion als auch die angereicherte Fraktion der Zellkerne besaßen noch MGDG und DGDG. PtdGro schien sogar leicht angereichert zu werden, PtdEtn und PtdCho hingegen abgereichert werden, in der angereicherten Fraktion der Zellkerne.

Die angereicherte Fraktion des Cytoskeletts zeigte ein Signal in Höhe des Standards PtdOH, ansonsten waren keine sichtbaren Banden in Höhe der Standards PtdEtn und PtdCho sichtbar. Die angereicherten CCVs zeigten eine deutliche Abreicherung in MGDG und DGDG, aber Anreicherung in PtdEtn und PtdCho.

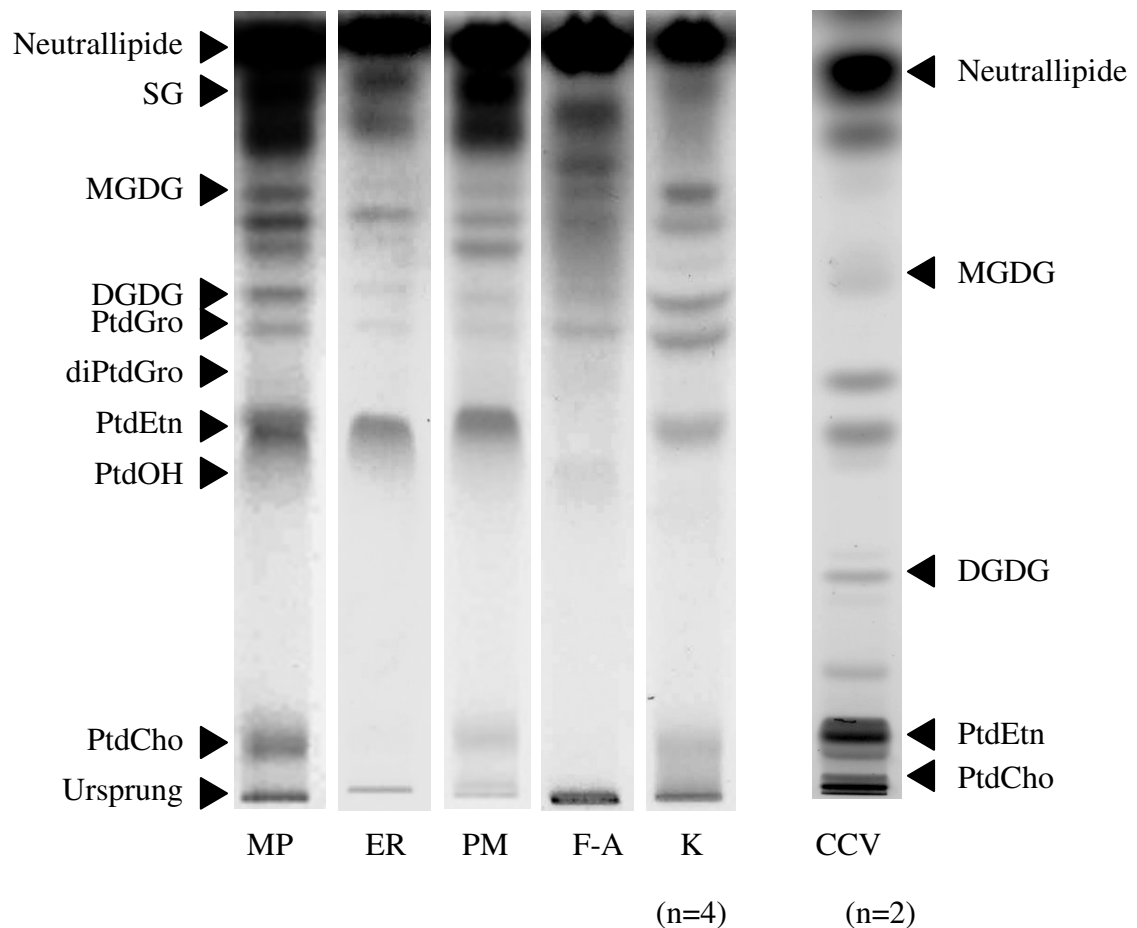
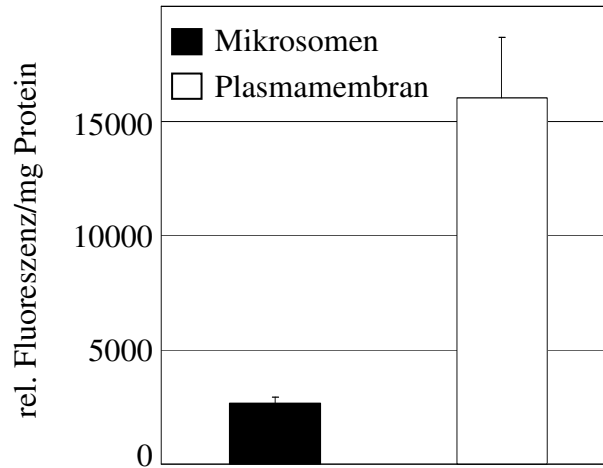


Abbildung 17: Chromatographische Auftrennung der Glyko- und Phospholipide von subzellulären Fraktionen. Die aufgetragenen subzellulären Fraktionen sind unten aufgelistet: CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel; ER, Endoplasmatisches Retikulum; F-A, Cytoskelett; K, Zellkerne; MP, Mikrosomen; PM, Plasmamembran; Die identifizierten Lipide sind rechts und links abgebildet: DGDG, Digalaktosyldiacylglycerol; diPtdGro, diPhosphatidylglycerol; MGDG, Monogalaktosyldiacylglycerol; PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdGro, Phosphatidylglycerol; PtdOH, Phosphatidsäure; SG; Sterolglycosid; Ursprung, Auftragshöhe der Proben; Laufmittel Aceton:Toluol:H₂O (91:30:7) (v/v/v). Die Lipidanalyse wurde mehrfach mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt, für MP, ER, PM, F-A und K viermal und für CCVs zweimal.

Um die Anreicherung der Plasmamembran nachzuweisen, wurden Bindungstests mit dem Lektin Con A durchgeführt (Abb. 18), welches spezifisch Plasmamembranen bindet. Das Lektin war mit dem Fluoreszenzmarker FITC verbunden, und die Bindung

des Lektins an die Plasmamembran konnte direkt über die relative Fluoreszenz nachgewiesen werden. Zum Vergleich der Anreicherung wurde hier die Mikrosomenfraktion als Kontrolle verwendet.



(n=6)

Abbildung 18: Nachweis der Plasmamembrananreicherung durch den Zweiphasen-Gradienten mittels Con A. Im Vergleich die Mikrosomen (schwarz) und angereicherte Plasmamembranen (weiß). Die Bindung von FITC markiertem Con A an die Membranpräparationen wurde fluorometrisch ermittelt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Experimenten.

Die relative Fluoreszenz der gebundenen Con As in angereicherter Plasmamembran war bei gleichem Proteingehalt sechsmal höher als die der Mikrosomenfraktion (Abb. 18). Eine Anreicherung der Plasmamembran mittels des Zweiphasen-Systems konnte somit nachgewiesen werden.

Die Anreicherung von Zellkernen wurde durch DAPI-Färbung getestet (Abb. 19A). Die Menge fluoreszierender Zellkerne wurde unter dem Mikroskop in einer Zählkammer bestimmt und die Anreicherung berechnet (Abb. 19B). Zum Vergleich wurden die Zellkerne aus dem Rohextrakt gezählt. Im Rohextrakt waren neben Zellkernen auch noch weitere zelluläre Bestandteile vorhanden. Im Fluoreszenzbild sah man im UV-Licht die fluoreszierenden Zellkerne (Abb. 19, mit Pfeilen markiert). In der Fraktion der angereicherten Zellkerne sah man ein deutlich homogeneres Bild ohne weitere zelluläre Bestandteile. Um fluoreszierende Zellkerne nach DAPI-Färbung zählen zu können, wurde eine 1:5 Verdünnung hergestellt und die Zellkerne gezählt. Im Rohextrakt wurden $0,8 \times 10^6$ Zellkerne/mL gezählt, in der angereicherten Fraktion $5,45 \times 10^6$ Zellkerne/mL. Das entspricht einer etwa sechsfachen Anreicherung (Abb. 19B).

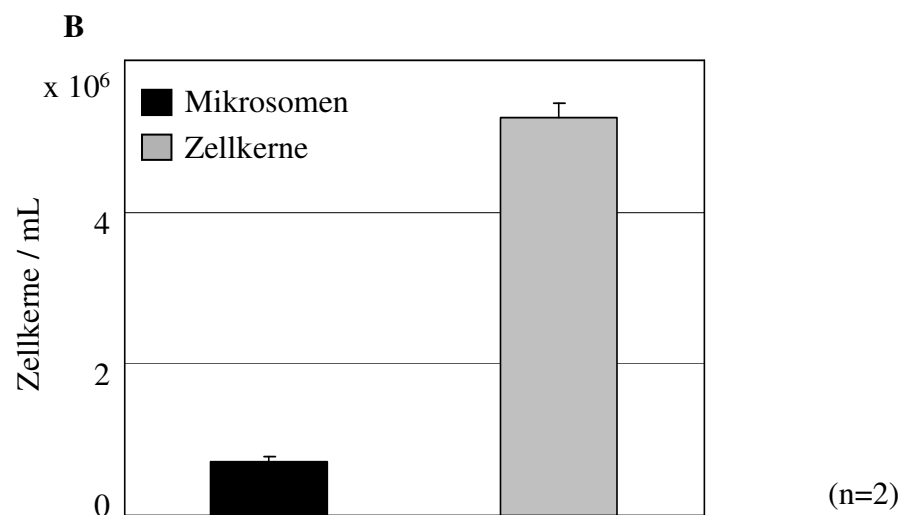
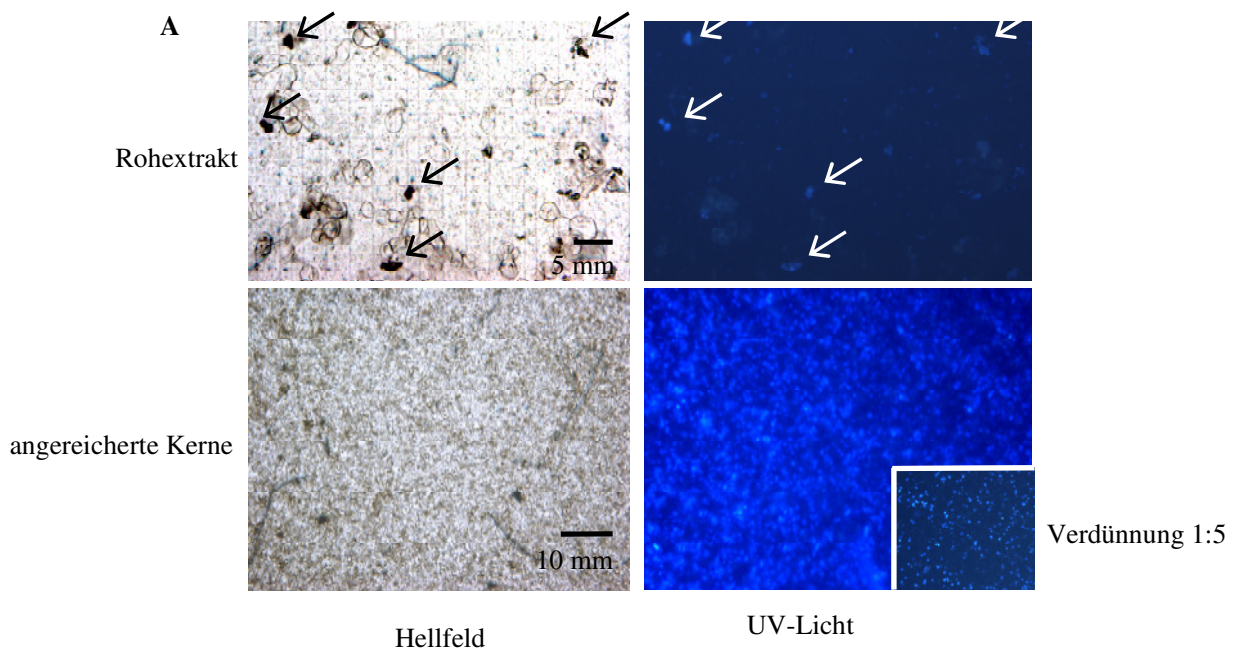


Abbildung 19: DAPI-Färbung zum Nachweis der Anreicherung von Zellkernen. Rohextrakte und angereicherte Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die fluoreszenzierenden Zellkerne unter dem UV-Licht in einer mikroskopischen Zählkammer ausgewertet. A, Mikroskopie der DAPI-Färbung der fluoreszierenden Zellkerne. Die DAPI-Färbung wurde zweimal wiederholt und die Experimente zeigten ähnliche Ergebnisse. B, Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und den Standardfehler von Mikrosomen (schwarz) und Zellkernen (grau) von zwei Experimenten.

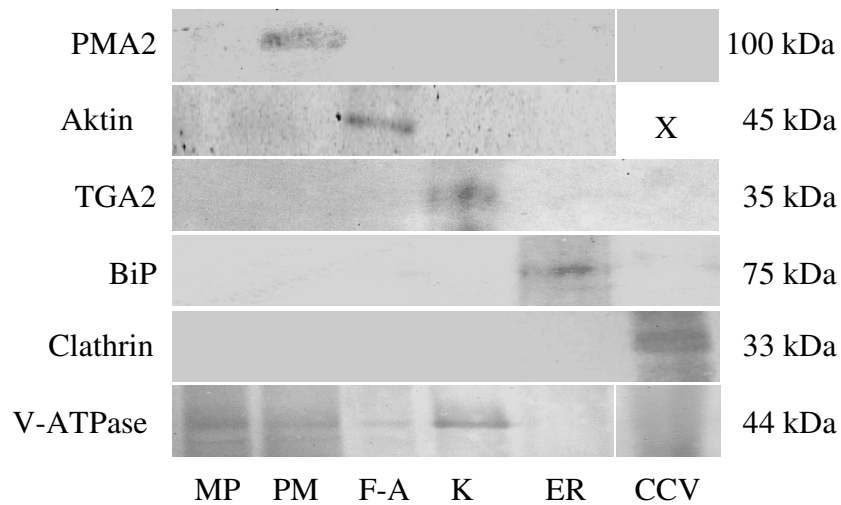
Immundetektion

Um die Anreicherungen der subzellulären Fraktionen im Vergleich zur Mikrosomenfraktion zeigen zu können, und um eine Verunreinigungskontrolle der

Fraktionen untereinander und mit tonoplastidären Membranen zu zeigen, wurden Markerenzyme über Immundetektion nachgewiesen.

Um mögliche gegenseitige Verunreinigungen der Fraktionen bewerten zu können, wurden alle subzellulären Fraktionen sukzessiv aufgetragen und mit dem Antiserum spezifisch für jeweils nur eine Fraktion inkubiert (Abb. 20). In der obersten Zeile ist die Immundetektion mit einem Antiserum gegen die H⁺-ATPase aus *Nicotiana plumbaginifolia* dargestellt. Nur in der Spur, in der angereicherte Plasmamembran aufgetragen wurde, war ein Signal detektierbar. Der Nachweis für das F-Aktincytoskelett erfolgte über ein anti-Aktin-Antiserum, das ausschließlich in der Fraktion des Cytoskeletts ein Signal zeigte. Im Falle der F-Aktin-Fraktion wurde der Western ohne die Fraktion der CCV durchgeführt, da die Cytoskelett-Fraktion in den späteren hyperosmotischen Stressexperimenten nicht weiter analysiert wurde. Der Nachweis für die Zellkerne fand über ein Antiserum gegen den TGA2-Transkriptionsfaktor aus *Nicotiana tabacum* statt. Der Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle in der Salicyl- und Auxin-induzierbaren Genexpression in Pflanzen. Nur die Spur mit der Fraktion, in der die Zellkerne angereichert waren, zeigte hier ein Signal. Die Anreicherung für das ER wurde über ein Antiserum gegen das Bindeprotein BiP nachgewiesen. BiP ist ein ER-luminales Protein, das eine Rolle bei der Proteinfaltung und dem Aufbau des ERs spielt (Denecke et al., 1991). Das Antiserum zeigte nur ein Signal in der ER-angereicherten Fraktion. Die äußere Hülle CCVs enthält das Mantelprotein Clathrin, welches aus einem Trimer besteht, das sich jeweils aus einer schwereren Kette und zwei leichten Ketten bildet. Das monoklonale Antiserum erkannte die leichten Clathrin-Ketten bei einer Größe von 25-36 kDa. Die Anreicherung der CCVs zeigte nur in der letzten Fraktion ein Signal bei 33 kDa. Als Kontrolle über die Verunreinigungen gegen tonoplastidäre Membranen wurde das Antiserum gegen die tonoplastidäre V-ATPase eingesetzt. Besonders die Mikrosomen-, sowie CCV- und ER-Fraktionen zeigten Signale auch mit dem V-ATPase-Antiserum. Dabei ist anzumerken, dass die Lokalisierung der „vakuolären“ V-ATPase nicht streng auf den Tonoplasten beschränkt ist. Die Anreicherungen der Plasmamembran und der Zellkerne zeigten hingegen kaum Verunreinigungen mit vakuolären Membranen.

Die Lipidmuster und Immundetektion verschiedener Markerproteine in den einzelnen angereicherten Organellenfraktionen wiesen auf eine substantielle Anreicherung aller Fraktionen hin. Die subzellulären Fraktionen waren allerdings nicht hochrein, sondern zeigten meist zumindest vakuoläre Kontaminationen.



(n=3)

Abbildung 20: Immundetektion von Markerproteinen. Die angereicherten subzellulären Fraktionen (unten) wurden durch Immundetektion mit verschiedenen Antiseren (links) für unterschiedliche Markerproteine auf Reinheit getestet. Rechts sind die Größen in kDa (Kilo-Dalton) der Markerproteine dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. CCV, Clathrinbeschichtete Vesikel; ER, Endoplasmatisches Retikulum; F-A, Cytoskelett; K, Zellkerne; MP, Mikrosomen; PM, Plasmamembran; Aktin, Cytoskelett; BiP, ER; Clathrin, CCVs; PMA2, PM; TGA2, Zellkerne; V-ATPase, tonoplastidäre Verunreinigungen; x zeigt die fehlende CCV-Fraktion in der Immundetektion mit dem Antiserum gegen Aktin.

3.5 Die Fettsäurezusammensetzung von PI-Spezies verschiedener Organellen ist ähnlich

Die Lipide der angereicherten subzellulären Fraktionen wurden auf ihre Fettsäurezusammensetzung analysiert und miteinander verglichen. Betrachtet man die Strukturlipide von allen angereicherten Fraktionen, fällt kein großer Unterschied der Fettsäurezusammensetzung auf. Bis auf die Zellkerne verhielten sich die Fettsäurezusammensetzungen aller Organellen ähnlich. Vergleich man alle PIs untereinander, fiel ebenfalls kein großer Unterschied auf, auch hier mußten die Zellkerne wieder besonders betrachtet werden. Vergleich man allerdings die Strukturlipide und PtdIns mit den PIs, erkannte man, dass PtdEtn, PtdCho und PtdIns ungesättigter waren als die gesättigten PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂.

Die Zellkerne zeigten ein gegensätzliches Ergebnis. Während PtdEtn, PtdCho und PtdIns eher gesättigt vorlagen, zeigte PtdIns4P ein ähnliches Fettsäuremuster wie

PtdCho der anderen Organellen; PtdIns(4,5)P₂ hatte im Vergleich deutlich mehr 18:2 Δ ^{9,12}.

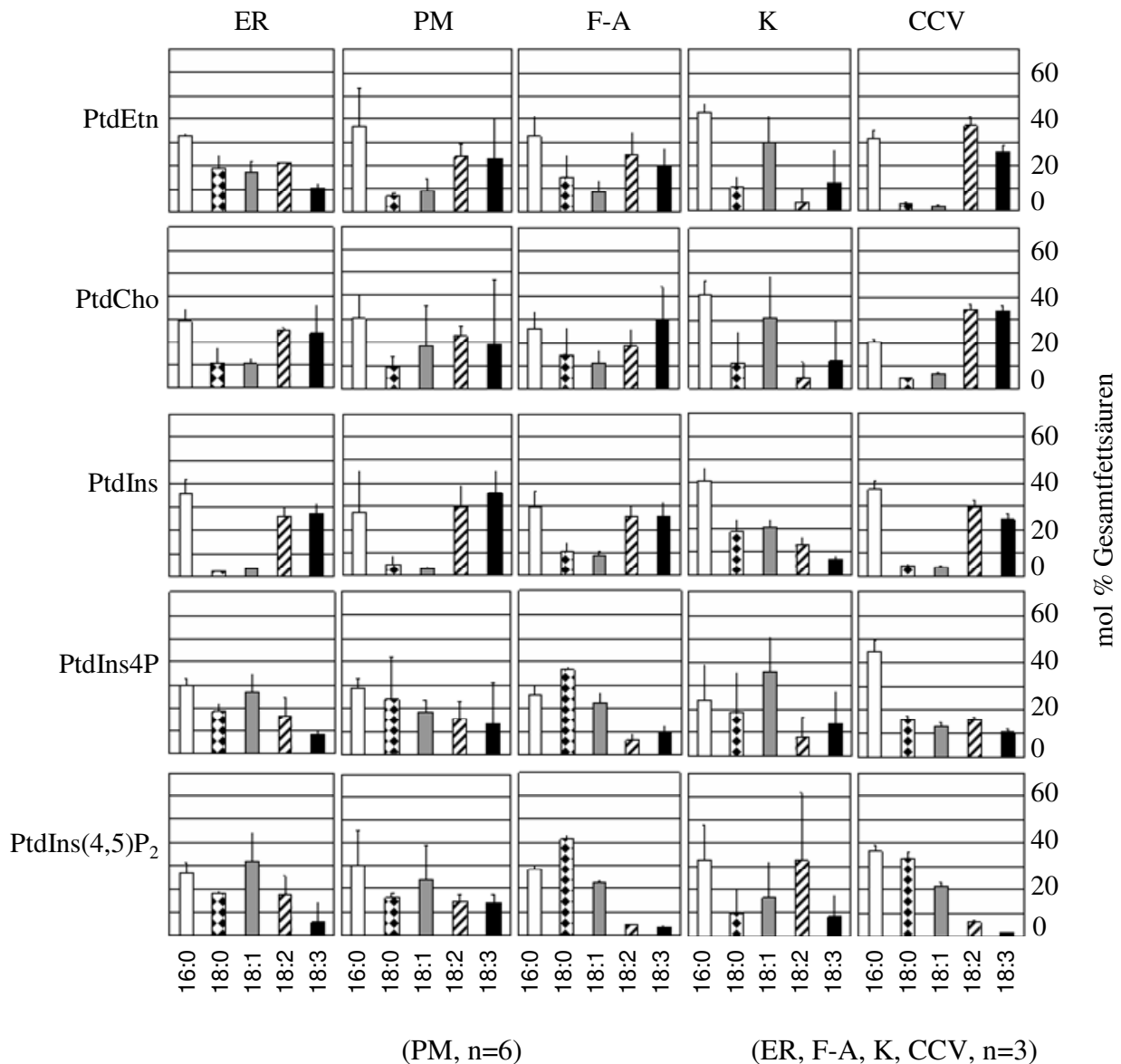


Abbildung 21: Fettsäurezusammensetzung von Phosphoglyceriden der angereicherten subzellulären Fraktionen aus *Arabidopsis*-Rosettenblättern.

Verschiedene Fettsäuren sind durch unterschiedliche Balken dargestellt. Die assoziierten Fettsäuren sind unten angegeben. CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel; ER, Endoplasmatisches Retikulum; F-A, Cytoskelett; K, Zellkerne; PM, Plasmamembran; Die identifizierten Lipide sind links abgebildet: PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Plasmamembran von sechs Experimenten, für ER, F-A, K und CCVs von drei Experimenten.

Neben den Experimenten mit *Arabidopsis*-Rosettenblättern (Abb. 21) wurden auch aus *Arabidopsis*-Zellkulturen Endomembranen, Plasmamembranen, Cytoskelett, Zellkerne

und ER angereichert (Abb. 22) und die jeweils assoziierten Lipide PtdEtn, PtdCho, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ auf ihre Fettsäurezusammensetzung analysiert. Die Organellen der Zellkulturen wurden zu einem Zeitpunkt analysiert, als die Ergebnisse der hyperosmotischen Experimente noch nicht vollständig waren. Aus diesem Grund wurde bei dieser Analyse PtdIns nicht mitbetrachtet. Die Fettsäureprofile der angereicherten Organellen aus *Arabidopsis*-Zellkulturen zeigten in den Lipiden PtdEtn und PtdCho ungesättigte Fettsäuren, wohingegen die Fettsäuren von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ stärker gesättigt waren. Auch in den *Arabidopsis* Zellkulturen bildete die angereicherte Fraktion der Zellkerne eine Ausnahme und PtdCho war im Vergleich zu PtdCho-Spezies der anderen angereicherten Fraktionen stärker gesättigt. PtdIns(4,5)P₂ zeigte in der angereicherten Zellkernfraktion einen sehr hohen Grad an Sättigung, und es konnten kein assoziiertes 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ nachgewiesen werden (Abb. 22).

Vergleicht man allerdings die Strukturlipide mit den PIs so sieht man einen deutlichen Unterschied. Während die Strukturlipide deutlich ungesättigtere Fettsäuren hatten, war der Anteil der ungesättigten Fettsäuren in den PIs stark reduziert. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung von Lipiden aus verschiedenen Organellenpräparationen weist darauf hin, dass in keiner der angereicherten Fraktionen PtdIns und PIs in ihrer Fettsäurezusammensetzung übereinstimmten (Abb. 21, Abb. 22).

Dieses Ergebnis war im Fall von PtdIns gegenüber PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ überraschend, da PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ durch Kopfgruppenphosphorylierung aus PtdIns entstehen. Aus den Fettsäuremustern der einzelnen Lipide ging hervor, dass das gemessene PtdIns nicht der direkte Vorläufer für die PtdIns4P- und PtdIns(4,5)P₂-Bildung sein konnte.

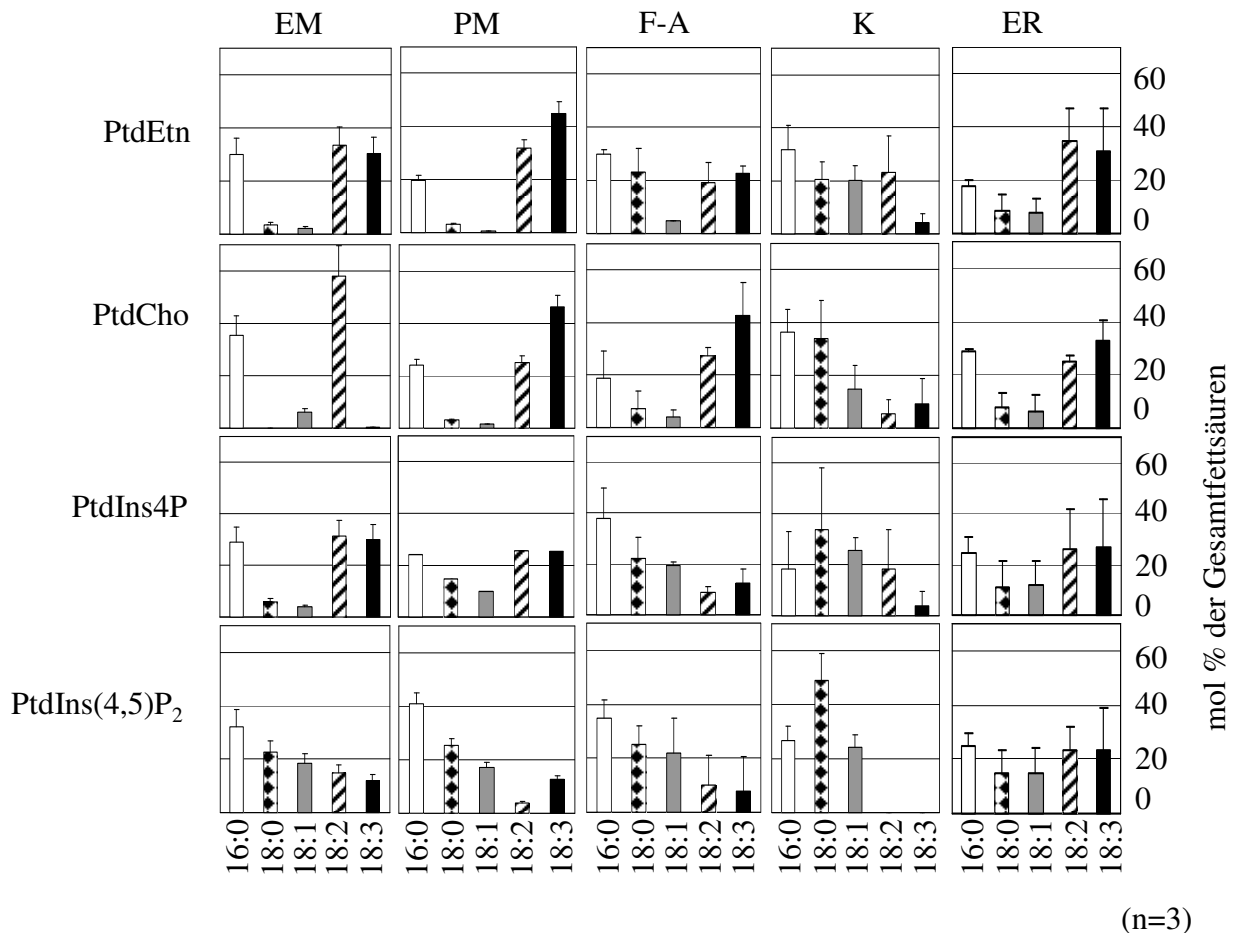


Abbildung 22: Fettsäurezusammensetzung von Phosphoglyceriden der angereicherten subzellulären Fraktionen aus *Arabidopsis*-Zellkulturen.

Verschiedene Fettsäuren sind durch unterschiedliche Balken dargestellt. Die assoziierten Fettsäuren sind in der Abbildung (unten) angegeben. CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel; ER, Endoplasmatisches Retikulum; F-A, Cytoskelett; K, Zellkerne; PM, Plasmamembran; Die Lipide sind links aufgelistet: PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.

3.6 Charakterisierung stressinduzierter PI-Spezies in *Arabidopsis* und anderen Organismen

In den folgenden Experimenten mit hydroponisch angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde 0,4 M NaCl als hyperosmotischer Stress angelegt. Die NaCl-Lösung wurde direkt in das hydroponische Kulturmedium gegeben und über die Wurzel aufgenommen, die Rosettenblätter wurden geerntet und analysiert. In den Experimenten mit *Arabidopsis*-Zellkulturen oder BY2-Zellkulturen wurde 0,1 M NaCl als hyperosmotischer Stress angelegt, und die NaCl-Lösung direkt in das Medium gegeben, in dem die Suspensionszellen wuchsen.

3.6.1 Der PtdIns(4,5)P₂ Gehalt in Pflanzenzellen steigt nach hyperosmotischem Stress an

Da die Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PtdIns(4,5)P₂ der unstimulierten Pflanzen nicht übereinstimmte, sollte getestet werden, ob die bekannte stressinduzierbare Dynamik des PI-Systems mit dieser Beobachtung zusammenhing, und stärker ungesättigte PIs nach Stress gebildet wurden.

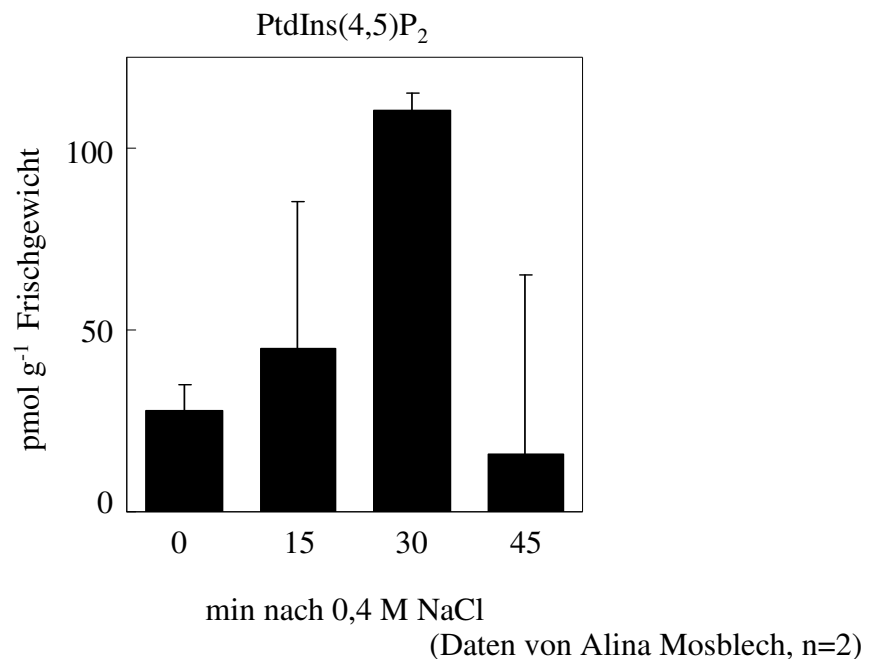


Abbildung 23: Spezifischer Kopfgruppennachweis zur PtdIns(4,5)P₂-Mengenbestimmung nach hyperosmotischem Stress in *Arabidopsis*. Über einen spezifischen Nachweis der Ins(1,4,5)P₃-Kopfgruppe des PtdIns(4,5)P₂-Lipids konnte der bereits beschriebene Anstieg von PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Daten stellen die Mittelwerte und den Standardfehler von zwei Experimenten dar.

Ein Anstieg im PtdIns(4,5)P₂-Gehalt pflanzlicher Zellen war aus früheren Arbeiten bekannt (Pical et al., 1999; DeWald et al., 2001). In *Arabidopsis* wurde bereits über die Abwesenheit von PtdIns(3,5)P₂ in Zellkulturen (DeWald et al., 2001) und intakten Pflanzen (Pical et al., 1999) berichtet. Über einen spezifischen Nachweis der Ins(1,4,5)P₃-Kopfgruppe des PtdIns(4,5)P₂ (Chilvers et al., 1991) konnte der beschriebene Anstieg von PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 23, Daten von Alina Mosblech). Ein Anstieg fand bis zu 30 min nach Stimulation statt, nach 45 min fiel der Wert wieder ab.

3.7 Salzstressinduzierte PI-Spezies in *Arabidopsis*-Blättern haben eine charakteristische Fettsäurezusammensetzung

Um die Fettsäurezusammensetzung des ansteigenden PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ zu dokumentieren, wurden die PI-Spezies über 30 min hyperosmotischem Stress analysiert. Als Vergleich wurde das Strukturlipid PtdEtn untersucht (Abb. 24). *Arabidopsis*-Pflanzen wurden unter hydroponischen Bedingungen angezogen und die Rosettenblätter vor und nach Salzstress geerntet. Vor den Salzstressexperimenten wurden Rosettenblätter geerntet, die als unstimulierte Kontrollpflanzen für den Vergleich wichtig waren. Die Lipid- und Fettsäurezusammensetzungen wurden untersucht.

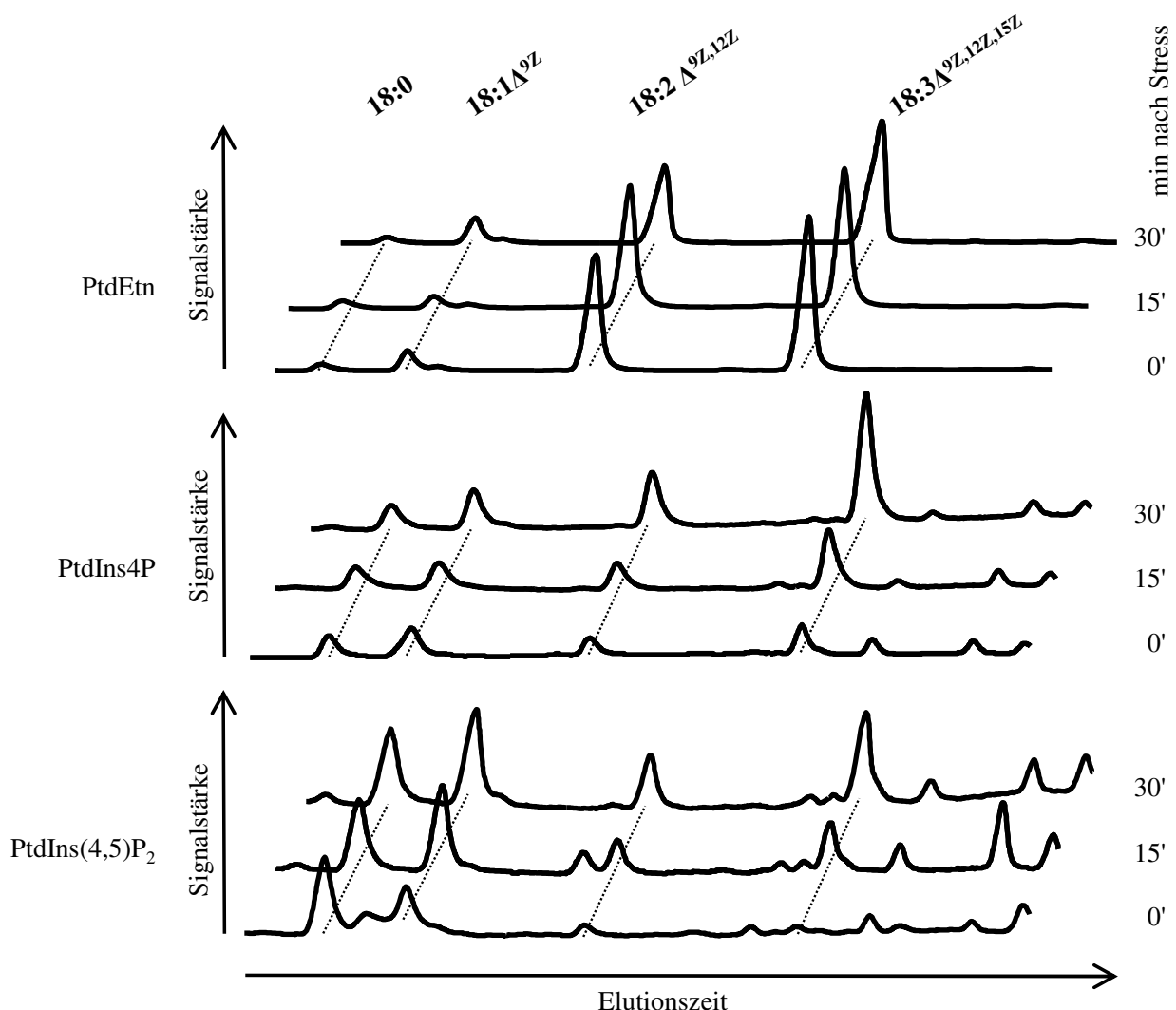


Abbildung 24: GC-Profile von transmethylierten Fettsäuren im Bereich der 18-C-Fettsäuren von Phosphoglyceriden. Die gezeigten Profile repräsentieren die assoziierten Fettsäuren der dargestellten Lipide zu den Zeitpunkten 0, 15 und 30 min nach hyperosmotischem Stress durch Zugabe von 0,4 M NaCl. Die Fettsäurepeaks sind oben gekennzeichnet. Die Profile stellen ein repräsentatives Ergebnis von mindestens vier Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen dar.

In Abb. 24 sind die GC-Profile der assoziierten Fettsäuren der Lipide PtdEtn, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ im Bereich der 18-C-Fettsäuren (18:0, 18:1 Δ^9 , 18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) gezeigt. Für jedes Lipid sind drei Profile nach 0, 15 und 30 min 0,4 M NaCl aufgeführt. Die GC-Profile der assoziierten Fettsäuren für PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ zeigten nach 15 und 30 min einen deutlichen Anstieg in den Fettsäuren 18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. PtdEtn zeigte hingegen über den gesamten Zeitverlauf von 30 min keinen Anstieg in den aufgeführten Fettsäuren im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle. Die Daten zeigten deutlich, dass mit hyperosmotischem Stress auch ungesättigte Spezies von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ gebildet wurden, die in unstimulierten Pflanzen fehlten.

Um zu testen, ob die stressinduzierte Bildung von ungesättigten PIs mit Änderungen des Gehaltes oder der Fettsäurezusammensetzung von PtdIns einhergehen, wurden die Analysen auf PtdIns ausgeweitet (Abb. 25).

Abb. 25 zeigt PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ aus *Arabidopsis*-Blättern und -Wurzeln nach hyperosmotischem Salzstress. In Blättern fiel auf, dass PtdIns bereits nach 15 min und noch stärker nach 30 min in der Menge des Gesamtlipids zurückgingen. Nach 60 min stieg der Gehalt an PtdIns wieder an und erreichte sogar ein höheres Niveau als die unstimulierten Kontrollpflanzen. Im Unterschied zu PtdIns4P fiel bei PtdIns(4,5)P₂ die Menge an Lipid nach 60 min hyperosmotischem Stress wieder ab.

PtdIns4P war unter normalen Wachstumsbedingungen ein eher gesättigtes Lipid. Mit Applikation von hyperosmotischem Stress stieg die Menge des Lipids um das Vierfache an. Die Fettsäurezusammensetzung von PtdIns4P änderte sich dabei deutlich und die Zunahme des Lipids ging mit einer Zunahme der Fettsäuren 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ einher.

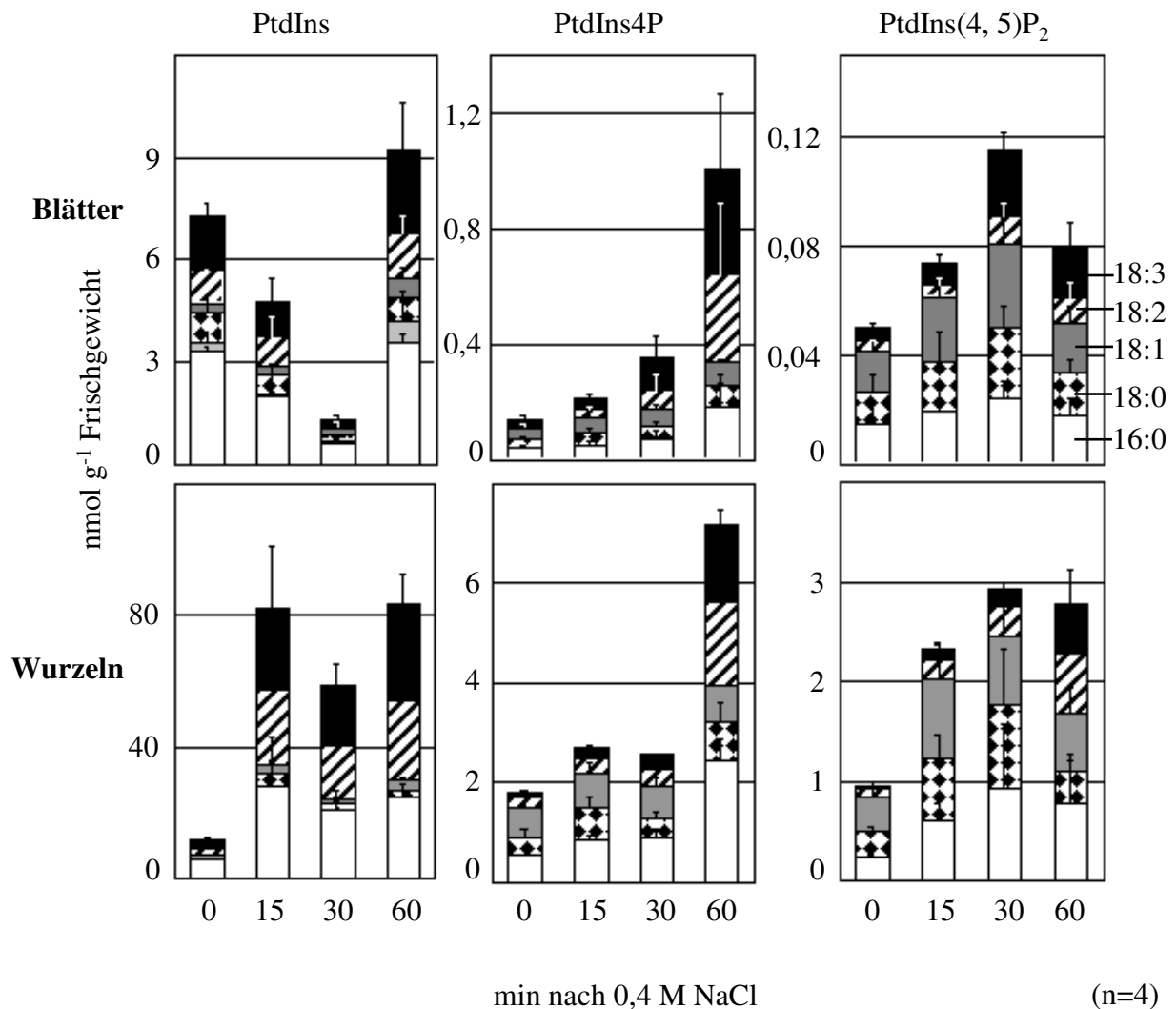


Abbildung 25: Fettsäurezusammensetzung von PI-Spezies aus *Arabidopsis*-Blättern und -Wurzeln nach hyperosmotischem Stress. Die dargestellten Lipide wurden zu den Zeitpunkten 0, 15, 30 und 60 min nach hyperosmotischem Stress durch Zugabe von 0,4 M NaCl auf ihre assoziierten Fettsäuren untersucht. Unterschiedlichen Fettsäuren sind durch verschiedene Balkensegmente dargestellt, s. oben rechts. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Daten stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von vier Experimenten dar. Die obere Zeile zeigt die analysierten *Arabidopsis*-Blättern und die untere Zeile zeigt die analysierten *Arabidopsis*-Wurzeln. Die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren sind zur Lipidmenge proportional.

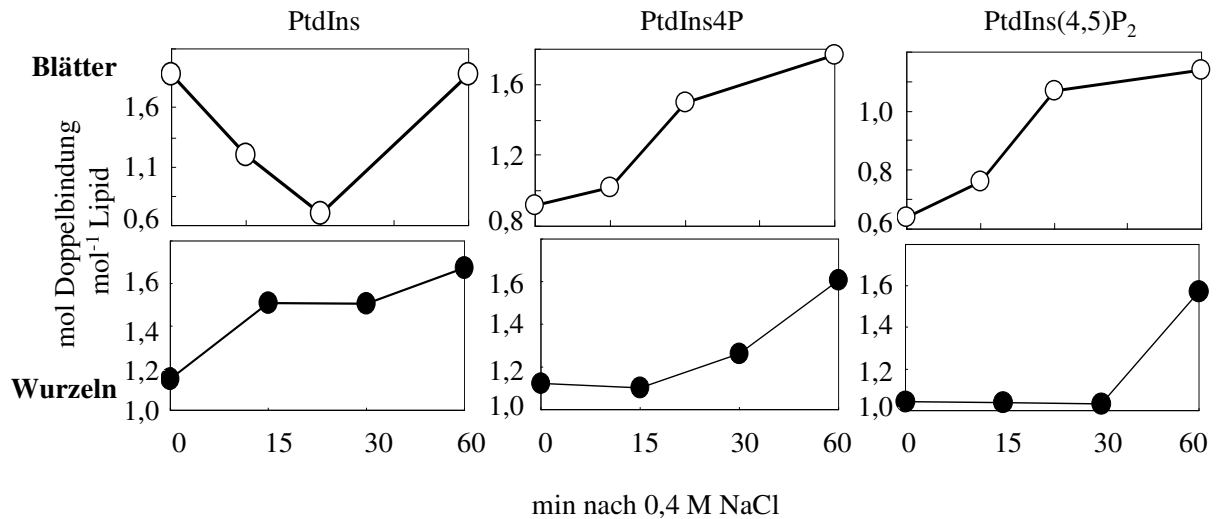


Abbildung 26: Änderungen im Grad der Unsättigung der mit PtdIns und PIs assoziierten Fettsäuren nach hyperosmotischem Stress. Die in Abbildung 25 dargestellten Daten dienen als Grundlage für die Berechnung der Unsättigungsgrade für PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Der Unsättigungsgrad wird in mol Doppelbindung mol⁻¹ Lipid angegeben. Der experimentelle Fehler entspricht den Daten aus Abb. 25.

Der bekannte Anstieg im Gehalt von PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress (Abb. 23) konnte in den Experimenten wiederholt werden. Die Menge an PtdIns(4,5)P₂ stieg etwa um die dreifache Menge an, und ähnlich wie für PtdIns4P veränderte sich auch hier die Fettsäurezusammensetzung.

Die Fettsäurezusammensetzungen von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in *Arabidopsis*-Rosettenblättern nach hyperosmotischem Stress ähnelten der Zusammensetzung von PtdIns unter normalen Bedingungen. Unter Stressbedingungen wurde ein transienter Rückgang in PtdIns beobachtet, der von einem verringerten Anteil der Fettsäuren 18:2Δ^{9,12} und 18:3Δ^{9,12,15} begleitet war. Die Veränderungen von PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ verhielten sich nach 0,4 M NaCl und 0,8 M Sorbitol entsprechend (siehe Anhang).

Salzstressinduzierte Lipidänderungen in Wurzeln

Neben Rosettenblättern wurden auch die Änderungen der Lipidgehalte in *Arabidopsis*-Wurzeln untersucht. Als Kontrolle dienten unstimulierte Wurzeln, die vor Zugabe von Salz geerntet wurden. PtdIns stieg bereits nach 15 min an, fiel nach 30 min wieder ab um nach 60 min wieder den Wert zu erreichen, der auch schon nach 15 min beobachtet

wurde. Die Fettsäurezusammensetzung die nach 15 min bestand, änderte sich danach kaum. Im Vergleich zu PtdIns aus Blättern verhielt sich PtdIns in Wurzeln anders, und der drastische Rückgang in Blättern konnte in den Wurzeln zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

PtdIns4P zeigte einen leichten Anstieg bereits nach 15 min hyperosmotischen Stresses. Die Menge des Lipids änderte sich nach 30 min nicht, zeigte aber einen weiteren Anstieg nach 60 min. Der Anstieg in PtdIns4P war mit deutlich erhöhten Gehalten der Fettsäuren $18:2\Delta^{9,12}$ und $18:3\Delta^{9,12,15}$ korreliert.

PtdIns(4,5)P₂ stieg in Wurzeln nach 15 min an und erreichte einen Höchstwert nach 30 min. Während die Fettsäurezusammensetzung zunächst nicht verändert war, zeigte sich in den auch nach 60 min noch erhöhten PtdIns(4,5)P₂-Gehalten eine verstärkte Assoziation mit $18:2\Delta^{9,12}$ und $18:3\Delta^{9,12,15}$.

Sowohl in Blättern als auch in Wurzeln konnten ähnliche Änderungen der Gehalte und Fettsäurezusammensetzungen von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ beobachtet werden. Beide Lipide zeigten einen Anstieg der Lipidmenge und einen Anstieg im Grad der Fettsäuresättigung über einen Zeitraum von 60 min hyperosmotischen Stresses.

Stressinduzierte Änderungen im Grad der Fettsäureunsättigung von PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ sind in Abb. 26 dargestellt. In Blättern fand in PtdIns erst ein Rückgang und dann ein Anstieg im Grad der Unsättigung statt, während in Wurzeln über den gesamten Zeitverlauf ein Anstieg stattfand. Sowohl in PtdIns4P als auch in PtdIns(4,5)P₂ fand in Blättern und Wurzeln ein Anstieg über den gesamten Zeitraum statt.

3.8 Globale Änderungen im Grad der Lipidsättigung nach hyperosmotischem Stress

Neben den betrachteten PIs wurden parallel auch zwei wichtige Strukturlipide betrachtet, MGDG und PtdCho. In beiden Fällen veränderten sich die Lipidzusammensetzung und der Grad der Sättigung nach hyperosmotischem Stress.

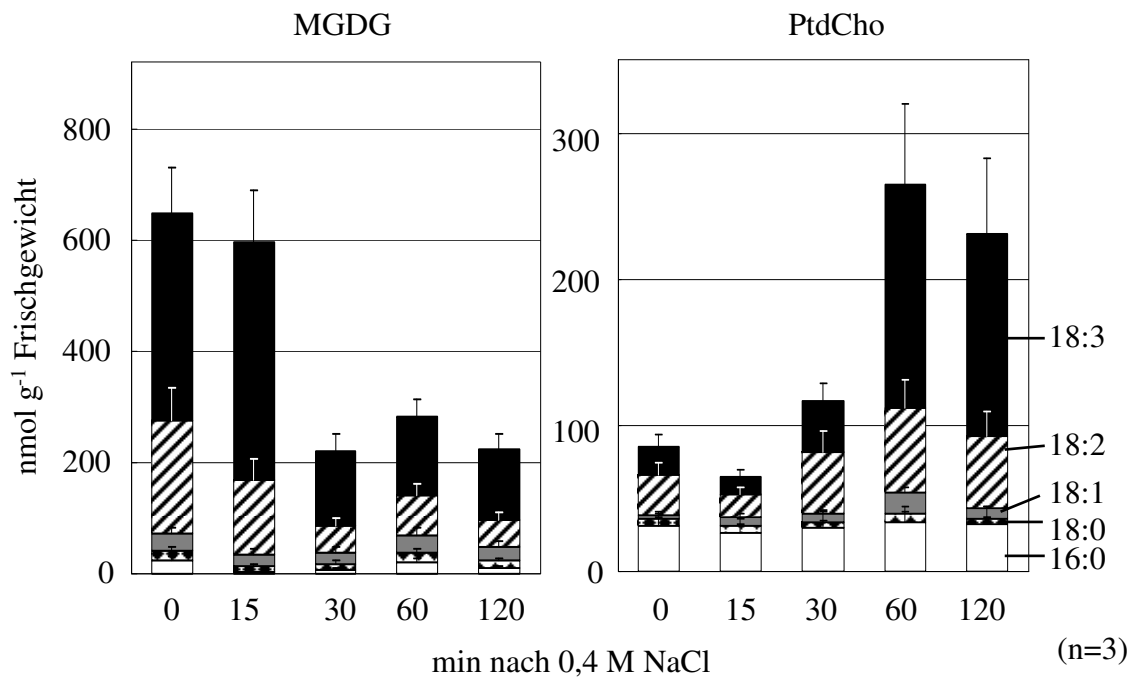


Abbildung 27: Änderungen der Fettsäurezusammensetzung von MGDG und PtdCho nach hyperosmotischen Stress in *Arabidopsis*-Rosettenblättern. Als Hauptblattlipide wurden MGDG und PtdCho als Anzeiger globaler Änderungen der Lipidzusammensetzung mit hyperosmotischem Stress analysiert. PtdCho, Phosphatidylcholin; MGDG, Monogalaktosyldiacylglycerol. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten dargestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten. Der Gehalt lipidassoziierter Fettsäuren ist zur Lipidmenge proportional.

Die Gehalte des dominanten plastidären Galaktolipids MGDG fielen nach 30 min hyperosmotischen Stresses ab, einhergehend mit einem Rückgang v.a. der assoziierten Fettsäuren 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die PtdCho-Gehalte änderten sich nicht signifikant bis nach 60 min hyperosmotischer Stimulation, worauf ein Anstieg in PtdCho beobachtet wurde. Der Anstieg in PtdCho wurde durch den Anstieg von 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ begleitet. Die Änderungen in den PtdCho-Gehalten und in der Fettsäurezusammensetzung traten später auf, als die in den PIs der identischen Proben. Trotz der deutlichen Änderungen der Fettsäurezusammensetzung einzelner Lipide änderte sich der Grad der Lipidsättigung in Gesamtlipidextrakten mit hyperosmotischem Stress kaum (Abb. 28).

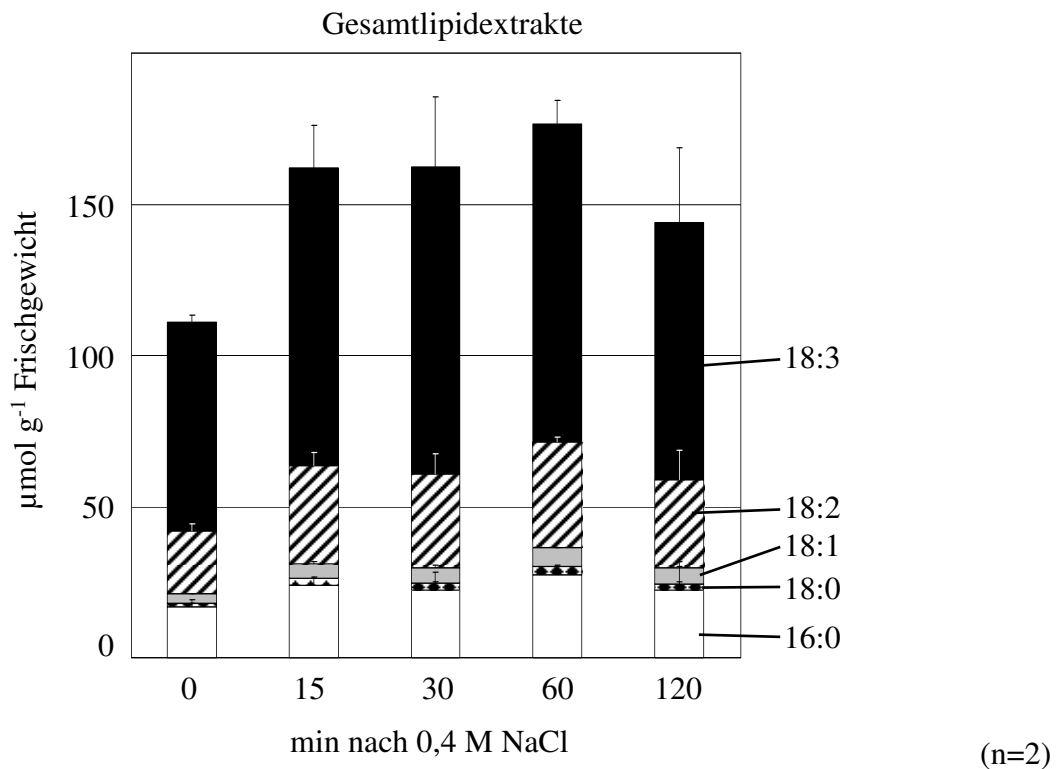
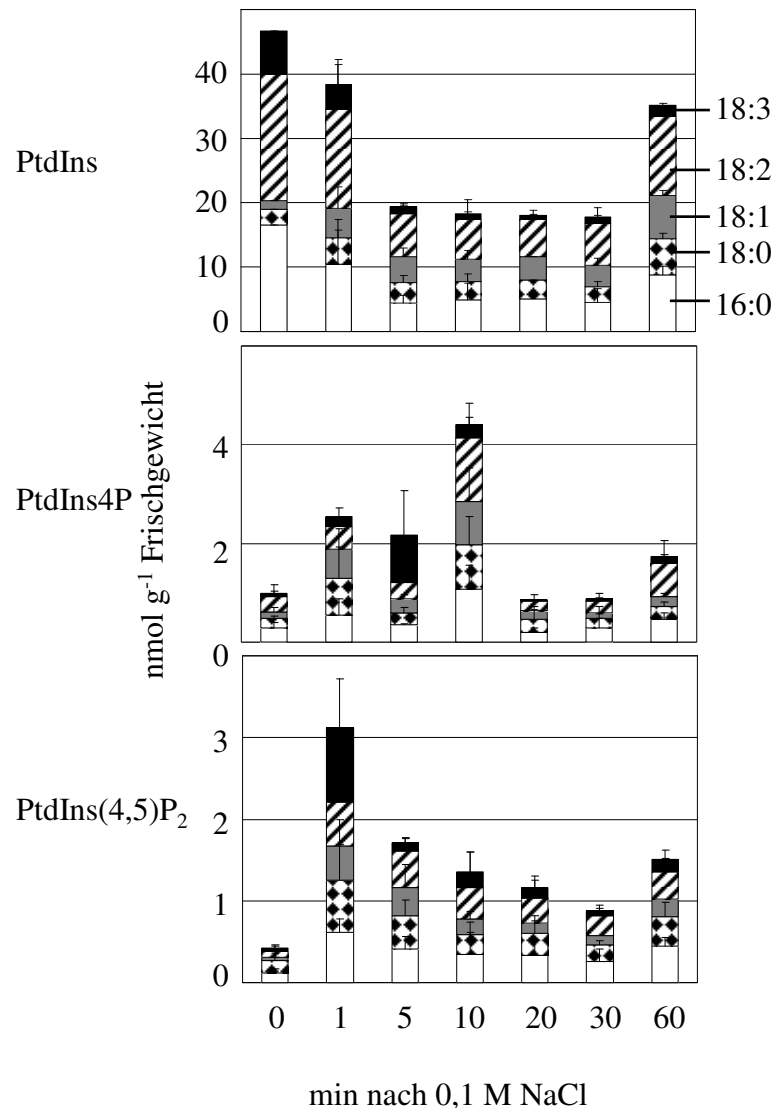


Abbildung 28: Änderungen der Fettsäurezusammensetzung in Gesamtlipidextrakten aus *Arabidopsis*-Rosettenblättern nach hyperosmotischem Stress. Gesamtlipide ohne die Trennung in Lipidklassen über DC wurden auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten dargestellt. Die Daten stammen aus zwei Experimenten und zeigen die Mittelwerte und den Standardfehler. Die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren sind zur Lipidmenge proportional.

Neben Rosettenblättern und Wurzeln von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden im Rahmen der Zusammenarbeit mit Dr. S. Mongrand (CNRS, Bordeaux, Frankreich) auch Tabak BY2-Zellkulturen hinsichtlich ihrer Reaktion auf Salzstress charakterisiert.

BY2-Suspensionskulturen wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben angezogen (s. 2.13.2) und durch direkte Zugabe der Salzlösung ins Medium hyperosmotisch gestresst. Die Zeitpunkte der Probenentnahme wurden in den Intervallen gegenüber den Experimenten an intakten Pflanzen verkürzt, da die Suspensionszellen direkt mit ihrem Medium in Kontakt standen. Die Proben zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden aus identisch wachsenden Kulturen entnommen und PI-Spezies untersucht (Abb. 29).



(n=4)

Abbildung 29: Änderungen der Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PI-Spezies nach hyperosmotischen Stressexperimenten in Tabak BY2-Zellkulturen. BY2-Suspensionskulturen wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben angezogen, durch direkte Zugabe der Salzlösung ins Medium hyperosmotisch gestresst und die angegebenen Lipide zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Experimenten. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind.

Die Menge von PtdIns fiel bereits innerhalb der ersten min hyperosmotischen Stresses im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ab. Nach fünf min war die Menge deutlich geringer. Der Wert nach 10 min bis zu 30 min blieb konstant niedrig, bis nach 60 min der Ausgangsgehalt wieder erreicht war. Die Fettsäurezusammensetzung von PtdIns

veränderte sich nur geringfügig. Nach fünf min erfolgte ein Rückgang in der Fettsäure 18:3 $\Delta^{9,12,15}$, was sich auch über den restlichen Zeitverlauf fortsetzte.

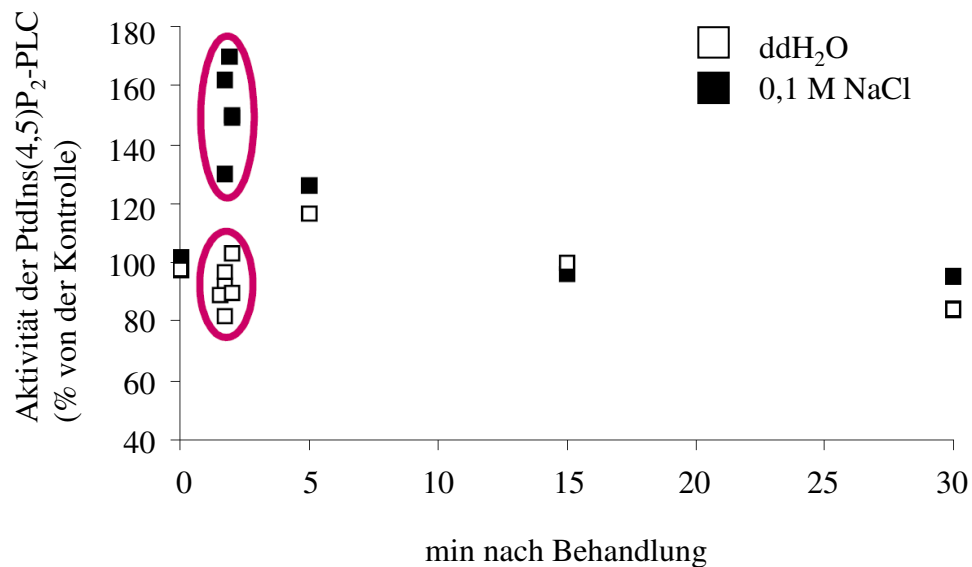
Wie schon in den Experimenten an *Arabidopsis*-Rosettenblättern zeigten PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ ein entgegengesetztes Muster zu dem von PtdIns. Der unstimulierte Wert und die beiden Werte von 20 und 30 min hyperosmotischem Stress waren zunächst niedrig.

Die Fettsäurezusammensetzungen von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in unstimulierten BY2-Zellen waren stark gesättigt. Nach nur einer min hyperosmotischen Stresses stiegen die Gehalte von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ stark an (Abb. 29). Die Fettsäurezusammensetzungen änderten sich gleichzeitig, und es waren in beiden Fällen deutlich mehr 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ vorhanden. Nach 10 min erreichte der PtdIns4P-Gehalt sein Maximum. Nach 20 und 30 min fiel die Menge an PtdIns4P auf die Ausgangsmenge der unstimulierten Kontrolle zurück. Die Fettsäureverteilung veränderte sich dabei wieder, und ähnelte der Ausgangssituation. Der Wert nach 60 min stieg wieder leicht an, und erreichte einen höheren Wert als den der unstimulierten Kontrolle.

Der Gehalt an PtdIns(4,5)P₂ stieg bereits nach einer min um das sechsfache der unstimulierten Kontrolle an, und das Lipid zeigte auch bei der Fettsäurezusammensetzung einen höheren Grad an Unsättigung v.a. durch einen höheren Anteil an assoziiertem 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. Der hohe Gehalt, der nach nur einer min erreicht wurde, war das Maximum des Zeitverlaufs. Zwischen fünf und 30 min hyperosmotischen Stresses sank die PtdIns(4,5)P₂-Menge kontinuierlich und stieg erst nach 60 min wieder leicht an. Die Fettsäurezusammensetzung nach einer min war deutlich stärker ungesättigt, war aber zu Zeitpunkten nach fünf min bis 60 min wieder stärker gesättigt.

BY2-Zellkulturen (100 mL Kulturen nach fünf Tagen) wurden nach Behandlung mit 0,1 M NaCl zu bestimmten Zeitpunkten durch Filtration geerntet und die Enzymaktivitäten der PtdIns(4,5)P₂-PLC in Mikrosomen gemessen (Abb. 30). Im Vergleich wurden Proben mit ddH₂O behandelt, nach gleichen Zeitpunkten geerntet und die Aktivität in diesen Proben auf 100 % gesetzt. Die stimulierten Proben zeigten nach einminütiger Behandlung mit 0,1 M NaCl im Vergleich zur ddH₂O-Kontrolle einen Anstieg um 30-70 % der Enzymaktivität. Dieser Anstieg konnte ausschließlich zu frühen Zeitpunkten gefunden werden. Die weiteren Enzymaktivitäten nach 5, 15 und 30 min Stimulation zeigten keine Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Meine Lipiddaten (Abb. 29) zeigten einen Anstieg in PtdIns(4,5)P₂ nach einer min 0,1 M NaCl, zu dieser Zeit war also auch die PtdIns(4,5)P₂-PLC Enzymaktivität hoch.



(Daten von F. Furt, Bordeaux, n=4)

Abbildung 30: Enzymaktivitätsanalyse der PtdIns(4,5)P₂-PLC in Mikrosomen von BY2-Zellkulturen nach Stimulation. Aus 100 mL Tabak BY2-Zellkulturen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten, 0-30 min, nach Behandlung mit ddH₂O oder 0,1 M NaCl Mikrosomen hergestellt, und die Enzymaktivitäten der PtdIns(4,5)P₂-PLC gemessen. Die Enzymaktivitäten der unstimulierten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Der höchste Wert der gesamten Zeitperiode wurde nach einer min und nach Behandlung mit 0,1 M NaCl erreicht (umrandet). PLC, Phospholipase C; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

Die bisherigen Ergebnisse wiesen daraufhin, dass PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂-Anstiege nach hyperosmotischem Stress in Pflanzenzellen v.a. auf die Bildung ungesättigter Spezies dieser Lipide zurückzuführen waren. Um zu testen, ob diese Beobachtung auch für nicht-pflanzliche Organismen gilt, wurden entsprechend Experimente in Hefe durchgeführt (Abb. 31).

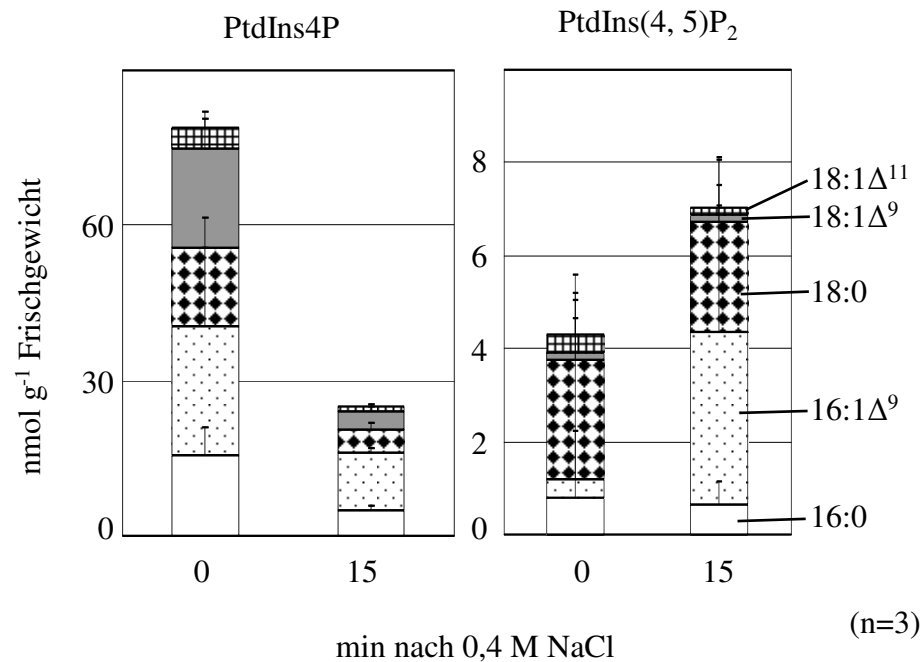


Abbildung 31: Änderungen der Fettsäurezusammensetzung von PI-Spezies in *S. cerevisiae* nach hyperosmotischen Stressexperimenten. Die Hefekulturen wurden durch Zugabe von 0,4 M NaCl ins Kulturmedium gestresst und die Lipide zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.

Die Phospholipide von *Saccharomyces cerevisiae* wurden ebenfalls unter hyperosmotischen Bedingungen analysiert. *S. cerevisiae* bildet hauptsächlich fünf Fettsäuren (16:0, 16:1 Δ^9 , 18:0, 18:1 Δ^9 , 18:1 Δ^{11}). Während in unstimulierten Kontrollzellen PtdIns4P zu etwa gleichen Teilen mit den Fettsäuren 16:0, 16:1 Δ^9 , 18:0 und 18:1 Δ^9 assoziiert war, wurden in PtdIns(4,5)P₂ fast ausschließlich 16:0 und 18:0 gefunden. Im Lipid PtdIns4P fand nach 15 min hyperosmotischem Stress ein deutlicher Rückgang in der Menge des Lipids statt. Die Fettsäurezusammensetzung änderte sich im Hinblick auf die Fettsäuren 16:1 Δ^9 und 18:1 Δ^9 , im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Im Gegensatz zu PtdIns4P zeigte der Gehalt von PtdIns(4,5)P₂ eine Zunahme des Lipids nach 15 min hyperosmotischen Stresses. Die Fettsäurezusammensetzung änderte sich hauptsächlich in der Fettsäure 16:1 Δ^9 .

In Blättern und Wurzeln von *Arabidopsis* fand ein Anstieg in PtdIns4P statt, einen solchen Anstieg fand man in *S. cerevisiae* nicht. Der Gehalt an PtdIns4P fiel nach 15 min hyperosmotischem Stress deutlich ab.

3.9 Flux von Lipidintermediaten des PtdIns-Weges in InsP₃ und DAG ist verstärkt in *InsP 5Ptase*-Pflanzen

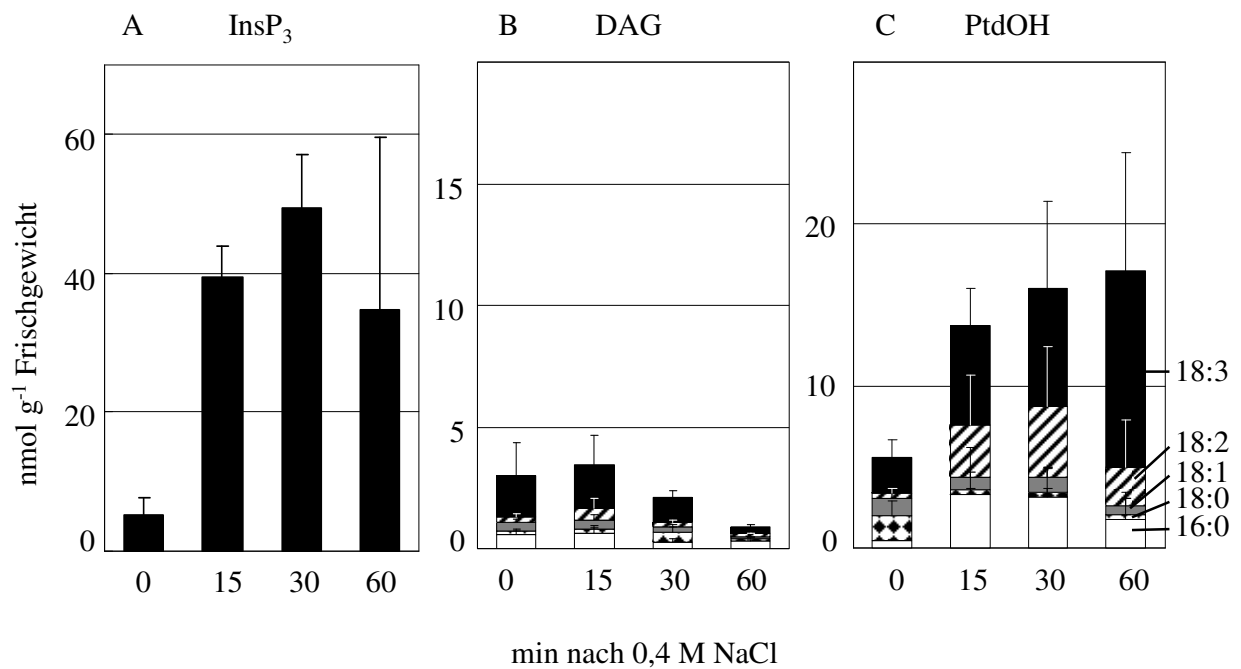
Der beobachtete Anstieg in den Lipiden PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ nach Stressapplikation stellte die Frage nach dem weiteren Umsatz der Lipide. Die PLC-Aktivitätsmessung in BY2-Zellen von F. Furt wies daraufhin, dass die Bildung von ungesättigtem PtdIns(4,5)P₂ zeitlich mit der Aktivierung der PLC koordiniert war. Änderungen der Produkte aus der PLC-vermittelten Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress wurden weiterverfolgt. Aus dem Lipid PtdIns(4,5)P₂ entsteht durch die PLC InsP₃ und DAG. DAG wird in Pflanzen sofort zu PtdOH phosphoryliert. Nach 15 min hyperosmotischem Stress wurde im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ein Anstieg in InsP₃ gefunden, der bereits beschrieben war (Pical et al., 1999; Dewald et al., 2005). Der Anstieg erfolgte nach 30 min und ging nach 60 min zurück. Dies entsprach dem Muster von PtdIns(4,5)P₂, das nach hyperosmotischem Stress beobachtet wurde. (InsP₃ Daten von Alina Mosblech, Abb. 32).

Neben InsP₃ entstand als Produkt der PLC-Hydrolyse DAG. Der DAG-Gehalt zeigte nach 15 min hyperosmotischen Stresses keine Veränderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach 30 min und deutlicher nach 60 min fiel die Menge an DAG deutlich ab. Im Gegensatz dazu zeigte PtdOH bereits nach 15 min eine deutliche Zunahme im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 32), die auch nach 30 und 60 min weiter anhielt. Eine Zunahme der Unsättigung der Fettsäurezusammensetzung in PtdOH ähnelte der Fettsäurezusammensetzung der stressinduzierten PIs, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂.

Um beurteilen zu können, ob die erhöhten PtdOH-Gehalte nach hyperosmotischem Stress kausal mit der PLC-Aktivierung und PtdIns(4,5)P₂-Hydrolyse zusammenhängen, wurden die Stressexperimente mit transgenen *InsP 5Ptase*-Pflanzen (Perera et al., 2006) wiederholt.

In den *InsP 5Ptase*-Pflanzen wird konstitutiv eine menschliche Typ I Inositolpolyphosphat 5-Phosphatase exprimiert, die spezifisch InsP₃ hydrolysiert. Der Wegfall von InsP₃ beeinflusst die PI-Lipid-Vorläufer durch einen „Zug“-Mechanismus (Perera et al., 2002; Perera et al., 2006), der zu sehr geringen Mengen von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ (Perera et al., 2002) führt, da PtdIns(4,5)P₂ ständig durch die PLC hydrolysiert wird. Diese ständige Hydrolyse sollte sich in erhöhter Produktion von DAG und PtdOH äußern. Im Vergleich zu den stimulierten Kontrollpflanzen fand sich

in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen deutlich weniger InsP_3 , wie anhand der beschriebenen Pflanzenlinie zu erwarten war (InsP_3 -Daten von Alina Mosblech, vgl. Abb. 32/33)



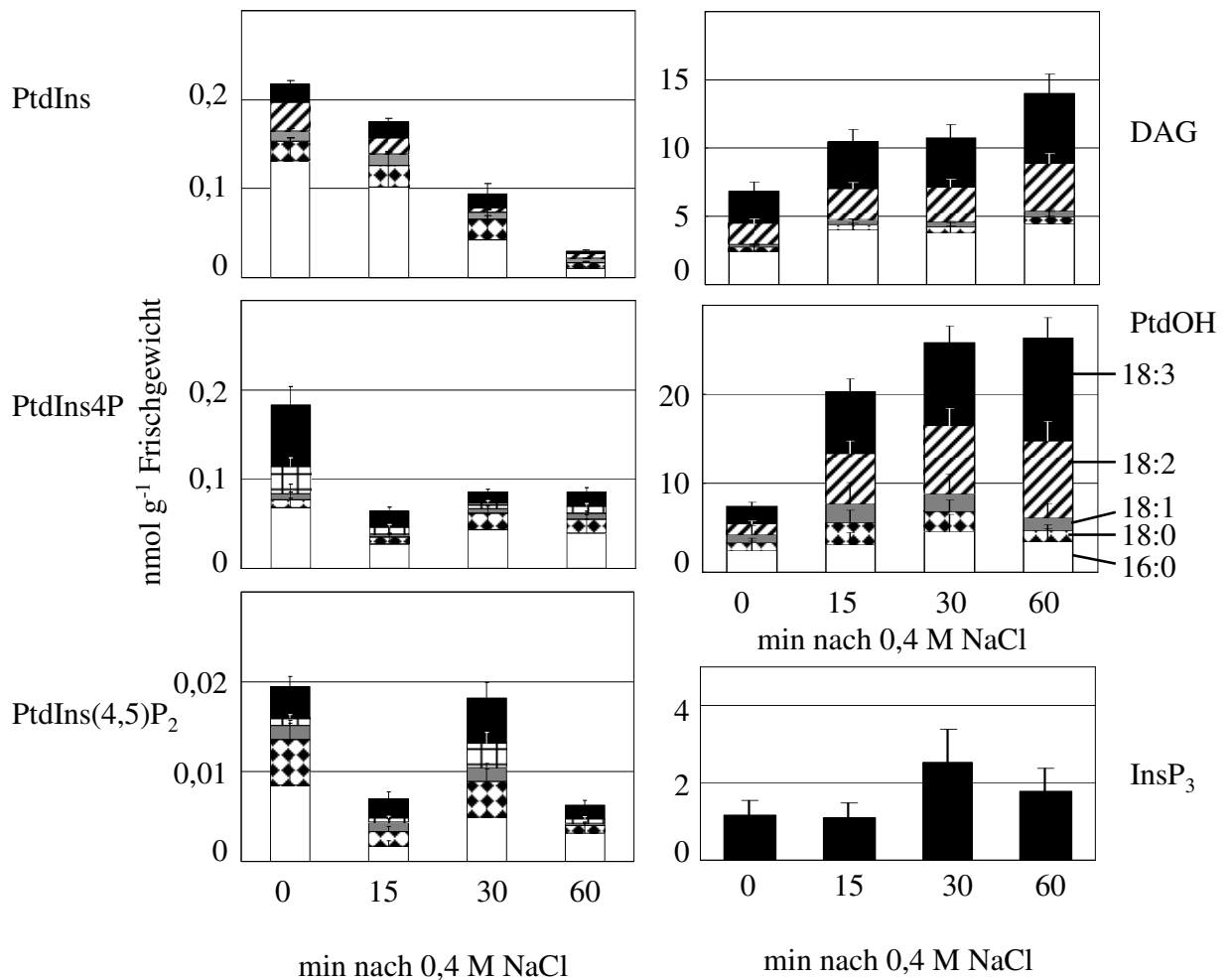
(InsP_3 -Daten von Alina Mosblech, n=2)

(n=4)

Abbildung 32: Änderungen in den Downstreamprodukten des PI-Synthesewegs während hyperosmotischem Stress in *Arabidopsis*-Pflanzen. *Arabidopsis*-Rosettenblätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress geerntet und die Gehalte des Botenstoffes InsP_3 und der Lipide DAG (B) und PtdOH (C) bestimmt. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind (nicht bei InsP_3). DAG, Diacylglycerol; InsP_3 , Inositoltriphosphat; PtdOH, Phosphatidsäure. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler bzw. -abweichung von zwei Experimenten bei InsP_3 und vier Experimenten bei DAG und PtdOH.

InsP 5Ptase-Pflanzen

Die Ergebnisse der *InsP 5Ptase*-Pflanzen nach hyperosmotischem Stress wurden im Vergleich zu unstimulierten Kontrollpflanzen betrachtet (Abb. 33).



(n=4) (InsP₃-Daten von Alina Mosblech, n=2)

Abbildung 33: Änderungen in den Downstreamprodukten des PI-Syntheseweges während hyperosmotischem Stress in *InsP 5Ptase*-Pflanzen. *Arabidopsis*-Rosettenblätter von *InsP 5Ptase*-Pflanzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress geerntet und die Gehalte von PIs, des Botenstoffes InsP₃ und der Lipide DAG und PtdOH bestimmt. DAG, Diacylglycerol; InsP₃, Inositoltriphosphat; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdOH, Phosphatidsäure. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind (nicht bei InsP₃). Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler bzw. -abweichung von zwei Experimenten bei InsP₃ und vier Experimenten bei DAG und PtdOH.

In den *InsP 5Ptase*-Pflanzen ging die Menge an PtdIns im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen nach 15 min hyperosmotischem Stress deutlich zurück und verringerte sich nach 30 und 60 min noch weiter. Nach hyperosmotischem Stress sank die Menge von PtdIns4P bereits nach 15 min im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen. Nach 30 min stieg die Menge an Lipid minimal wieder und blieb nach 60 min konstant. Die Fettsäurezusammensetzung zeigte eine Veränderung hauptsächlich in der Fettsäure 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. In den Blättern stimulierter Wildtyp-Kontrollpflanzen fand nach 15 min hyperosmotischem Stress ein Anstieg in PtdIns4P statt der über 60 min andauerte (vgl. Abb. 25). Dieses Verhalten konnte in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen nicht gefunden werden, sie verhielten sich entgegengesetzt. Die Menge an PtdIns(4,5)P₂ ging nach 15 min hyperosmotischem Stress, im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen zurück (Abb. 33). Nach 30 min stieg der Wert wieder an, und erreichte den Wert der unstimulierten Kontrollpflanzen. Der Wert nach 60 min 0,4 M NaCl entsprach dem Wert nach 30 min. Eine signifikante Veränderung in den Fettsäuren konnte nicht beobachtet werden.

Die Mengen PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ waren in den transgenen Pflanzen im Vergleich zu denen stimulierter Wildtyp-Kontrollpflanzen deutlich reduziert (vgl. Abb. 25/33).

Die Gehalte an DAG stiegen bereits nach 15 min stark an und erreichten ihr Maximum nach 60 min hyperosmotischem Stress im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen (Abb. 33). DAG zeigte im Vergleich zwischen stimulierten Kontrollpflanzen und *InsP 5Ptase*-Pflanzen ein völlig anderes Verhalten nach hyperosmotischem Stress. Während DAG in den stimulierten Kontrollpflanzen zurückging (Abb. 32), stieg es in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen an (Abb. 33), und die gemessenen DAG-Gehalte waren in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen fast fünfmal höher als in den Kontrollpflanzen. Der Gehalt an DAG in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen war im Vergleich zu den stimulierten Kontrollpflanzen zudem schon vor Gabe von 0,4 M NaCl erhöht.

In ähnlicher Weise stieg PtdOH in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen nach 15 min im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen an. Nach 30 min wurde noch mehr PtdOH gebildet, und der Gehalt an PtdOH blieb nach 60 min im Vergleich zum Wert 30 min unverändert. PtdOH und DAG veränderten nach 30 min ihre

Fettsäurezusammensetzungen, wobei der Grad der Unsättigung im Vergleich zur Fettsäurezusammensetzung der unstimulierten Kontrollpflanzen stieg.

PtdOH verhielt sich in den stimulierten Kontrollpflanzen und in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen ähnlich, lediglich die Menge an PtdOH war bereits nach 15 min in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen höher als in den stimulierten Kontrollpflanzen, und erreichte nach 60 min hyperosmotischem Stress auch einen höheren Wert als in den stimulierten Kontrollpflanzen (Abb. 33).

Der Anstieg in PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress zeigte nicht die Größenordnung wie die Reduktion in PtdIns (vgl. Skalen für PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in Abb. 25). Eine mögliche Erklärung für das Mengenunverhältnis könnte sein, dass die Reaktionsprodukte nicht gleichermaßen akkumulieren, sondern durch einen kontinuierlichen Durchfluß in weitere Downstreamprodukten des PI-Reaktionswegs umgesetzt werden („Flux“). Diese Annahme wurde durch die Größenordnung des InsP₃-Anstieges gestützt, die der des PtdIns Rückgangs entsprach und über die Konversion zu PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ mit diesem in Verbindung stand. Insgesamt wiesen die Daten der Stressexperimente daraufhin, dass i) stressinduzierte PIs stärker ungesättigt waren als konstitutiv vorhandene PIs, ii) die Bildung von stressinduzierten PIs mit der Bildung von InsP₃ und DAG einherging iii) DAG weiter zu PtdOH phosphoryliert wurde, das infolge seines Ursprungs in PtdIns(4,5)P₂ die entsprechende ungesättigte Fettsäurezusammensetzung zeigte. Ein möglicherweise unabhängiger Anstieg in weniger stark ungesättigtem PtdIns(4,5)P₂ wurde nicht durch die PLC hydrolysiert.

3.10 Transkriptgehalte salzstressinduzierter Gene als Nachweis für das Überleben unter Stressbedingungen

Die bisher präsentierten Lipiddaten wiesen daraufhin, dass während der Reaktion auf hyperosmotischen Stress eine globale Umorganisation des Lipidstoffwechsels stattfand. Um auszuschließen, dass es sich dabei um Abbauprozesse zellulärer Komponenten in einem sterbenden Organismus handelte, musste gezeigt werden, dass die Pflanzen den angelegten hyperosmotischen Stress von 0,4 M NaCl im Kulturmedium überlebten. Aus diesem Grunde sollte die längerfristige Induktion salzinduzierter Gene durch Northern-Blot-Experimente untersucht werden.

Pflanzen wurden identisch angezogen und gestresst wie für die hyperosmotischen Salzexperimente der Lipidanalysen. Die Pflanzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörst, RNA isoliert und ein Northern-Blot durchgeführt. Zwei salzinduzierte Gene, *HVA* und *RD20* (Takahashi et al., 2001), wurden dabei betrachtet, als Ladekontrolle diente das Referenzgen Aktin (*ACT8*). *HVA* (high-voltage-activated) ist ein salz- und ABA-induzierbarer Promotor, der in Verbindung mit Calciumkanälen steht. *RD20* kodiert ein Ca^{2+} -bindendes Protein, und wird durch Salz, ABA und Trockenheit induziert.

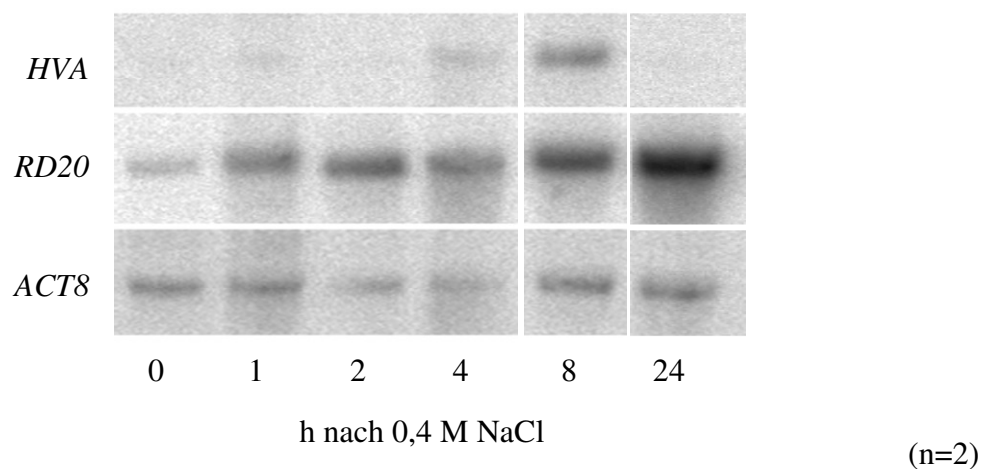


Abbildung 34: Änderungen der Transkriptgehalte nach hyperosmotischem Stress. Hybridisierung mit zwei spezifischen cDNA-Sonden, *HVA* und *RD20*, als Referenzgen wurden *ACT8* eingesetzt. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. *ACT*, Aktin; *HVA*, high-voltage-activated; *RD*, responsive to desiccation.

HVA zeigte bereits nach einer h eine leichte Induktion, das Maximum der Induktion erreichte das Gen nach acht h (Abb. 34). Nach 24 h konnte kein Transkript mehr nachgewiesen werden. *RD20* hatte bereits einen höheren Transkriptgehalt in der unstimulierten Kontrolle und der Transkriptgehalt stieg kontinuierlich über die ganze Zeit (0-24 h) der hyperosmotischen Stimulation. Da *RD20* noch ein deutliches Signal nach 24 h zeigte (Abb. 34), war der Nachweis für das Überleben der Pflanzen nach 24 h hyperosmotischem Stress erbracht. Die Pflanzen für die Lipidanalysen wurden maximal 60 min 0,4 M NaCl ausgesetzt, die beobachteten Effekte waren also nicht durch das Absterben der Pflanzen bedingt.

3.11 Subzelluläre Lokalisierung der Salzstressinduzierten PI-Spezies in *Arabidopsis*-Blättern

Die bisherigen Analysen ergaben, dass ein Teil des ungesättigten PtdIns(4,5)P₂ möglicherweise durch die PLC hydrolysiert wurde, während ein anderer Teil stressinduzierten PtdIns(4,5)P₂ intakt blieb und zu späteren Zeitpunkten akkumulierte. Um eine mögliche physiologische Funktion für das später auftretende intakte PtdIns(4,5)P₂ zu ergründen, wurde versucht die subzelluläre Lokalisation des Lipids zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress systematisch zu verfolgen.

3.11.1 Internalisierung von PtdIns(4,5)P₂ von der Plasmamembran in Endomembranen

Bisherige Experimente mit stressinduzierten Lipidänderungen wurden mit Lipidextrakten ganzer Zellen oder Gewebe durchgeführt. Mit Hilfe der Organellenpräparation war nun das Ziel, den PtdIns(4,5)P₂-Anstieg subzellulär zu lokalisieren. Zur Anreicherung der Plasmamembran wurde ein Zweiphasen-Gradient verwendet, der in der oberen Phase die angereicherten Plasmamembranen und in der unteren Phase restliche Endomembranen enthielt (Abb. 11). Im ersten Schritt der Lokalisierung wurden obere und untere Phase der Zweiphasen-Systeme auf ihre Lipidzusammensetzung analysiert und verglichen.

PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂

In der angereicherten Fraktion der Plasmamembran fand über 60 min hyperosmotischem Stress ein kontinuierlicher Anstieg in PtdIns statt (Abb. 35). Nach 60 min fand sich deutlich mehr 18:3Δ^{9,12,15} assoziierte Fettsäure an PtdIns als nach 0, 15 und 30 min hyperosmotischem Stress. PtdIns4P stieg nach 15 min Stress, im Vergleich zum unstimulierten Kontrollwert an. Nach 30 und 60 min fand ein deutlicher Rückgang statt, der zu beiden Zeitpunkten unter den Wert der unstimulierten Kontrolle fiel. Die Fettsäurezusammensetzung nach 15 min war ungesättigter als die der unstimulierten Kontrolle und der Lipide zu den Zeitpunkten 30 und 60 min. PtdIns(4,5)P₂ zeigte ein ähnliches Muster wie PtdIns4P, und es fand zunächst ein Anstieg nach 15 min im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle statt (Abb. 35). Nach 30 min ging der PtdIns(4,5)P₂-Gehalt jedoch auf den Gehalt der unstimulierten

Kontrolle zurück. Im Vergleich zu PtdIns(4,5)P₂ nach 0, 30 und 60 min hyperosmotischem Stress war PtdIns(4,5)P₂ nach 15 min stärker ungesättigt.

Der Anstieg in PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ konnte also nach 15 min in den angereicherten Fraktionen der Plasmamembranen gefunden werden. Der Anstieg in PtdIns4P tauchte daraufhin nach 60 min in den Endomembranen auf, und der Anstieg in PtdIns(4,5)P₂ setzte sich bereits nach 15 und 30 min in den Endomembranen fort.

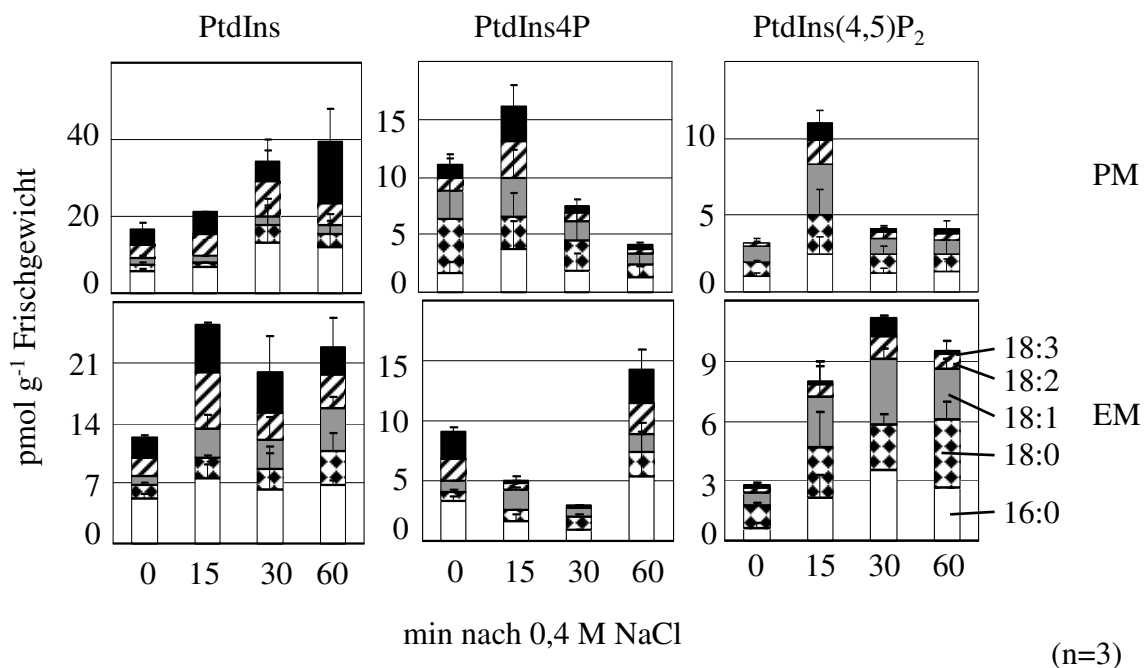


Abbildung 35: PtdIns und PI-Spezies in den angereicherten Fraktionen der Plasmamembran und Endomembranen nach hyperosmotischem Stress. Die erste Zeile stellt die Gehalte und Fettsäurezusammensetzungen der Lipide PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in der Plasmamembran (PM) dar. Die zweite Zeile bildet die Gehalte und Fettsäurezusammensetzungen der Lipide PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ der Endomembranen (EM) ab. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.

In der angereicherten Fraktion der Endomembranen stieg PtdIns nach 15 min, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, an. Die Zusammensetzung der Fettsäuren änderte sich nicht. PtdIns4P ging nach 15 min im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle und später nach 30 min zurück, nach 60 min war aber ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Nachdem das Lipid nach 30 min vorwiegend gesättigte

Fettsäuren aufwies, enthielt es nach 60 min mehr ungesättigte Fettsäuren. PtdIns(4,5)P₂ stieg im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle bereits nach 15 min an, und stieg nach 30 min weiter, und blieb auch nach 60 min über dem Wert von 15 min. Die Fettsäurezusammensetzung von PtdIns(4,5)P₂ enthielt nach 30 min mehr 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ stiegen also zunächst vorübergehend in der Plasmamembran an, waren zu späteren Zeitpunkten aber verstärkt in den Endomembranen zu finden (Abb. 35).

In der Plasmamembran fand nach 15 und 30 min ein paralleler Anstieg in PtdEtn und PtdCho statt. Sowohl in PtdEtn als auch in PtdCho war dann nach 60 min ein signifikanter Rückgang zu sehen. Die Gehalte dieser beiden Lipide sanken unter den Wert der unstimulierten Kontrollen.

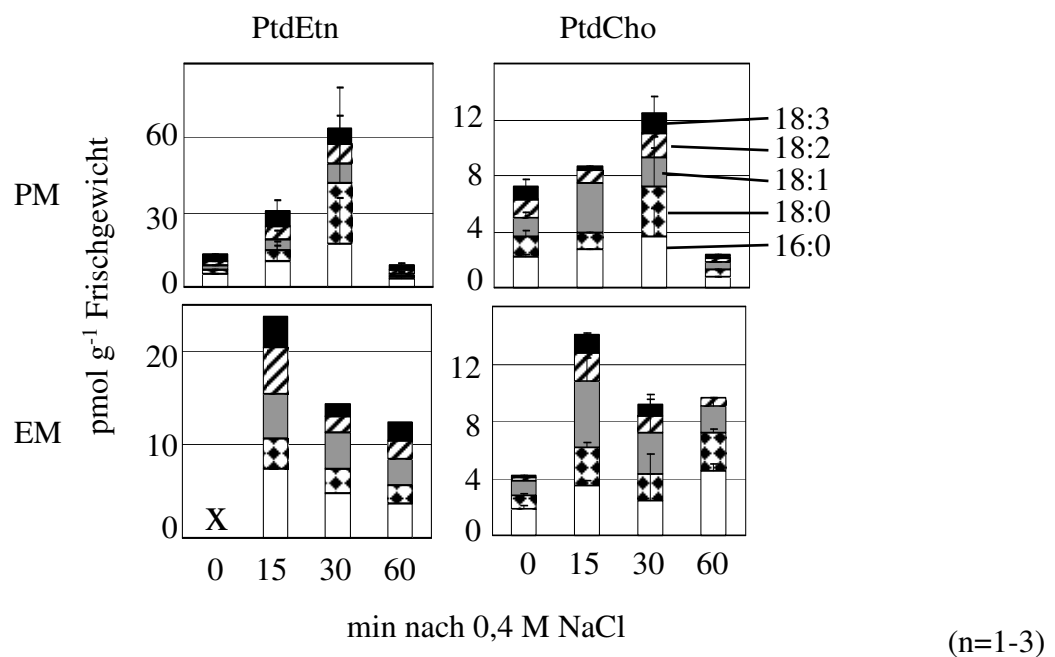


Abbildung 36: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in der Plasmamembran und den Endomembranen nach hyperosmotischem Stress. Die erste Zeile stellt die Gehalte und Fettsäurezusammensetzungen der Lipide PtdEtn und PtdCho in der Plasmamembran (PM) dar. Die zweite Zeile bildet die Gehalte und Fettsäurezusammensetzungen der Lipide PtdEtn und PtdCho der Endomembranen (EM) ab. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. x verweist auf die fehlende unstimulierte Kontrolle von PtdEtn aus den Endomembranen. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten. PtdEtn konnte nur einmal analysiert werden und enthält keinen Standardfehler.

Die Analyse der Endomembranen war aufgrund der Polymerzusammensetzung des unteren Teils des Zweiphasen-Gradienten schwierig, was dazu führte, dass PtdEtn nur einmal analysiert werden konnte. Die unstimulierte Kontrolle konnte leider für PtdEtn nicht ausgewertet werden. PtdEtn und PtdCho verhielten sich aber in den Endomembranen sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sich die unstimulierte Kontrolle von PtdEtn ähnlich wie die unstimulierte Kontrolle von PtdCho verhielt. In den Endomembranen fand ein Anstieg von PtdEtn und PtdCho bereits nach 15 min statt, nach 30 min erfolgte eine Verminderung, wobei sich der Wert bis 60 min konstant hielt. Eine signifikante Änderung in der Fettsäurezusammensetzung konnte nicht beobachtet werden.

3.12 Keine Akkumulation von PtdIns(4,5)P₂ in ER, Plastiden oder Zellkernen

Das Erscheinen erhöhter PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂-Gehalte in Endomembranen warf die Frage auf, welche Endomembransysteme die gesteigerten Lipidgehalte enthielten. Die Endomembranen pflanzlicher Blattzellen setzen sich hauptsächlich aus ER-Membranen, plastidären Membranen, und Zellkernen zusammen. Daher wurden die Lipidgehalte und individuelle Fettsäurezusammensetzungen dieser Organellen untersucht (Abb. 37, 38).

In der angereicherten Fraktion der ER-Membranen fand über den gesamten Zeitraum der Stimulation ein Anstieg von PtdIns im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen statt. Nach 60 min hyperosmotischem Stress war das gebildete PtdIns ungesättigt im Vergleich zum unstimulierten Kontrollwert (Abb. 37). PtdIns4P aus den angereicherten Fraktionen der ER-Membranen zeigte über den gesamten Zeitverlauf keine Änderung. Auch die Fettsäurezusammensetzung veränderte sich über die gesamten 60 min nicht. Der PtdIns(4,5)P₂-Gehalt der ER-Fraktion ging während der Stimulation kontinuierlich zurück. PtdIns(4,5)P₂ hatte dabei zunächst eine ungesättigte Fettsäurezusammensetzung in der unstimulierten Kontrolle, der Grad der Sättigung stieg aber nach 15 min an (Abb. 37, oben).

PtdIns zeigte in der angereicherten Fraktion der Plastiden eine Abnahme in der Lipidmenge über den gesamten Zeitraum des experimentellen Verlaufs (Abb. 37, Mitte). Die Fettsäurezusammensetzung änderte sich dabei kaum im Vergleich zu den

unstimulierten Kontrollen. PtdIns4P stieg in den Plastidenmembranen nach 15 min hyperosmotischen Stresses an, fiel aber nach 30 min unter den Wert der unstimulierten Kontrollpflanzen. PtdIns(4,5)P₂ zeigte im Fettsäuremuster des Lipids über den ganzen Zeitraum keine Veränderungen und PtdIns(4,5)P₂ war stark gesättigt. Die Menge des Lipids stieg nach 15 min minimal an, um nach 30 min wieder abzufallen.

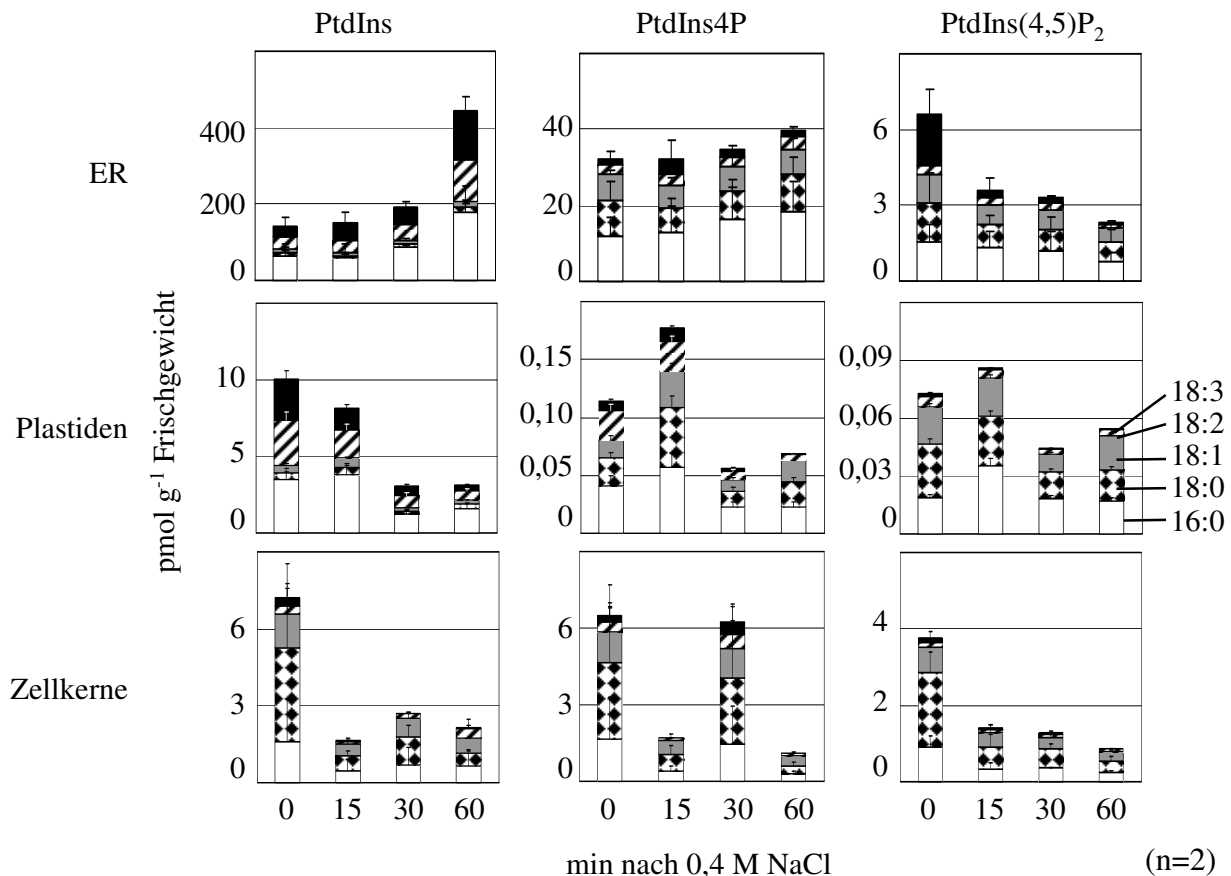


Abbildung 37: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PI-Spezies in der verschiedenen Endomembranfraktionen nach hyperosmotischem Stress. Die angegebenen PtdIns und PIs wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress aus ER (oben), Plastiden (mitte) und Zellkernen (unten) analysiert. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von zwei Experimenten.

In der angereicherten Fraktion der Zellkerne war PtdIns zunächst stark gesättigt (Abb. 37 unten). Der PtdIns-Gehalt fiel nach 15 min im Vergleich zum unstimulierten Kontrollwert ab. Der Wert von PtdIns nach 30 und 60 min veränderte sich im Vergleich zum Wert von 15 min kaum. PtdIns4P ging nach 15 min zurück, stieg nach 30 min wieder auf den Ausgangswert der unstimulierten Kontrolle, um nach 60 min wieder den

Wert von 15 min zu erreichen. Die Fettsäurezusammensetzung war hier zunächst gesättigt und zeigte über den gesamten Zeitverlauf kaum eine Änderung. PtdIns(4,5)P₂ verhielt sich ähnlich wie PtdIns. Der unstimulierte Wert war der höchste Wert über den gesamten Zeitverlauf. Die PtdIns(4,5)P₂-Gehalte nach 15, 30 und 60 min fielen ab und die Fettsäurezusammensetzung der vier betrachteten Zeitpunkte verändert sich nicht. Insgesamt zeigt die Betrachtung der Hauptendomembransysteme, dass weder in ER-Membranen, noch in Plastiden oder Zellkernen ein stressinduzierter Anstieg der Gehalte von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ zu verzeichnen war. Die intrazelluläre Lokalisierung der vermehrt gebildeten PIs war also an diesem Punkt noch immer unklar.

Neben den PIs wurden auch Struktur lipide betrachtet. In der angereicherten Fraktion der ER-Membranen (Abb. 38, oben) war im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Veränderung in PtdEtn über den gesamten Zeitraum zu beobachten. PtdCho aus den angereicherten Fraktionen der ER-Membranen zeigte einen Anstieg nach 15 min hyperosmotischen Stresses, verbunden mit einem Anstieg in der Fettsäure 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach 30 min sank der Wert wieder leicht, und hatte nach 60 min den gleichen Wert wie nach 15 min erreicht.

PtdEtn zeigte in der angereicherten Fraktion der Plastiden (Abb. 38, mitte) einen konstanten Wert nach 15 min hyperosmotischen Stresses im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Einen Rückgang zeigte das Lipid nach 30 und 60 min, beide Zeitpunkte zeigten hier den gleichen Wert und die ähnliche Fettsäurezusammensetzung.

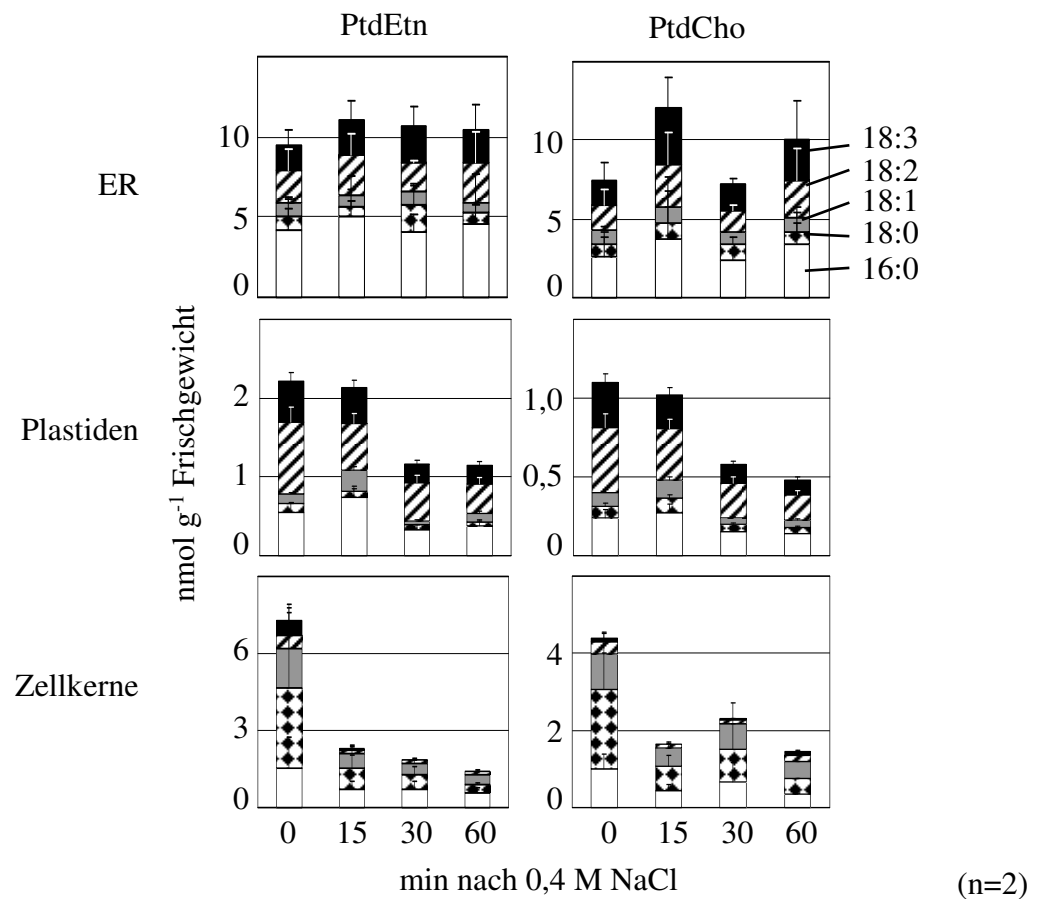


Abbildung 38: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in verschiedenen Endomembranfraktionen nach hyperosmotischem Stress. Die angegebenen Strukturlipide PtdEtn und PtdCho wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress aus ER (oben), Plastiden (mitte) und Zellkernen (unten) analysiert. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von zwei Experimenten.

Die gleiche Verteilung wie PtdEtn zeigte PtdCho nach hyperosmotischem Stress. Die Werte der unstimulierten Kontrolle und dem 15 min Wert nach 0,4 M NaCl zeigten keinen Unterschied, ebenso die beiden Werte nach 30 und 60 min, wobei die Werte nach 30 und 60 min um etwa die Hälfte geringer waren als die Werte nach 0 und 15 min.

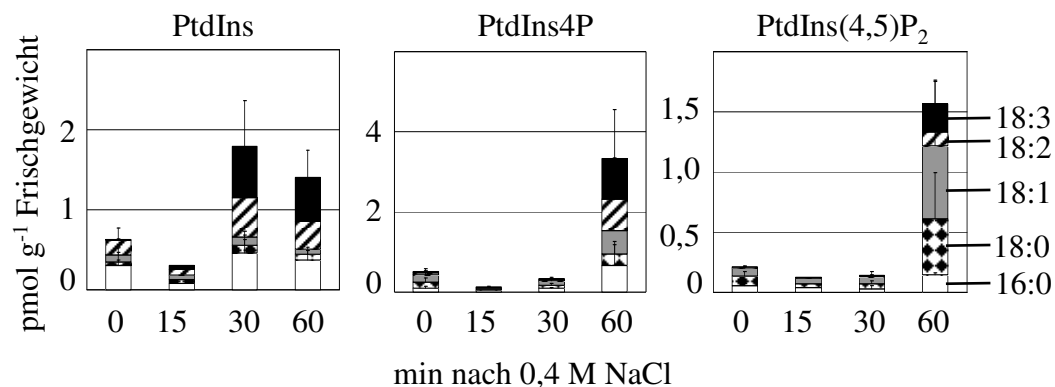
In der angereicherten Fraktion der Zellkerne (Abb. 38, unten) war PtdEtn gesättigt und fiel nach 15 min im Vergleich zum unstimulierten Kontrollwert deutlich ab. Der Wert von PtdEtn nach 30 und 60 min veränderte sich kaum im Vergleich zum Wert von 15 min hyperosmotischen Stresses. PtdCho fiel nach 15 min deutlich ab im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, stieg nach 30 min wieder kurz an, und erreichte nach 60 min

wieder den Wert von 15 min. Die Fettsäurezusammensetzung hier war gesättigt und zeigte über den gesamten Zeitverlauf kaum eine Änderung.

3.13 Akkumulation von PtdIns(4,5)P₂ in CCV-angereicherten Fraktionen

Weiterführende Überlegungen, welche Endomembranen nach hyperosmotischem Stress erhöhte Gehalte an PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ enthalten könnten, führten zur Analyse von CCVs.

Angereicherte Fraktionen von CCVs wurden über einen Zeitraum von 60 min hyperosmotischem Stress analysiert (Abb. 39). Der Wert der Nullkontrolle und der 15 min Wert zeigten zunächst für PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ gesättigte Lipide. Nach 30 min Salzstress zeigte PtdIns einen Anstieg der Lipidmenge, der nach 60 min unwesentlich zurückging. PtdIns4P zeigte über den Zeitraum von 30 min zunächst keine signifikante Änderung, weder in der Lipidmenge noch in der Fettsäurezusammensetzung. Nach 60 min hyperosmotischem Stress hingegen fand ein fünffacher Anstieg der Lipidmenge statt. Ein sehr ähnliches Muster zeigte auch PtdIns(4,5)P₂, dessen Gehalt über 30 min zunächst nicht, aber nach 60 min signifikant anstieg. Die Fettsäurezusammensetzung der 30- und 60 min-Werte zeigte einen höheren Grad an Un sättigung.



(n=3)

Abbildung 39: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs in CCVs nach hyperosmotischem Stress. Die angegebenen Lipide PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress aus CCVs analysiert. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung von drei Experimenten.

3.14 Anstieg der PtdCho- und PtdEtn-Gehalte in CCVs nach Salzstress

Neben CCV-assoziierten PIs wurden auch die Strukturlipide PtdEtn und PtdCho aus den CCV-angereicherten Fraktionen analysiert. PtdEtn zeigte dabei einen Anstieg in der Lipidmenge über den gesamten Zeitraum von 60 min im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen. Die Fettsäurezusammensetzung von PtdEtn nach 60 min war ungesättigter als die Zusammensetzung der unstimulierten Kontrolle. In den ersten 30 min hyperosmotischem Stress zeigte sich bei PtdCho weder in der Lipidmenge noch der Fettsäurezusammensetzung eine Änderung. Nach 60 min fand ein Anstieg in PtdCho statt, und der Grad der Unsattheit der Fettsäurezusammensetzung nahm zu.

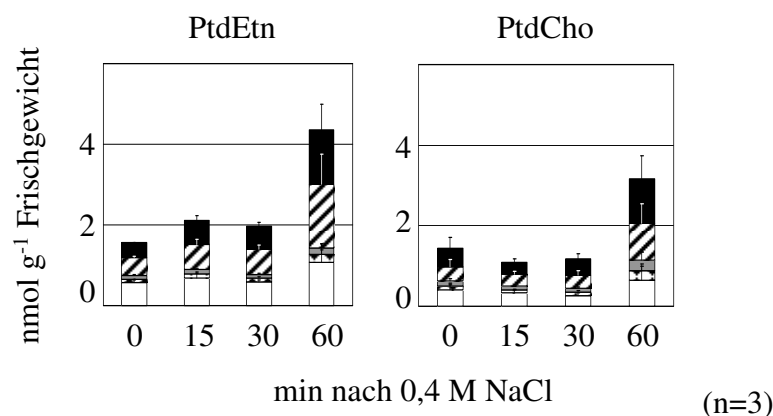


Abbildung 40: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in der CCVs nach hyperosmotischem Stress. Die angegebenen Lipide PtdEtn und PtdCho wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress aus CCVs analysiert. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin, CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziiierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung von drei Experimenten.

3.15 Clathrin akkumuliert nach Salzstress in CCVs

Die Lipiddaten der CCV-angereicherten Fraktionen zeigten, dass i) der Gehalt an PIs in den CCVs mit hyperosmotischem Stress anstieg und ii) dass auch Strukturlipide verstärkt in CCVs inkorporiert wurden.

Um zu testen, ob auch auf Proteinebene eine verstärkte Bildung von CCVs mit hyperosmotischem Stress detektierbar ist, wurden CCVs aus Rosettenblättern von *Arabidopsis*-Kontrollpflanzen nach jeweils 0 und 60 min hyperosmotischem Stress

angereichert. Die Anreicherung erfolgte aus identischen Mengen Frischgewicht. Von den erhaltenen CCV-Fractionen wurden gleiche Volumina auf ein SDS-Proteingel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Identische SDS-Proteingele wurden beladen und für die Immundetektion von Clathrin verwendet (Abb. 41) (s. 2.19).

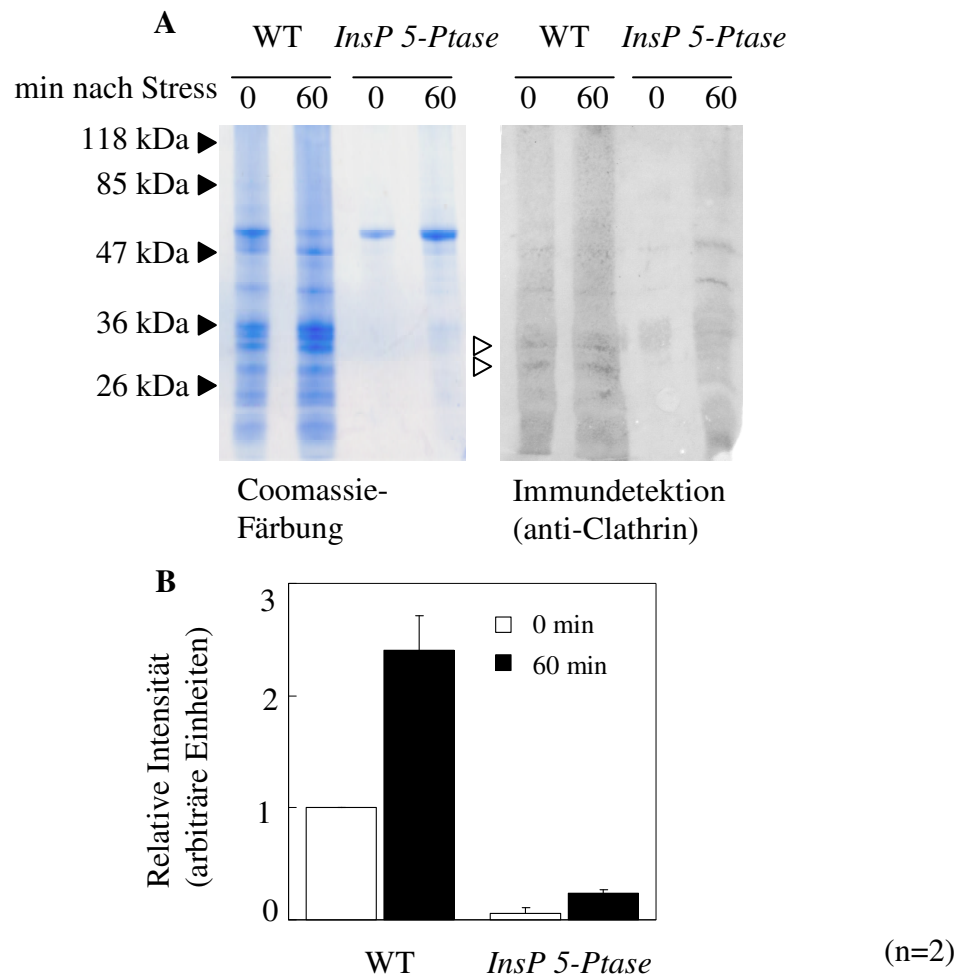
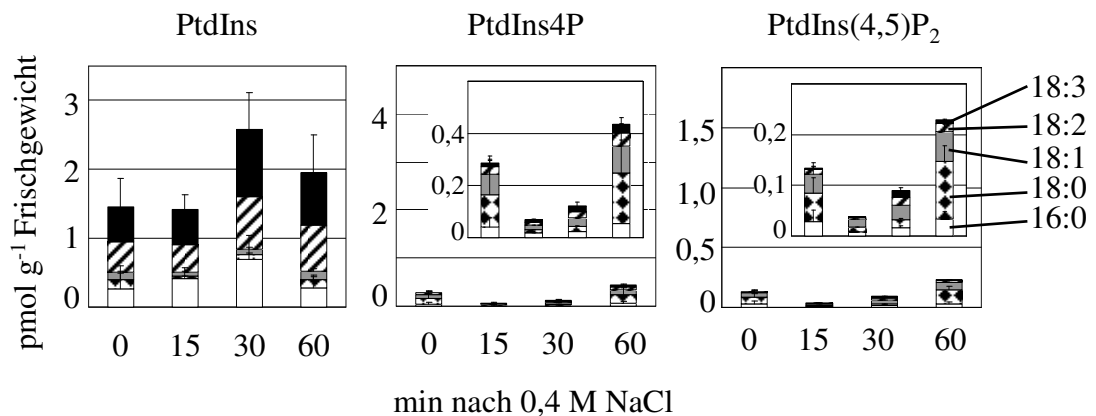


Abbildung 41: Proteinzusammensetzung und Proteingehalte von CCVs. CCVs wurden aus *Arabidopsis*-Rosettenblättern zu den Zeitpunkten 0 und 60 min nach hyperosmotischem Stress isoliert. Dabei wurden Kontrollpflanzen (WT) und *InsP 5Ptase*-Pflanzen verglichen. A, Coomassiegefärbtes SDS-PAGE-Gel von CCVs assoziierten Proteinen in Kontroll- und *InsP 5Ptase*-Pflanzen vor und nach hyperosmotischem Stress (links). Immundetektion von Clathrin mit den identischen Proben (rechts). Die offenen Pfeile an der Immundetektion zeigen die leichten Clathrinketten an. B, Die Summe der Bandenintensitäten der einzelnen Spuren des Coomassiegels (A) wurden relativ zur Intensität der unstimulierten Kontrollpflanzen quantifiziert (B). Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und zeigten ähnliche Ergebnisse. Die Daten (B) stellen die Mittelwerte und den Standardfehler aus zwei Experimenten dar.

Das SDS-Proteingel zeigt die Proteinmuster der angereicherten CCV-Fractionen nach 0 und 60 min Salzstress. Nach 60 min hyperosmotischem Stress zeigte sich eine Anreicherung der Proteinmenge gegenüber den unstimulierten Kontrollen (Abb.41A). Die Immundetektion von Clathrin wurde mit den identischen Proben durchgeführt und zeigte deutliche Banden der leichten Clathrinkette. Das Antiserum gegen Clathrin wurde bereits weiter oben beschrieben (s. 2.4., Tabelle 1).

Um zu testen, ob PIs für die Assoziation von Clathrin mit Vesikeln in *Arabidopsis* benötigt wurden, wurden auch *InsP 5Ptase*-Pflanzen hyperosmotisch stimuliert, nach 60 min Stress wurden CCVs angereichert und die enthaltenen Proteine ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 41A). Die Präparationen wurden unter identischen Bedingungen wie die der Kontrollpflanzen durchgeführt, ausgehend von der gleichen Menge Frischgewicht. Gegenüber den Kontrollpflanzen waren die Proteinmengen in CCVs der deutlich verringert und waren auch nach 60 min hyperosmotischem Stress noch deutlich niedriger (Abb. 41B). Die Daten weisen daraufhin, dass in *InsP 5Ptase*-Pflanzen deutlich weniger Proteine mit den isolierten Vesikeln assoziiert sind. Unter anderem konnte in Vesikeln, die aus *InsP 5Ptase*-Pflanzen isoliert wurden, auch im Immunoblot kein Clathrin nachgewiesen werden. Gegenüber den komplexen Proteinmustern der CCVs von Kontrollpflanzen war in Vesikeln aus *InsP 5Ptase*-Pflanzen nur eine einzelne Proteinbande von ca. 55 kDa zu beobachten. Die Identität dieses Proteins ist unklar.

Um zu testen, ob die verringerte Vesikelassoziation von Clathrin in *InsP 5Ptase*-Pflanzen mit veränderten Lipidgehalten der Vesikel einhergeht, wurden CCVs von *InsP 5Ptase*-Pflanzen auf ihre Gehalte und Zusammensetzung verschiedener Lipide untersucht.



(n=3)

Abbildung 42: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs in CCVs nach hyperosmotischem Stress in *InsP 5Ptase*-Pflanzen. Die angegebenen Lipide PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress aus CCVs aus *InsP 5Ptase*-Pflanzen analysiert. Die Hauptskalen sind zum besseren Vergleich denen aus Abb. 39 identisch abgebildet. Die Einsätze zeigen die Daten in besser sichtbarem Maßstab. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung von drei Experimenten.

Da der Membrankörper der Vesikel aus Lipiden besteht, wurden aus den angereicherten CCVs von Kontrollpflanzen und *InsP 5Ptase*-Pflanzen auch die Strukturlipide PtdEtn und PtdCho analysiert (Abb. 43).

In den Kontrollpflanzen war ein Anstieg der PtdEtn- und PtdCho-Gehalte über 60 min des hyperosmotischen Stresses beobachtet worden (Abb. 40). Die Fettsäurezusammensetzungen veränderten sich dabei kaum.

In den *InsP 5Ptase*-Pflanzen war der Grundgehalt von PtdIns im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollpflanzen (Abb. 42) leicht erhöht, und die Fettsäurezusammensetzung war deutlich stärker ungesättigt als in den Kontrollpflanzen (Abb. 39). Nach 15 min hyperosmotischem Stress zeigte sich in PtdIns in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen keine Änderung in Gehalt oder der Fettsäurezusammensetzung. Ein deutlich unterschiedliches Muster im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigten die *InsP 5Ptase*-Pflanzen in den Gehalten von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂, die erwartungsgemäß beide deutlich niedriger waren.

Zum besseren Vergleich sind die Daten von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ im selben Maßstab (Abb. 42) dargestellt wie die der Kontrollpflanzen (vgl. Abb. 39). Die Einsätze zeigen die Muster vergrößert. Nach 60 min waren in den *InsP 5-Ptase*-Pflanzen wie auch in den Kontrollpflanzen die größten Mengen an PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ zu beobachten, verbunden mit einer eher gesättigten Fettsäurezusammensetzung.

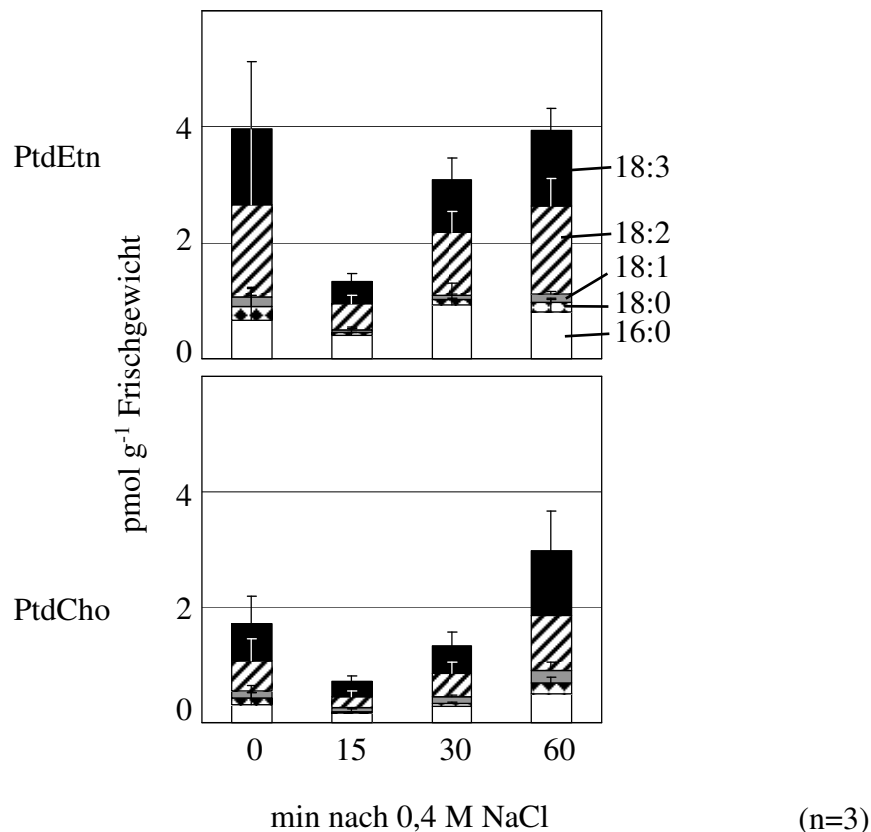


Abbildung 43: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in CCVs nach hyperosmotischem Stress in *InsP 5Ptase*-Pflanzen. Die angegebenen Lipide PtdEtn und PtdCho wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress aus CCVs aus *InsP 5Ptase*-Pflanzen analysiert. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin, CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel. Dargestellt sind die Gehalte lipidassoziierter Fettsäuren, die zur Lipidmenge proportional sind. Die unterschiedlichen Fettsäuren sind in verschiedenen Balkensegmenten abgebildet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung von drei Experimenten.

In den *InsP 5Ptase*-Pflanzen fanden sich im Vergleich zu den Kontrollpflanzen schon vor Stimulation ein viel höherer PtdEtn-Gehalt, der nach 15 min Stimulation zurückging, nach 30 min wieder anstieg, und nach 60 min wieder den Ausgangswert zu erreichen. Während in den Kontrollpflanzen ein Anstieg über die ganze stimulierte

Zeitperiode beobachtet wurde, fand in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen also zuerst ein Rückgang statt.

Bei den *InsP 5Ptase*-Pflanzen veränderte sich, wie auch schon in den Kontrollpflanzen, die Fettsäurezusammensetzung nicht. In den *InsP 5Ptase*-Pflanzen war ein ähnlicher Verlauf während des hyperosmotischen Stresses zu beobachten, und die Ausgangswerte der Kontroll- und *InsP 5Ptase*-Pflanzen hatten etwa gleiche Gehalte. Wie schon in den Kontrollpflanzen beobachtet, fand nach 15 min ein Rückgang in der Lipidmenge statt, nach 30 und 60 min war jeweils ein Anstieg zu verzeichnen. Die Menge von PtdCho sowohl in den Kontrollpflanzen als auch in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen hatte nach 60 min den gleichen Wert erreicht. Insgesamt war nach Stimulation kein signifikanter Unterschied der PtdEtn- und PtdCho-Gehalte zwischen Kontroll- und *InsP 5Ptase*-Pflanzen zu erkennen (vgl. Abb. 40 und 43).

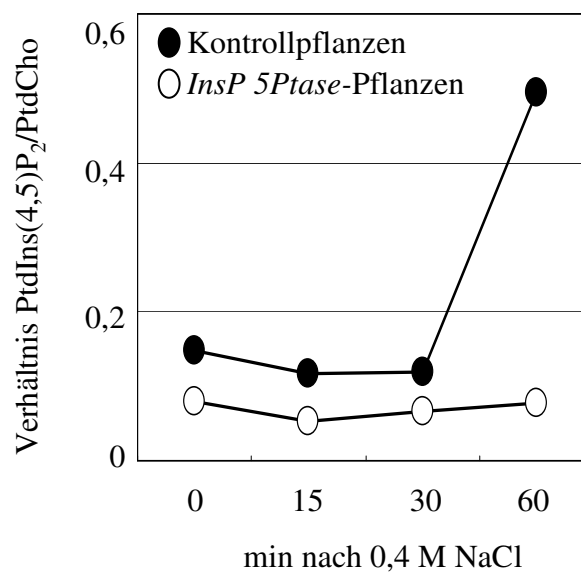


Abbildung 44: Verringerteres Verhältnis von CCV-assoziiertem PtdIns(4,5)P₂ zu PtdCho in Kontroll- und *InsP 5Ptase*-Pflanzen nach hyperosmotischem Stress. Aus den bisher gezeigten Daten für CCV-assoziierte Lipide der Kontrollpflanzen (Abb. 39/40) und *InsP 5Ptase*-Pflanzen (Abb. 42/43) wurde das Verhältnis der PtdIns(4,5)P₂-Gehalte und PtdCho-Gehalte berechnet. PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, CCV, Clathrin-beschichtete Vesikel. Mittelwerte und Standardabweichung liegen den Werten aus den Abb. 39/40 und Abb. 42/43 zugrunde.

Um die in *InsP 5Ptase*-Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen veränderte Lipidzusammensetzung von CCVs zu dokumentieren, wurden für jeden Zeitpunkt nach Stimulation die Verhältnisse der PtdIns(4,5)P₂-Gehalte und der PtdCho-Gehalte

gebildet (Abb. 44). Die Daten zeigen eine stressinduzierte Erhöhung des PtdIns(4,5)P₂-Gehalts der CCVs nach 60 min, die nur in den Kontrollpflanzen stattfand und in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen fehlte.

3.16 Kolokalisierung fluoreszenzmarkierter Reporter für PtdIns(4,5)P₂ und Clathrin

Aufgrund der bisher präsentierten biochemischen Daten lag die Vermutung nahe, dass der salzinduzierte Anstieg in PtdIns(4,5)P₂ nach 60 min in *Arabidopsis* mit der Rekrutierung von Clathrin und anderen vesikelassoziierten Proteinen an CCVs zusammenhängt. Diese Hypothese sollte mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Der hier gewählte Ansatz beruht auf der Koexpression einer fluoreszenzmarkierten PtdIns(4,5)P₂-bindenden Protein-Domäne (PLCδ₁-PH) mit fluoreszenzmarkiertem Clathrin. Die markierte PLCδ₁-PH-Domäne und Clathrin wurden transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert und ihre subzelluläre Verteilung vor und nach Salzstress unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (s. 2.25).

PtdIns(4,5)P₂ lag in ungestressten Zellen in nur sehr geringen Mengen in der Zelle vor, so dass die Detektion des Lipids schwierig war. Die stabil exprimierte PLCδ₁-PH-Domäne in BY2-Suspensionskulturen sollte sich zunächst frei im Cytosol befinden, ohne PtdIns(4,5)P₂ zu binden oder eine schwache Plasmamembranlokalisierung zeigen (van Leeuwen et al, 2007). In Abb. 45 war eine Lokalisierung der PLCδ₁-PH-Domäne an der Plasmamembran in einer Zwiebelepidermiszelle bereits ohne Salzstress zu sehen (Abb. 45B). Wahrscheinlich waren die Zellen bereits durch die Präparation für die Mikroskopie leicht gestresst, so dass eine leicht erhöhte Produktion von PtdIns(4,5)P₂ an der Plasmamembran stattfand. Ohne Salzstress lokalisierte Clathrin in den betrachteten Zellen zunächst im Cytosol (Abb. 45C). Nach zwei min Salzstress fand eine Umverteilung des Clathrins zur Plasmamembran statt, was eine Kolokalisierung mit der PLCδ₁-PH-Domäne an der Plasmamembran bewirkte (Abb 45/46H). Während der Umverteilung des Clathrins nach Salzstress war eine leichte strukturelle Veränderung der Plasmamembran zu beobachten.

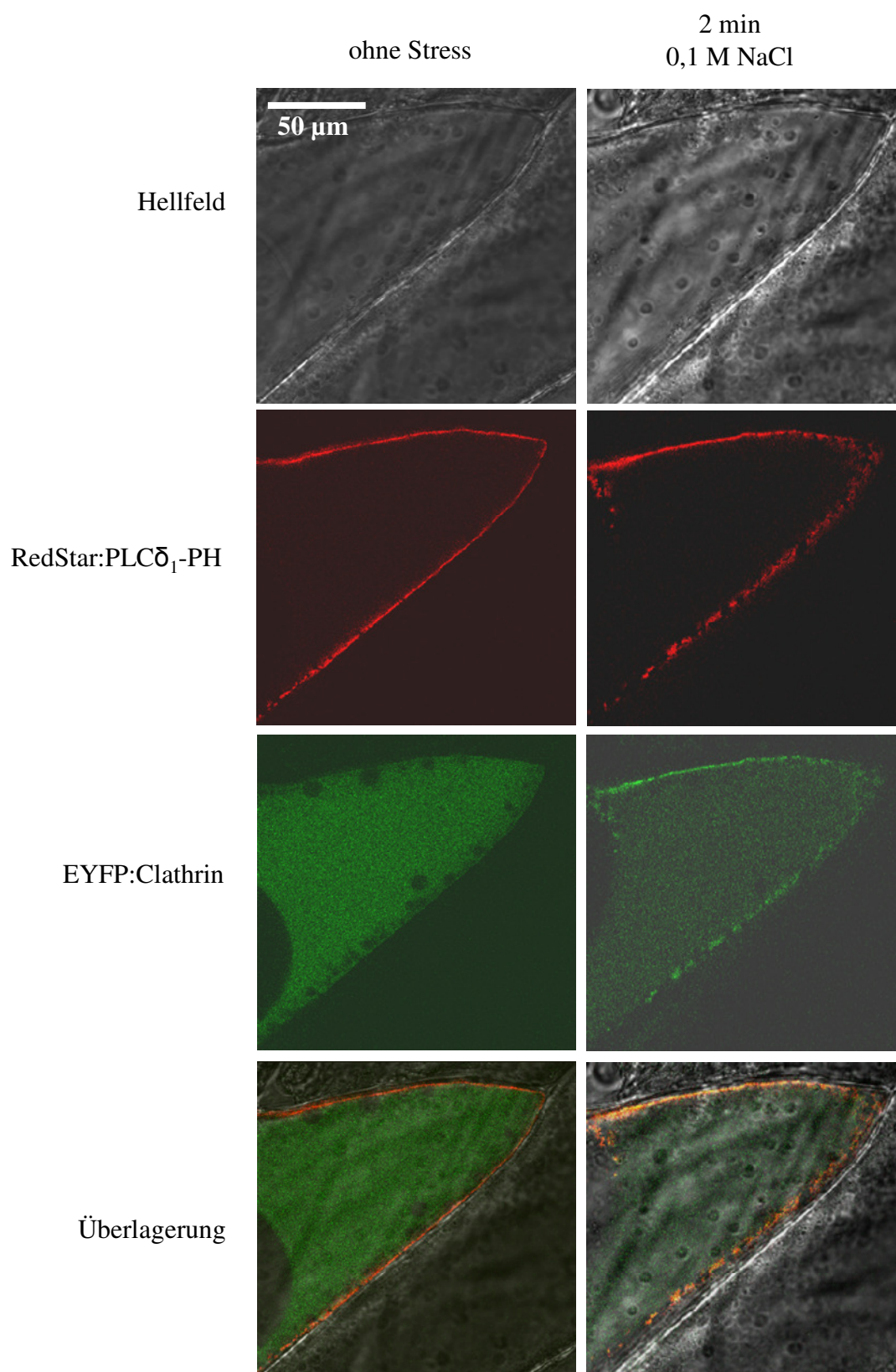


Abbildung 45: Abbildungsunterschrift s. nächste Seite

Abbildung 45: Stressinduzierte Kolokalisierung von Clathrin mit PtdIns(4,5)P₂ in Zwiebelepidermiszellen. Die Redstarmarkierten PLC δ_1 -PH-Domäne wurde mit YFP-markierten Clathrin in Zwiebelepidermiszellen transient koexprimiert. Der PLC δ_1 -PH Marker ist in rot und der Clathrin Marker in grün dargestellt. Die Koexpression und die Fluoreszenzverteilung beider Farbkanäle sind synchron vor und während hyperosmotischer Stimulation aufgenommen. In der ersten Zeile sieht man die Hellfeldbilder, in der linken Spalte die Fluoreszenzverteilung ohne Stress und rechts nach zwei min mit 0,1 M NaCl. Als Kontrolle sind die Hellfeldbilder der Zwiebelepidermis gezeigt. Die Überlagerung der drei Farbkanäle (unten) zeigt gelb die Kolokalisierung von Clathrin und dem spezifischen PtdIns(4,5)P₂-Reporter an. PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für die Vorgänge in Zwiebelepidermiszellen (n=10) die in zwei unabhängigen transienten Expressionsexperimenten beobachtet wurden.

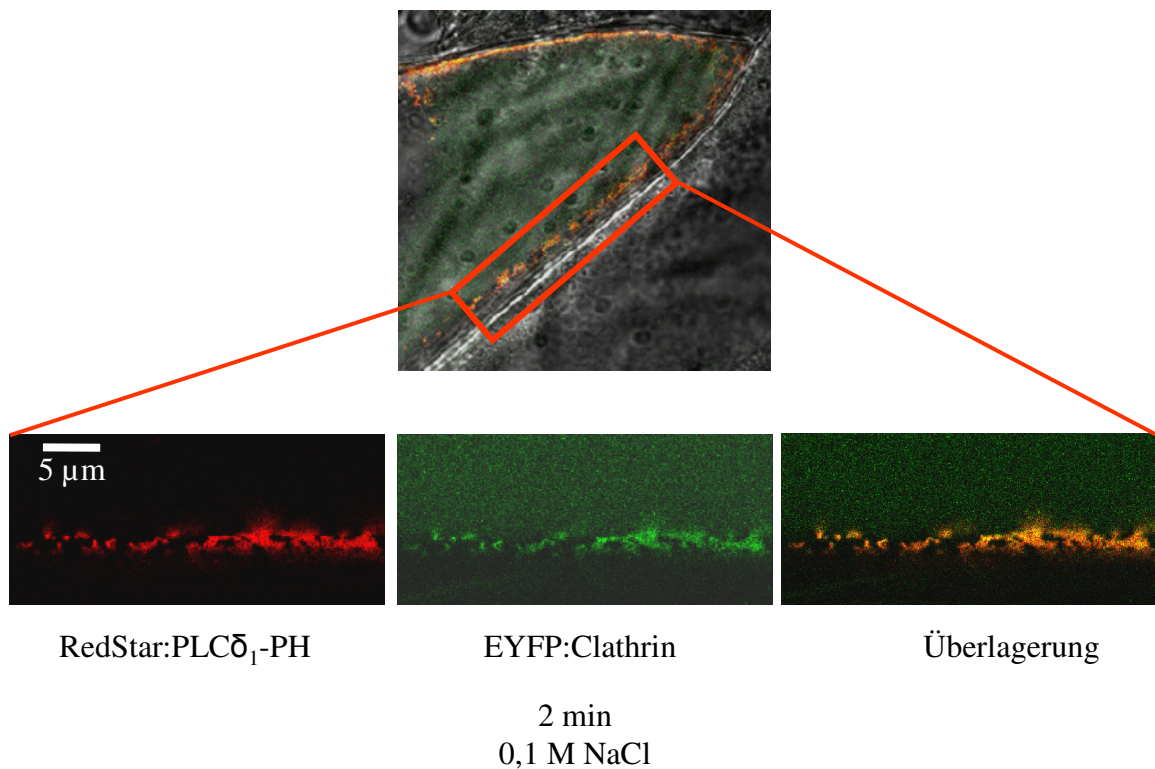


Abbildung 46: Verändertes Erscheinungsbild der Plasmamembran nach hyperosmotischem Stress. Bei den in Abb. 45 dargestellten Experimenten fiel eine aufgeraute Plasmamembranstruktur nach hyperosmotischen Stress auf, die hier vergrößert dargestellt ist. Die hier gezeigten Bilder sind Vergrößerungen aus Abb. 45.

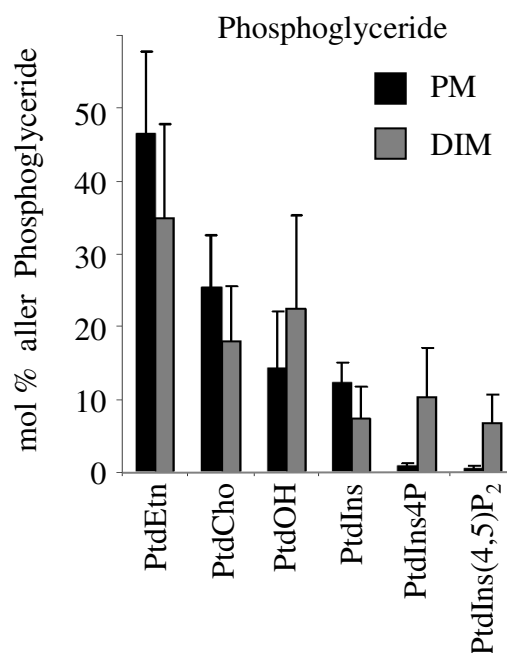
In Abb. 46 ist die stressinduzierte Veränderung der fluoreszenzmarkierten Plasmamembran dargestellt (vgl. Abb. 45B und F), bei der sich die zunächst „glatte“ Plasmamembran zu unregelmäßigen Strukturen aufraute. Eine Ausschnittvergrößerung der Plasmamembran (Abb. 46 H) nach 2 min 0,1 M NaCl zeigt die veränderte Struktur der Plasmamembran nach Salzstress. In Abb. 46 ist zusätzlich die Kolokalisierung von der PLC δ_1 -PH-Domäne mit Clathrin als gelbe Überlagerung zu erkennen.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen deuten eine stressinduzierte Kolokalisierung von PtdIns(4,5)P₂ und Clathrin an und stimmte insofern mit den biochemischen Daten überein (vgl. Abb. 39).

3.17 Lipid und Fettsäurezusammensetzung Detergenzien-unlöslicher Membranen (DIMs) von Tabak BY2-Zellen

(Zusammenarbeit mit Dr. S. Mongrand)

Komplementär zur Analyse stressinduzierter und subzellulärer Lipidpools sollten auch „Lipid-Rafts“ in die Betrachtung von PI-Pools mit einbezogen werden, und es wurde eine entsprechende Analyse mit BY2-Suspensionszellkulturen durchgeführt (Abb. 29). Die Präparation von „Lipid-Rafts“ wurde von unseren Kolaborationspartnern in Bordeaux (Dr. S. Mongrand und F. Furt) mit BY2-Zellkulturen durchgeführt. Die Lipide wurden dann von mir unter den etablierten Bedingungen (s. 2.20) analysiert.



(n=3, F. Furt, Bordeaux)

Abbildung 47: Phosphoglyceride aus Plasmamembran und DIMs aus Tabak BY2-Zellen. Präparierte PM und DIMs aus BY2-Zellen wurden auf Gehalte verschiedener Phosphoglyceride untersucht. Die Daten aller Phosphoglyceride sind in mol % dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten. DIM, „Detergent Insoluble Membranes“, „Lipid-Rafts“; PM, Plasmamembranen; PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdOH, Phosphatidsäure.

Die Phosphoglyceride aus angereicherten Plasmamembranen und DIMs („Detergent Insoluble Membranes“, „Lipid-Rafts“) wurden analysiert und miteinander verglichen. Die Phosphoglyceride PtdEtn, PtdCho und PtdIns waren in der Plasmamembran prozentual stärker vertreten als in DIMs. PtdOH hingegen war prozentual stärker in DIMs vertreten als in der Plasmamembran. Ein signifikanter Unterschied war bei den beiden PIs zu sehen, und sowohl PtdIns4P als auch PtdIns(4,5)P₂ waren prozentual stärker in den DIMs vertreten als in der Plasmamembran (Abb. 47).

Die Phosphoglyceride (PtdEtn, PtdCho, PtdOH, PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂), die innerhalb der Plasmamembranen und DIMs vorhanden waren, wurden auf ihre Fettsäurezusammensetzung untersucht.

In Abb. 48 ist dargestellt, dass sich PtdEtn, PtdCho und PtdOH sowohl in Plasmamembranen als auch in den DIMs ähnlich verhielten. Die Lipide aus der Plasmamembran der Tabakzellen hatten über 50 mol % 18:2 $\Delta^{9,12}$, während 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ die am wenigsten vertretene Fettsäure war. Die Fettsäuren 16:0, 18:0 und 18:1 Δ^9 waren nicht über 30 mol % der Gesamtfettsäuren vertreten. In den DIMs waren in PtdEtn und PtdCho 18:1 Δ^9 , 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ nicht über 20 mol % vorhanden. In PtdOH waren 18:1 Δ^9 und 18:2 $\Delta^{9,12}$ stark repräsentiert, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ hingegen kaum (< 10 mol %). Die Fettsäurezusammensetzung von PtdIns unterschied sich in der Plasmamembran kaum von der der Strukturlipide PtdEtn und PtdCho. Die am meisten vorkommende Fettsäure in PtdIns der Plasmamembran war 18:2 $\Delta^{9,12}$, und nur wenig 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ war vorhanden. Auch in den DIMs hatte PtdIns eine ähnliche Fettsäurezusammensetzung wie PtdEtn und PtdCho. Unterschiede erschienen in den PIs, sowohl in der Plasmamembran als auch in den „Lipid-Rafts“. PtdIns4P besaß in der angereicherten Plasmamembran hauptsächlich 16:0 und nur wenig 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. PtdIns4P aus DIMs besaß deutlich mehr 18:1 Δ^9 als alle anderen bisher hier betrachteten Lipide und lag deutlich gesättigter vor.

Eine sehr ähnliche Fettsäureverteilung war bei PtdIns(4,5)P₂ zu beobachten. In PtdIns(4,5)P₂ der Plasmamembran war kaum 18:2 $\Delta^{9,12}$ zu finden, welches in PtdEtn, PtdCho und PtdOH die prominenteste Fettsäure war. 18:1 Δ^9 war in Lipiden der DIMs im Vergleich zu denen der Plasmamembran deutlich stärker vertreten, in PtdIns(4,5)P₂ machte es etwa 30 mol % der assoziierten Fettsäuren aus. PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂

lagen in der Plasmamembran und den „Lipid-Rafts“ deutlich gesättigter vor als die Strukturlipide PtdEtn, PtdCho, PtdOH und PtdIns.

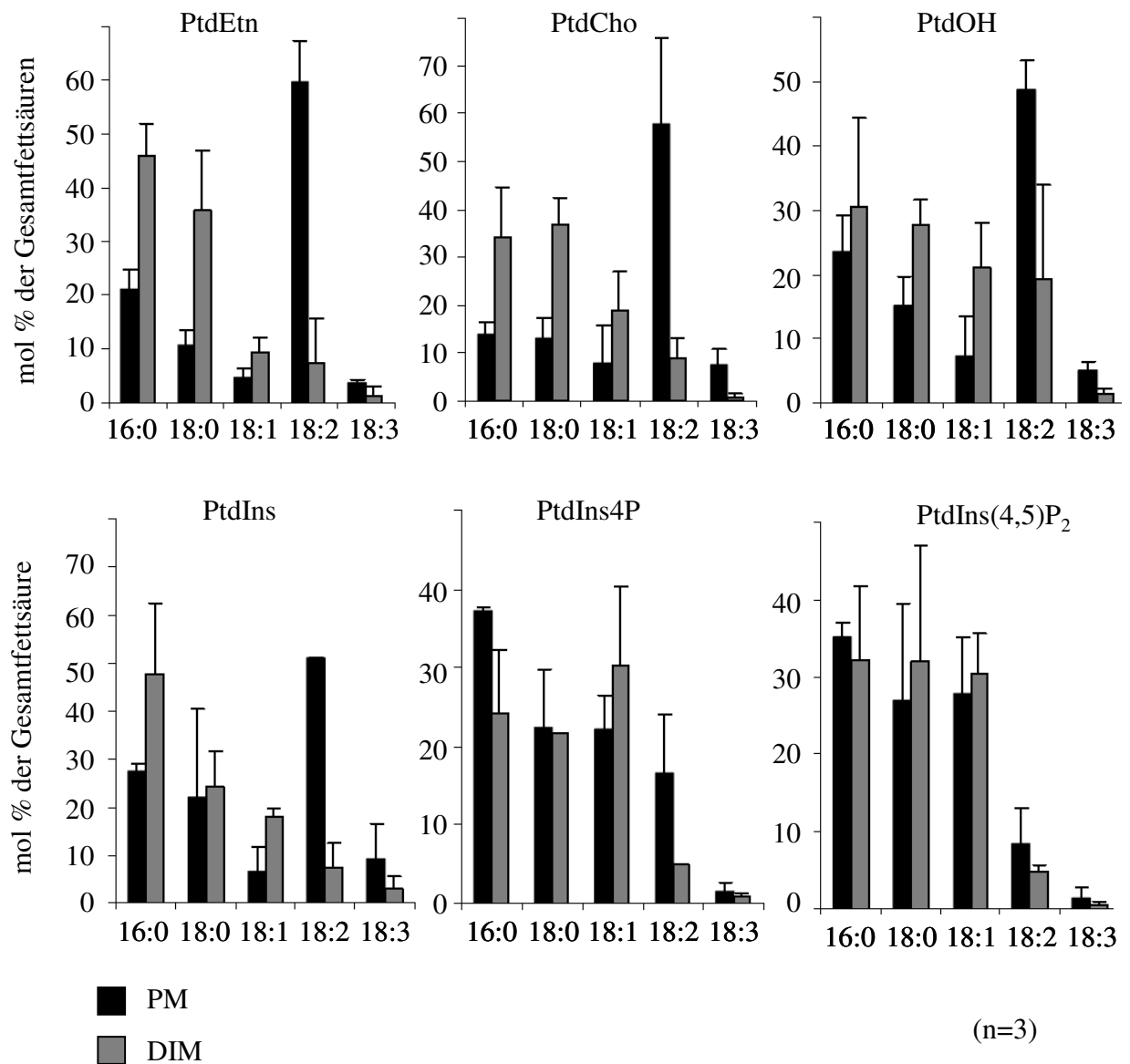
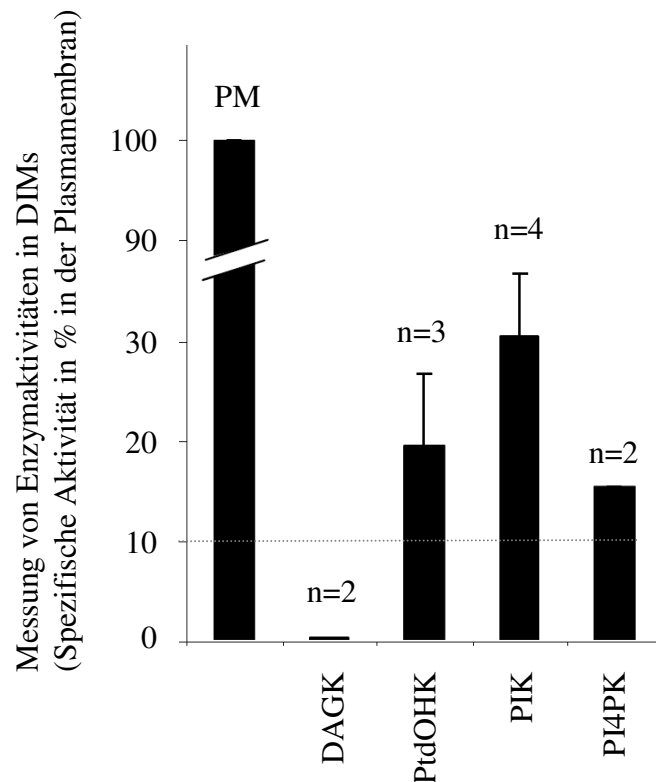


Abbildung 48: Fettsäurezusammensetzung von Phosphoglyceriden in angereicherten PM und DIMs von BY2-Zellkulturen. Die Fettsäurezusammensetzung ist in mol % für jedes Lipid dargestellt. Die Fettsäuren sind in der Abbildung (unten) angegeben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten. DIMs, „Detergent Insoluble Membranes“, „Lipid-Rafts“; PtdCho, Phosphatidylcholin; PtdEtn, Phosphatidylethanolamin; PM, Plasmamembran; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PtdOH, Phosphatidsäure.

Neben den Lipiden und ihrer Fettsäurezusammensetzungen wurden auch verschiedene Enzymaktivitäten in den DIMs gemessen (Abb. 49). Als Vergleich dienten die Mikrosomen, deren Enzymaktivität jeweils als 100 % definiert wurde. Da der Proteingehalt der DIMs nur etwa 10 % dessen der Plasmamembran ausmachte, war jede Aktivität die zu mehr als 10 % der Ausgangsaktivität vorlag, in den DIMs angereichert (S. Mongrand, persönliche Mitteilung). In den DIMs wurde nur 1 % Enzymaktivität der DAG-Kinase gefunden, die DAG zu PtdOH phosphoryliert. Höhere Enzymaktivitäten wurden für die PtdOH-Kinase gemessen (20 %), die PtdOH weiter zu Diacylglycerolpyrophosphat (DGPP) phosphoryliert. PI-Kinase und PI4P-Kinaseaktivitäten, die PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ produzieren, wurden ebenfalls in den DIMs nachgewiesen. Von den hier gemessenen Enzymen hatte die PI-Kinase mit 30 % in den DIMs die höchste Enzymaktivität.



(Daten von F. Furt, n=2-4)

Abbildung 49: Aktivitäten lipidmodifizierender Enzyme in DIMs von BY2-Zellkulturen. Die Aktivitäten der Enzyme wurden zunächst in der PM ermittelt. Anschließend wurden DIMs präpariert und die entsprechenden Enzymaktivitäten der DIMs bestimmt und die prozentualen Werte der Gesamtplasmamembran dargestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei bis vier Experimenten. Die gestrichelte Linie zeigt die erwartete Aktivität aus PM und DIMs bei gleichem Proteingehalt. DAGK, Diacylglycerol-Kinase, DIMs, „Detergent Insoluble Membranes“; PM, Plasmamembran; PtdOHK, Phosphatidsäure-Kinase, PIK, Phosphatidylinositol-Kinase, PI4PK, Phosphatidylinositol-4-phosphat-Kinase.

3.18 Lipidbindungseigenschaften der N-terminalen MORN-Domänen aus *Arabidopsis*-PIP-Kinasen

MORN-Domänen wurden bereits als lipidbindende Domänen beschrieben (Im et al., 2007). Um die Lokalisierung von Lipiden zu untersuchen, könnten diese MORN-Domänen eingesetzt werden. Durch die Lipidbindungsstreifen sollten die Bindungsspezifitäten für spezifische Lipide der unterschiedlichen PIP-Kinasen-Isoformen untersucht werden.

Lipidbindende Domänen wurden auf ihre Bindungsspezifität gegenüber den immobilisierten Lipiden auf den Lipidbindungsstreifen (Firma Echelon, Salt Lake City, UT, USA) untersucht. Die Lipidbindungsstreifen haben auf der linken Seite folgende Lipide immobilisiert (von oben nach unten) Lyso-PtdOH, Lyso-PtdCho, PtdIns, PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P, PtdEtn und PtdCho, auf der rechten Seite befinden sich die folgenden Lipide Sphingosin-1-Phosphat, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃, PtdOH, PtdSer und eine Leerkontrolle ohne Lipid (Abb. 50A). Eine Kontrolle war der Überexpressionsvektor petM-41 der kein Insert enthielt, ohne Lipidbindungsdomäne sollte hier kein Signal auftreten. Da der Überexpressionsvektor petM-41 allerdings ein ziemlich großes Maltosebindungsprotein (MBP) als Detektionshilfe besitzt, sollte Interaktionen mit dem MBP-Protein ausgeschlossen werden.

Die Bindungseigenschaften in *E. coli* überexprimierter MORN-Domänen aus *Arabidopsis* PIP 5-Kinasen wurden mit Hilfe der Lipidbindungsstreifen untersucht (Abb. 50C). Die MORN-Domäne der PIPK1 aus *Arabidopsis* zeigte deutliche Signale mit PtdIns3P, PtdIns4P und PtdIns5P und schwache Signale mit den Bis-Phosphaten PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂. Keine Signale waren sichtbar mit den restlichen Lipiden und der Leerkontrolle. Die MORN-Domänen aus der PIPK2 und PIPK3 zeigten ein ähnliches Lipidbindungsmuster, und beide Domänen banden hauptsächlich die drei Monophosphate, wobei hier die Signale für PtdIns3P und PtdIns5P stärker waren als das Signal für PtdIns4P. Alle übrigen Lipide zeigten keine Signale. Die MORN-Domänen aus PIPK4 und PIPK5 zeigten ebenfalls die stärksten Präferenzen für die beiden Monophosphate PtdIns3P und PtdIns5P, ein geringeres Signal sah man bei PtdIns4P. Sowohl die MORN-Domäne 4 als auch die MORN-Domäne 5 wiesen Signale bei den Lipiden der Tris-Phosphate auf, deutlich schwächer als bei den Monophosphaten. Beide zeigten auch sehr schwache Signale bei den Lipiden PtdIns(3,4,5)P₃, PtdOH und PtdSer. Die MORN-Domänen aus PIPK6, PIPK7,

PIP8 und PIP9 banden ebenfalls mit erhöhter Präferenz die Mono-Phosphate, banden aber auch die Bis-Phosphate und das Trisphosphat, ebenso PtdSer. PtdSer wurde von den MORN-Domänen der PIP5, PIP6, PIP7, PIP8 und PIP9 gebunden.

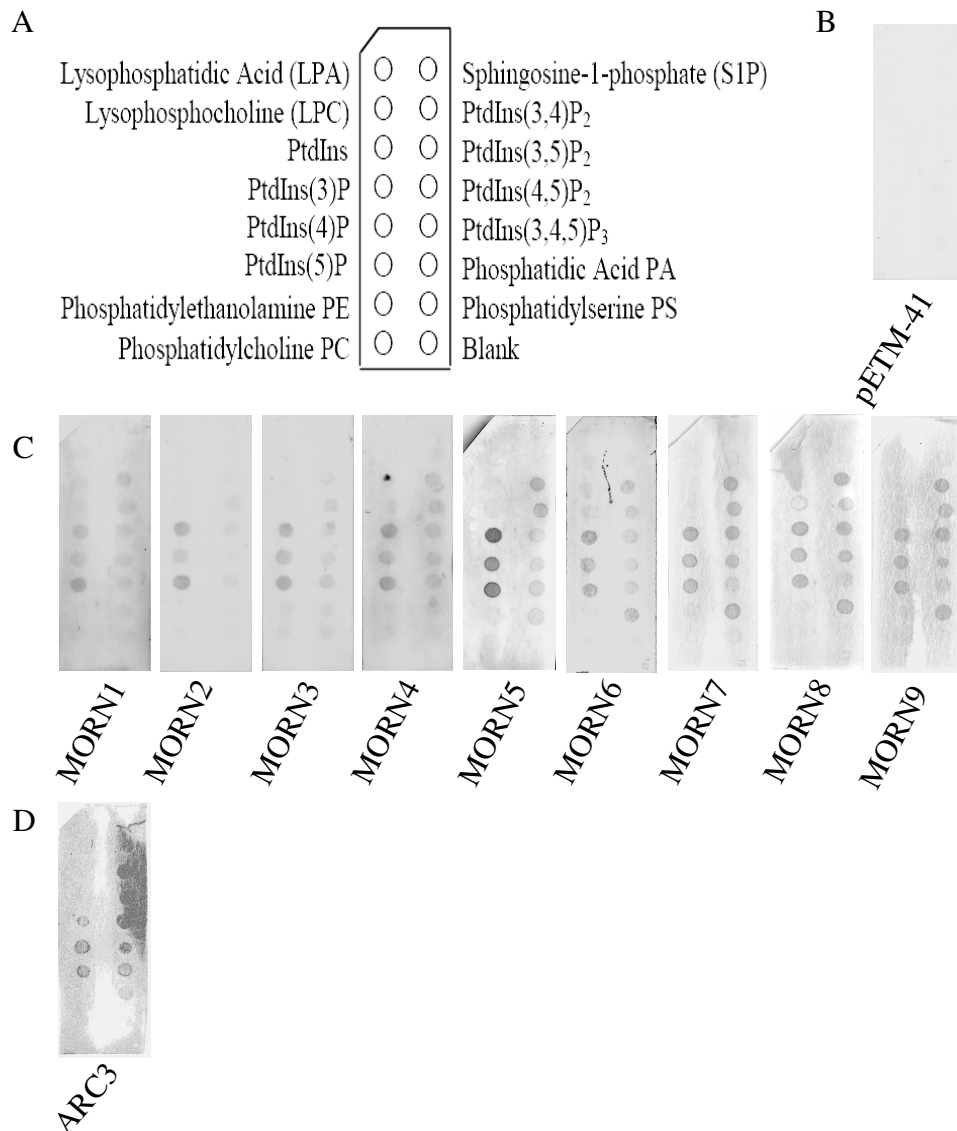


Abbildung 50: Die N-terminalen Domänen der *Arabidopsis*-PIP-Kinasen haben spezifische Lipidbindungseigenschaften. Die Lipidbindungseigenschaften von rekombinanten Fusionsproteinen, mit Maltosebindungsprotein (MBP), wurden durch den Einsatz von vorimmobilisierten Lipidbindungsstreifen (A) charakterisiert. Die spezifischen Lipidbindungen wurden durch Immundetektion mit Hilfe des MBP-Anhangs durch eine alkalische Phosphatasereaktion sichtbar gemacht. Die Ergebnisse stammen von einer Leerkontrolle (B), die keinerlei Bindung mit den vorimmobilisierten Lipiden zeigte und einem repräsentativen Experiment (C) der neun verschiedenen MORN-Konstrukte der *At*PIP5K und des ARC3s (D).

3.19 Vergleich der N-terminalen MORN-Domäne pflanzlicher PIP-Kinasen mit der MORN-Domäne von ARC3

In *Arabidopsis* wurde nur ein weiteres Protein, ARC3, beschrieben, das MORN-Motive aufweist (Shimada et al., 2004). ARC3 ist an den Hüllmembranen von Chloroplasten lokalisiert und ist an der Bildung von Proteinen der äußeren chloroplastidären Membranen beteiligt, die wichtig für die Organellenteilung sind (Shimada et al., 2004). Das Protein wurde wie die MORN-Domänen aus *Arabidopsis* in *E. coli* überexprimiert und mit Hilfe der Lipidbindungsstreifen der Firma Echelon auf seine Lipidbindungseigenschaften untersucht (Abb. 50D). Das ARC3 Protein wies ähnliche Bindungseigenschaften wie die MORN3-Domäne der PIP-Kinase auf. Es band die Monophosphate und die Bis- und Trisphosphate und zeigte außerdem Bindung von PtdOH. Bei PtdSer, PtdEtn und PtdCho waren hingegen keine Signale zu beobachten.

4. Diskussion

Obwohl zahlreiche regulatorische Funktionen für PIs im eukaryotischen Stoffwechsel beschrieben sind, ist die Koordination alternativer Richtungen der Einflussnahme durch PIs nicht klar. Wie schon eingangs erwähnt, weisen Substratpräferenzen von Enzymen des PI-Stoffwechsels daraufhin, dass unterschiedliche molekulare Spezies von PIs verschiedene physiologische Funktionen haben könnten. Um diese Hypothese zu testen, sollten PIs direkt biochemisch untersucht werden.

4.1 Charakterisierung pflanzlicher PIs durch direkte Analyse der Lipide

PIs sind wichtige Regulatoren in der Zelle, liegen aber nur in geringen Mengen vor (Augert et al., 1989; Carricaburu und Fournier, 2001; Schmid et al., 2004; Cho et al., 2006). Die Charakterisierung von PIs hat sich bisher fast ausschließlich auf die Analyse und funktionale Charakterisierung der Inositolphosphatkopfgruppe beschränkt, so dass die Lipide nur indirekt, qualitativ oder nach starker Modifikation nachgewiesen werden konnten. Obwohl die Analyse intakter PIs prinzipiell möglich ist, erfordert sie aufwendige Instrumentalisierung und wurde bislang nicht für Pflanzenproben demonstriert. Der salzinduzierte Anstieg von PtdIns(4,5)P₂ war bereits beschrieben, dieser Anstieg konnte über zwei Methoden nachgewiesen werden. Zum einen über den spezifischen Kopfgruppennachweis (Abb. 23) und zum anderen mit der Isolierung und Anreicherung über DC und anschließender Transmethylierung für die GC-Analyse (Abb. 25). Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, inwiefern klassische Methoden der Lipidanalytik, wie DC und GC, sich zur Analyse von PIs eignen. Es wurde eine Abfolge analytischer Schritte etabliert, bei der PI-Kopfgruppenspezies zunächst durch DC getrennt und die isolierten Lipide dann über GC quantifiziert und auf ihre Fettsäurezusammensetzung getestet wurden. Die Güte der Quantifizierung über die vorgestellte Methode kann anhand eines Vergleiches mit unabhängig ermittelten Werten beurteilt werden. Die PtdIns(4,5)P₂-Gehalte in *Arabidopsis*-Blättern wurden über einen kommerziellen Kopfgruppen-Rezeptor-Nachweis (Chilvers et al, 1991) für die Menge der Kopfgruppen und nach der GC-Analyse der assoziierten Fettsäuren zu 28±6 und 27±6 pmol Lipid g⁻¹ Frischgewicht bestimmt. Die mit den beiden Methoden ermittelten Werte zeigten also keinen Unterschied und stimmen beide mit früher ermittelten Werten für nicht stimulierte *Arabidopsis*-Rosettenblätter überein (König et al., 2007; Mosblech et al., 2008). Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von

PtdIns und verschiedener PIs ergab eine überraschende Inkongruenz, da PtdIns einen wesentlich höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthielt, während PIs stärker gesättigt waren (Abb. 16). Um diese Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung erklären zu können, können parallele Biosynthesewege angenommen werden.

4.2 PIs werden in verschiedenen Pools gebildet

Da PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ durch die Kopfgruppenphosphorylierung an PtdIns durch spezifische Kinasen entstehen, ändert sich die Fettsäurezusammensetzung bei diesem Syntheseschritt nicht. Wegen seiner unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung kann PtdIns, welches in *Arabidopsis*-Rosettenblättern gefunden wurde, nicht der Vorläufer für PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ sein.

Eine mögliche Erklärung ist die Existenz zweier unabhängiger PI-Pools (Abb. 51). Auf der rechten Seite der Abbildung 51 ist ein hypothetischer gesättigter PtdIns-Pool dargestellt, aus dem gesättigtes PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ entstehen. Parallel ist auf der linken Seite ein ungesättigter PtdIns-Pool abgebildet, aus dem ungesättigtes PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ entstehen.

Da in unstimulierten *Arabidopsis*-Blättern nur gesättigtes PtdIns zum Umsatz in PIs kam, während ungesättigtes PtdIns akkumulierte, wurde getestet, ob durch Stimulation auch der ungesättigte PtdIns-Pool zu PIs phosphoryliert würde. Die in Abschnitt 3.7 gezeigten Experimente (Abb. 25) weisen daraufhin, dass stressinduzierte Anstiege in PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ im Gegensatz zu konstitutiven Populationen dieser Lipide stärker ungesättigt sind, was auf stressinduzierten Umsatz von ungesättigtem PtdIns beruhen kann. Gesättigte und ungesättigte PIs lassen sich also funktional in einen konstitutiven und einen stressinduzierten Pool einordnen.

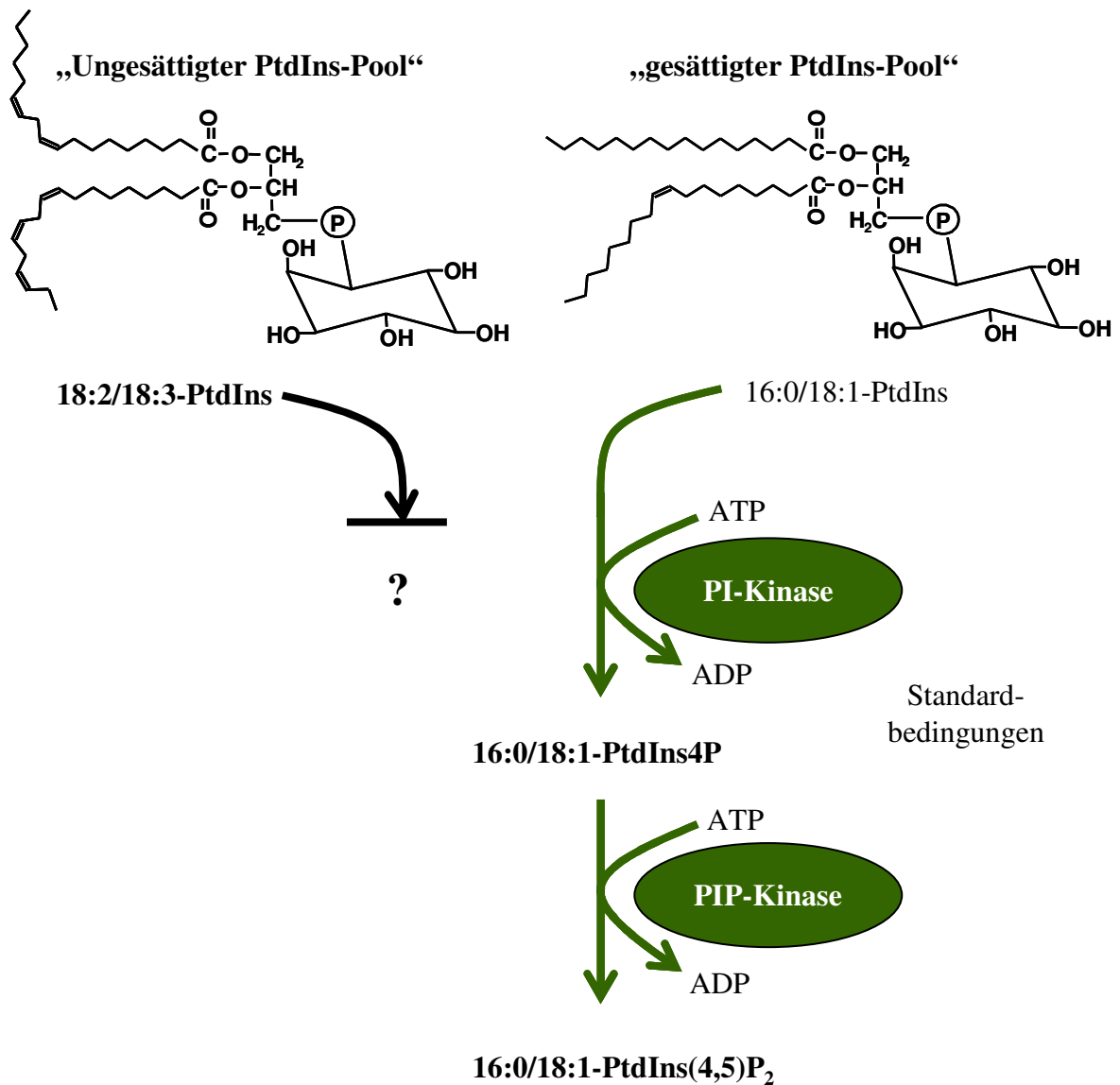


Abbildung 51: Modell über die Existenz von zwei unabhängigen PtdIns-Pools. Eine mögliche Erklärung für die erhobenen Daten ist die Annahme eines gesättigten und ungesättigten PtdIns-Pools. Unter Standardbedingungen wird nur der gesättigte Pool zu PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ umgesetzt. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

4.3 Stressinduzierte PIs haben eine charakteristische Fettsäurezusammensetzung

PI-Kinasen und PIP-Kinasen sind für die Synthese der PIs verantwortlich und können während des Wachstums oder auch durch Stress induziert werden.

Nach hyperosmotischem Stress stiegen die Gehalte der beiden Lipide PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ an, und dabei veränderten die Lipide ihre Fettsäurezusammensetzung. Nach 30 min hyperosmotischem Stress lagen beide Lipide stärker ungesättigt vor. Es fand also eine unabhängige Umsetzung von gesättigtem PtdIns unter normalen Bedingungen und ungesättigtem PtdIns nach Salzstress statt (Abb. 52). Verschiedene vorhergehende Berichte von ansteigender Phosphorylierung an PtdIns und PtdIns4P nach hyperosmotischem Stress (Pical et al., 1999; DeWald et al., 2001) weisen auf einen Anstieg von PIs durch stressinduzierte Aktivierung von PI- und PIP-Kinasen hin, die PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ synthetisieren.

Ein beobachteter transienter Rückgang in PtdIns durch Stress (Abb. 25) steht im Gegensatz zu vorhergehenden Studien, in denen kein solcher Rückgang in PtdIns beobachtet wurde (Welti et al., 2002). Gründe dafür könnten die transienten Eigenschaften von Änderungen und Unterschiede in der Stressbehandlung oder im experimentellen Aufbau sein.

Nach 60 min hyperosmotischem Stress stiegen die PtdIns-Gehalte wieder an, was auf erhöhte Neusynthese von PtdIns oder die Dephosphorylierung durch PI-Phosphatasen hinweist. Zu den Zeitpunkten, an denen PtdIns anstieg, aber PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ ebenfalls weiter anstiegen (Abb. 25), scheint eine Dephosphorylierung von PIs unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit ist die Inaktivierung der stressinduzierten PLC durch eine Feedbackregulation ausgehend von InsP₃ und eine Ansammlung der Vorläuferlipide PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂.

Die Fettsäurezusammensetzung der PI-Substrate ist ein Regulator für Enzyme, die die zelluläre PI-Produktion und/oder Verteilung regulieren (Carricaburu und Fournier, 2001). Substratpräferenzen für rekombinante PIP-Kinasen gegenüber PI-Substraten mit definierten Fettsäurezusammensetzungen wurden bereits *in vitro* für Insektenzellen (Carricaburu und Fournier, 2001) und menschlichen PI-Phosphatasen gefunden (Schmid et al., 2004) und können auch für *Arabidopsis*-Enzyme postuliert werden.

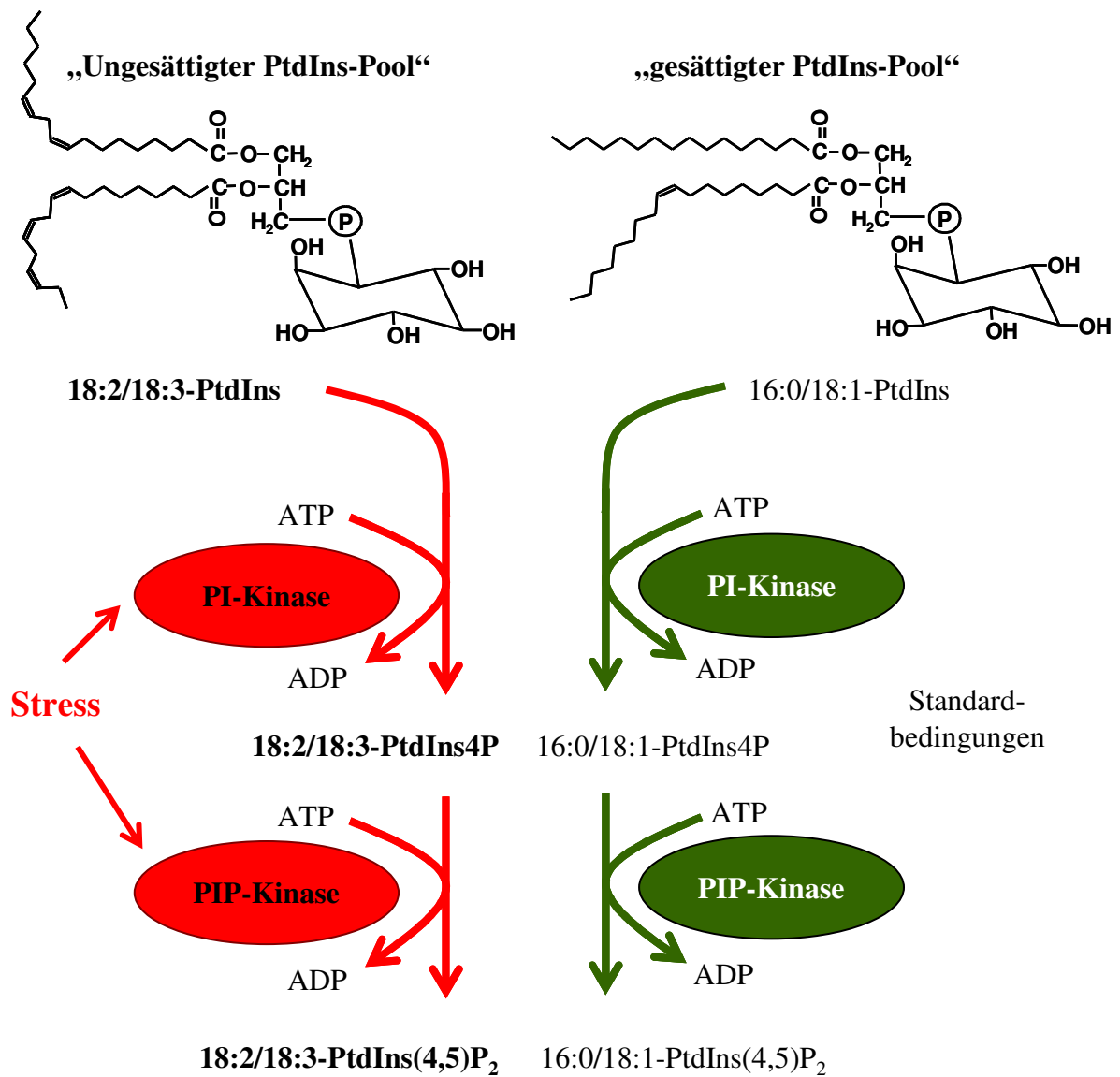


Abbildung 52: Modell zur stressinduzierten Umsetzung von ungesättigtem PtdIns. Die Daten weisen daraufhin, dass nach Stressapplikation vermehrt ungesättigtes PtdIns zu PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ umgesetzt wird. PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Wegen der Vielzahl von Isoenzymen (elf), die in *Arabidopsis* PtdIns(4,5)P₂ herstellen können (Mueller-Roeber und Pical, 2002), ist es bisher nicht möglich, auf ein bestimmtes Enzym zu verweisen, das für den stressinduzierten PtdIns(4,5)P₂-Anstieg verantwortlich ist. Einen interessanten Einblick gibt die Beobachtung, dass auch in Hefe, einem Organismus, der nur eine einzige PIP-Kinase (Mss4) besitzt (Desrivieres et al., 1998), ein stressinduzierter Anstieg in PtdIns(4,5)P₂ zu verzeichnen war, dessen Fettsäurezusammensetzung sich von der konstitutiver PIs unterschied (Abb. 31). Es ist also möglich, dass eine einzelne PIP-Kinase sowohl konstitutive als auch stressinduzierte Funktionen von PtdIns(4,5)P₂ bedient. Es ist denkbar, dass die mehrere hundert

Aminosäuren lange N-terminale Domäne der Hefe-PIP-Kinase Mss4 an der Regulation verschiedener physiologischer Funktionen beteiligt ist. Die Analyse der Lipidbindungseigenschaften N-terminaler regulatorischer Domänen verschiedener Typ B PIP-Kinasen aus *Arabidopsis* und des ARC3-Proteins (Abb. 50) ergab keine auffälligen Unterschiede, die auf einen Beitrag zur unterschiedlichen subzellulären Verteilung leisten, oder auf physiologische Funktionen hinweisen. Vor einer abschliessenden Beurteilung dieser Ergebnisse sind aber noch weitere Experimente nötig.

Eine alternative Erklärung für die veränderte Fettsäurezusammensetzung stressinduzierter PIs ist verstärkte Desaturierung durch Fettsäuredesaturasen. Um diese Hypothese zu testen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach hyperosmotischem Stress Totallipidextrakte hergestellt und auf erhöhten Desaturierungsgrad analysiert (Abb. 28). Die Fettsäurezusammensetzung der Totallipidextrakte änderte sich dabei kaum, was daraufhin deutet, dass Desaturasen nicht für den Anstieg der Un sättigung nach osmotischer Stimulation verantwortlich sind. Da der Anteil an PIs an der Gesamtlipidfraktion nur gering ist (Stevenson et al., 2000), kann eine PI-spezifische Desaturierung nicht ausgeschlossen werden. Bislang konnten keine PI-spezifischen Desaturasen identifiziert werden.

Die Hypothese der gesättigten/ungesättigten PI-Pools wirft die Frage auf, wie solche Pools voneinander getrennt sein können, um eine unabhängige Bildung von gesättigtem oder ungesättigtem PIs zu erlauben.

Da PtdIns im ER synthetisiert wird (Collin et al., 1999; Justin et al., 2002) besteht die Möglichkeit, dass PtdIns mit einer bestimmten Fettsäurezusammensetzung im ER verbleibt, während andere PI-Spezies zu unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten wie der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat, Zellkernen usw., transportiert werden.

Um zu testen, ob gesättigte und ungesättigte PtdIns-Spezies entlang von Organellengrenzen voneinander getrennt sind, wurden subzelluläre Kompartimente angereichert und auf Unterschiede in ihren Lipidmustern hin untersucht. Die Anreicherung der Organellenfraktionen wurde anhand von Lipidmustern und Immundetektion von Markerproteinen beurteilt. Für die untersuchten Präparationen zeigte sich eine substantielle Anreicherung der verschiedenen Fraktionen, es musste

jedoch davon ausgegangen werden, dass keine vollständige Trennung der einzelnen Organellen möglich ist. Immundetektion der vakuolären V-ATPase zeigte in einigen angereicherten Fraktionen positive Signale, die auf Verunreinigungen mit tonoplastidären Membranen hinweisen können oder anzeigen, dass die V-ATPase auch in anderen Endomembranen zu finden ist (Abb. 20).

Die Ergebnisse der Lipidanalyse der verschiedenen angereicherten Fraktionen (Abb. 17) weisen ebenfalls auf eine erfolgreiche Anreicherung der Organellenfraktionen hin (Abb. 17). Trotz der unterschiedlich angereicherten Organellen ergab die jeweilige Analyse der Fettsäurezusammensetzung, dass keine Aufteilung von gesättigten und ungesättigten PtdIns entlang der Organellengrenzen vorlag. Vielmehr zeigte sich in allen untersuchten Fraktionen mit Ausnahme der Zellkerne das Muster, das schon in den Gesamtextrakten vorgefunden worden war, und bei dem PtdIns stärker ungesättigt vorlag als bei PIs (Abb. 21). Diese Beobachtung bestätigte sich auch für PtdIns und PIs, die in isolierten „Lipid-Rafts“ detektiert werden konnten (Abb. 48).

Die Lipide der Zellkerne unterschieden sich in ihrer Fettsäurezusammensetzung von denen anderer Organellen. Diese Beobachtung schließt auch die untersuchten Strukturlipide PtdCho und PtdEtn ein (Abb. 21). Die Bedeutung der besonderen Fettsäurezusammensetzung von Phospholipiden in Zellkernen ist unklar und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Insgesamt ergaben die Analysen der Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs verschiedener Organellenpräparationen, dass jedes untersuchte Organell einen ungesättigten PtdIns-Pool beinhalten kann, der stressinduziert zu PIs umgesetzt werden könnte. Da aufgrund der Organellendaten eine räumliche Trennung der PtdIns-Pool ausgeschlossen werden konnte, blieb die Frage nach der Regulation unabhängiger PtdIns-Pools offen.

Ebenso ungeklärt war an dieser Stelle die Frage nach der physiologischen Funktion des stressinduzierten transienten Anstiegs in ungesättigten PIs. Um die physiologische Funktion des stressinduzierten Anstieges in PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ zu klären, wurden zunächst Experimente durchgeführt, um zu testen, ob das transient gebildete PtdIns(4,5)P₂ als intaktes Lipid eine Rolle als Interaktionspartner für Proteine spielt, oder ob es für die Produktion der *second messenger* InsP₃ und DAG hydrolysiert wird. Die Analysen der *InsP 5Ptase*-Pflanzen weisen auf stressinduzierte Hydrolyse v.a.

ungesättiger PIs hin, da Änderungen der PtdIns(4,5)P₂-Gehalte mit einem Anstieg in InsP₃ einhergehen (Abb. 33). Die Downstreamprodukte der PLC, DAG und PtdOH stiegen zur gleichen Zeit wie InsP₃ an, und waren ebenso ungesättigt wie PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress. DAG- und PtdOH-Gehalte waren in *InsP 5Ptase*-Pflanzen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollpflanzen erhöht, was mit dem beschriebenen erhöhten Durchsatz von PIs durch die PLC übereinstimmt (Perera et al., 2006). PtdOH kann allerdings auch aus anderen Phosphoglyceriden gebildet werden, u.a. durch die Phospholipase D (PLD) (Wang, 2002). Die beobachteten Muster weisen allerdings auf PLC-Aktivität hin, da DAG/PtdOH parallel mit InsP₃ gebildet wurden (Abb. 33).

Trotz der Hydrolyse zu InsP₃ und DAG verblieb aber auch eine substantielle Menge von PtdIns(4,5)P₂ in Form des intakten Lipides, das Funktionen bei der Anpassung an hyperosmotischen Stress wahrnehmen kann. Über die subzelluläre Lokalisierung von stressinduziertem PtdIns(4,5)P₂ in der Zelle können solche möglichen Funktionen eingegrenzt werden, und die folgenden Abschnitte befassen sich mit den Ergebnissen dieser Experimente.

Die Lokalisierung wurde durch subzelluläre Fraktionierung biochemisch und mikroskopisch untersucht. Im Laufe der Experimente zur subzellulären Verteilung von stressinduziertem PtdIns(4,5)P₂ wurden eine Reihe relevanter Beobachtungen publiziert, die die Lokalisierung der PtdIns(4,5)P₂ bildenden Enzyme betreffen. PtdIns(4,5)P₂ wird durch PIP-Kinasen gebildet, eine der PIP 5-Kinasen wird durch PtdIns(4,5)P₂ aktiviert (Im et al., 2007). Ein Anstieg von PtdIns(4,5)P₂ und PtdOH nach hyperosmotischem Stress könnte also eine PIP-Kinase in der Plasmamembran aktivieren, was die Biosynthese von PtdIns(4,5)P₂ verstärkt.

Interessanterweise wurden nach hyperosmotischem Stress auch die subzelluläre Lokalisierung der PIP-Kinase in Tabakzellkulturen gezeigt (Im et al., 2007). Die PIP-Kinaseaktivität stieg nach hyperosmotischem Stress in den Endomembranen an. Es fand also nach hyperosmotischem Stress eine Umverteilung des PtdIns(4,5)P₂ produzierenden Enzyms von der Plasmamembran in die Endomembranen statt (Im et al., 2007).

In analogen Experimenten nach hyperosmotischem Stress fand in menschlichen HeLa-Zellen eine Umverteilung der menschlichen Typ I PIP Kinase β von der löslichen Fraktion zur Plasmamembran statt. Ein Anstieg in der korrespondierenden PIP-Kinaseaktivität in der Plasmamembran konnte ebenfalls gezeigt werden (Yamamoto et al., 2006).

Aufgrund der publizierten Daten über die Umverteilung der *Arabidopsis* PIP 5-Kinase und ihrer Aktivität von der Plasmamembran in die Endomembranen nach hyperosmotischem Stress wurden zunächst Plasmamembranen und Endomembranen auf Lipidebene untersucht, die bei der Anreicherung mit Hilfe des Zweiphasen-Systems (Abb. 11) anfallen. Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg in PtdIns(4,5)P₂ nach 15 min in der Plasmamembran und zu späteren Zeitpunkten in den Endomembranen (Abb. 35). Die Analyse von PtdIns und PIs über einen direkten biochemischen Nachweis ergab also ein ähnliches Verteilungsmuster, wie vorher für die biosynthetisierenden Enzyme gezeigt worden war (Im et al., 2007).

Das Auftreten stressinduzierter PIs in Endomembranen lässt viele mögliche subzelluläre Zielorte der PI-Wirkung offen.

Endomembranen beinhalten alle zellulären Membranen außer der Plasmamembran. Die Hauptmembransysteme sind mengenmäßig das ER mit dem Golgi-Apparat, die Zellkerne und die Plastiden (Horton et al., 2006). Da PtdIns im ER gebildet wird (Collin et al., 1999; Justin et al., 2002), liegt es nahe, dass dort die beiden unabhängigen PtdIns-Pools gebildet und aufrechterhalten werden, und dass eine Verteilung der unterschiedlichen PtdIns(4,5)P₂ von dort aus stattfindet.

Die membranöse Zellstruktur des ERs setzt sich kontinuierlich mit der Hülle des Zellkernes fort (Horton et al., 2006). Laterale Diffusion von PtdIns aus den ER-Membranen, wo PtdIns synthetisiert wird, in die Zellkernhülle ist wahrscheinlich, konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden. Die Rolle von PIs im Zellkern ist noch nicht vollständig geklärt. In 15 Tage alten Kaninchen wurde die PtdIns-Synthese aus DAG und myo-Inositol im Zellkern gefunden, und nicht wie in anderen Organismen im ER. Andererseits kann PtdIns durch PtdIns-Transferproteine in den Zellkern transportiert werden (D'Santos et al., 2000; Martelli et al., 2002). In isolierten nukleären Hüllmembranen aus Rattenlebern konnte über Immundetektion die Anwesenheit von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ gezeigt werden (Neri et al., 1999). Der Nachweis von PI-

und PIP-Kinase-Lokalisierung am oder im Zellkern konnte durch radioaktive Markierung mit [γ - ^{32}P] ATP in Rattenleber *in vitro* gezeigt werden. Für verschiedene Zelltypen konnte die Lokalisierung der PI 3-Kinase und die Synthese von PtdIns(3,4,5)P₃ im Zellkern nachgewiesen werden (Neri et al., 1999; Martelli et al., 2002). Die Rolle von PIs im Zellkern ist in tierischen Zellen gut untersucht und verbindet PtdIns(4,5)P₂ hauptsächlich mit der Bildung von Heterochromatin in der Zellkernmatrix (Yu et al., 1998). Die Hemmung der RNA-Transkription durch Histone kann durch Zugabe von PtdIns(4,5)P₂ aufgehoben werden (Manzoli et al., 1999; Martelli et al., 1999). Für PtdIns3P wurde eine Rolle in der Etablierung von Initiationsstellen für die Transkription im Zellkern postuliert (Bunney et al., 2000). Bislang gibt es jedoch keine Hinweise auf stressinduzierte Bildung von PIs im ER oder dem Zellkern. Für Plastiden als prokaryotische Organellen ist keine nennenswerte Beteiligung an PI-vermittelten Stressreaktionen zu erwarten (Bovet et al., 2001). Plastiden wurden dennoch analysiert, da sie einen großen Anteil an den Endomembranen ausmachen. Die plastidenassoziierten PIs waren nur in geringer Menge vertreten, die auch auf Kontaminationen mit anderen Membranen zurückzuführen sein können.

Hyperosmotischer Stress führt bei der halophilen Mikroalge *Dunaliella salina* zu einem schnellen Zusammenbruch von PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ durch die Aktivierung einer spezifischen PLC (Einspahr et al., 1988; Einspahr et al., 1988). Der hyperosmotische Schock führt gleichzeitig zu einem Verlust von 50 % des Zellvolumens und 30 % des in der Plasmamembran lokalisierten PtdIns(4,5)P₂ (Einspahr et al., 1988).

Die Analyse der PtdIns und PI-Gehalte von ER, Zellkernen oder Plastiden nach hyperosmotischem Stress ergab keine Hinweise darauf, dass zu irgendeinem Zeitpunkt nach Stressapplikation die Lipidgehalte in diesen Organellen erhöht sind (Abb. 37). Stressinduziertes PtdIns(4,5)P₂ wird also zwar von der Plasmamembran in Endomembranen bewegt, findet sich jedoch nicht in den Hauptendomembransystemen wieder. Die Frage, in welchem Endomembrankompartiment stressinduziertes PtdIns(4,5)P₂ vorliegt, blieb also zunächst unbeantwortet.

4.4 Assoziation stressinduzierter PIs mit CCVs

“Bulk Flow Endocytosis“

“Bulk Flow“ beschreibt die Bewegung größerer Mengen von Zellmaterial in und außerhalb der Zelle (Jurgens, 2004). Man ordnet es dem aktiven Transport gekoppelt an ATP-Verbrauch zu. Es gibt zwei Arten von „Bulk-Bewegung“, die Exo- und Endocytose (Jurgens, 2004). Endocytose ist die Internalisierung von Plasmamembran Proteinen und Lipiden in Form von Vesikeln, die auch ehemals extrazelluläre Moleküle umschließen können. Die endocytotische Internalisierung ist ein konservierter Prozess für alle eukaryotischen Zellen, der für verschiedene zelluläre Funktionen notwendig ist. Dies beinhaltet einen Durchfluss und Abbau von Plasmamembranproteinen, besonders von Rezeptoren.

Der molekulare Mechanismus der Endocytose in Pflanzen ist ein weites Feld mit vielen noch ungeklärten Fragen (Battey et al., 1999; Jurgens, 2004). Es wird bislang angenommen, dass der Vesikeltransportablauf in Pflanzen analog zu dem in Hefe und tierischen Zellen vor sich geht, wo PtdIns3P an den Endosomen lokalisiert und nicht an der Plasmamembran, während PtdIns(4,5)P₂ an der Plasmamembran und nicht an den Endosomen gefunden wird (Gillooly et al., 1999; Meijer und Munnik, 2003). Einen Sonderfall endocytotischer Vesikel bilden die CCVs, die mit dem Strukturprotein Clathrin beschichtet sind (Liu et al., 1995). Es ist aus dem tierische System bekannt, dass die Ausbildung des Clathrinmantels an Vesikeln von der Anwesenheit von PtdIns(4,5)P₂ abhängt (Jost et al., 1998). Eine solche Abhängigkeit wurde bislang in Pflanzenzellen nicht demonstriert.

Clathrin ist ein fibröses Protein und besteht aus einer schweren Kette (180 kDa) und zwei leichten Ketten (35-40 kDa). Die Untereinheiten des Trimers sind in Form eines Dreibeins angeordnet, des sogenannten Triskelions (Abb. 53). Clathrin kann zusammen mit verschiedenen Adapterproteinen auf der Oberfläche von endocytotischen Vesikeln (bekannt als Clathrinbeschichtung) einen gitterartigen Komplex bilden (Paul und Frigerio, 2007; Pauly und Drubin, 2007). CCVs haben einen Durchmesser von 50-100 nm. Zwischen Clathrin und der äußeren Vesikelmembran finden sich Adapterproteinkomplexe (AP-Komplexe), die die schwere Kette des Clathrins mit Membranlipiden oder Membranproteinen verbinden und so die Clathrinbindung an

Membranen vermitteln. AP-2 vermittelt die Bildung von CCVs an der Plasmamembran. AP-1 vermittelt die CCV-Bildung am Trans-Golgi Netzwerk.

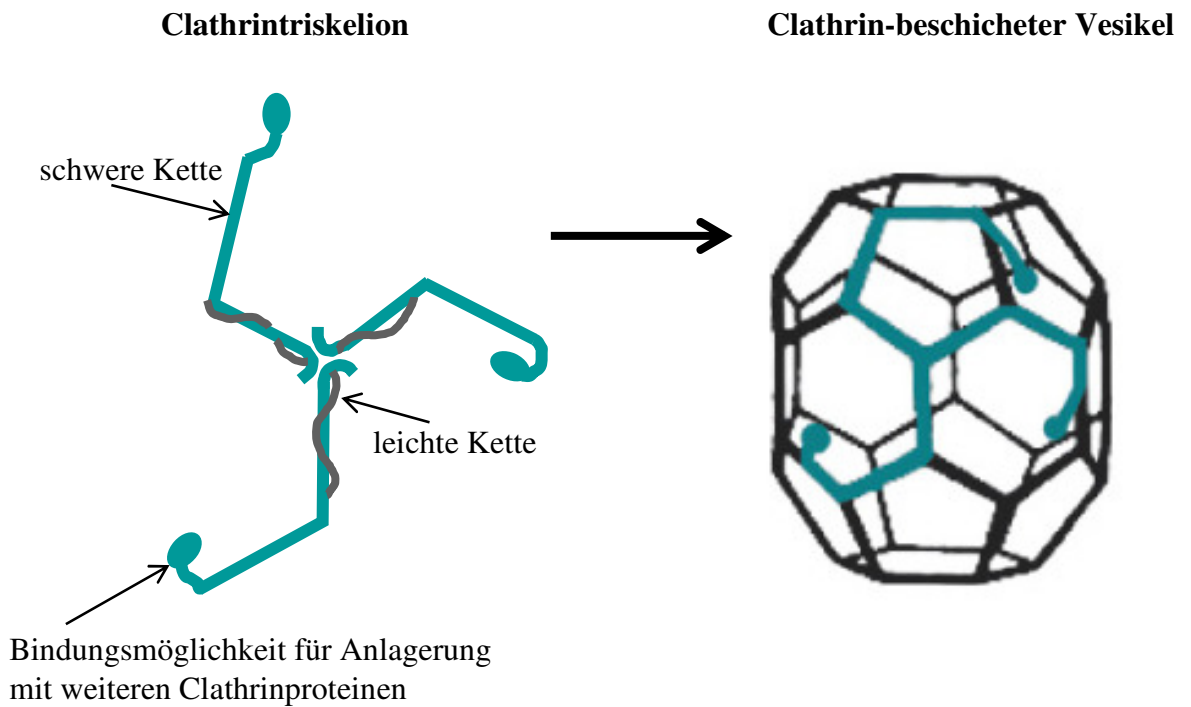


Abbildung 53: Aufbau eines Clathrintrimers. Die Clathrinstruktur wird auch als Triskelion bezeichnet, das aus schweren und leichten Ketten besteht und Bindungsmöglichkeiten für weitere Clathrinmoleküle bietet. Clathrinmoleküle können so einen gitterartigen Komplex ausbilden, der CCVs überzieht. CCV, Clathrin-beschichteten Vesikel. Abbildung: modifiziert nach Fotin et al., 2004.

Der endocytotische Reaktionsweg beinhaltet clathrinabhängige und clathrinunabhängige Endocytose. Die clathrinabhängige Endocytose ist die dabei am besten untersuchte Form der endocytotischen Membraninternalisierung, und daher wurden CCVs als Marker für salzstressinduzierte Vesikelinternalisierung ausgewählt.

Clathrinabhängige Endocytose

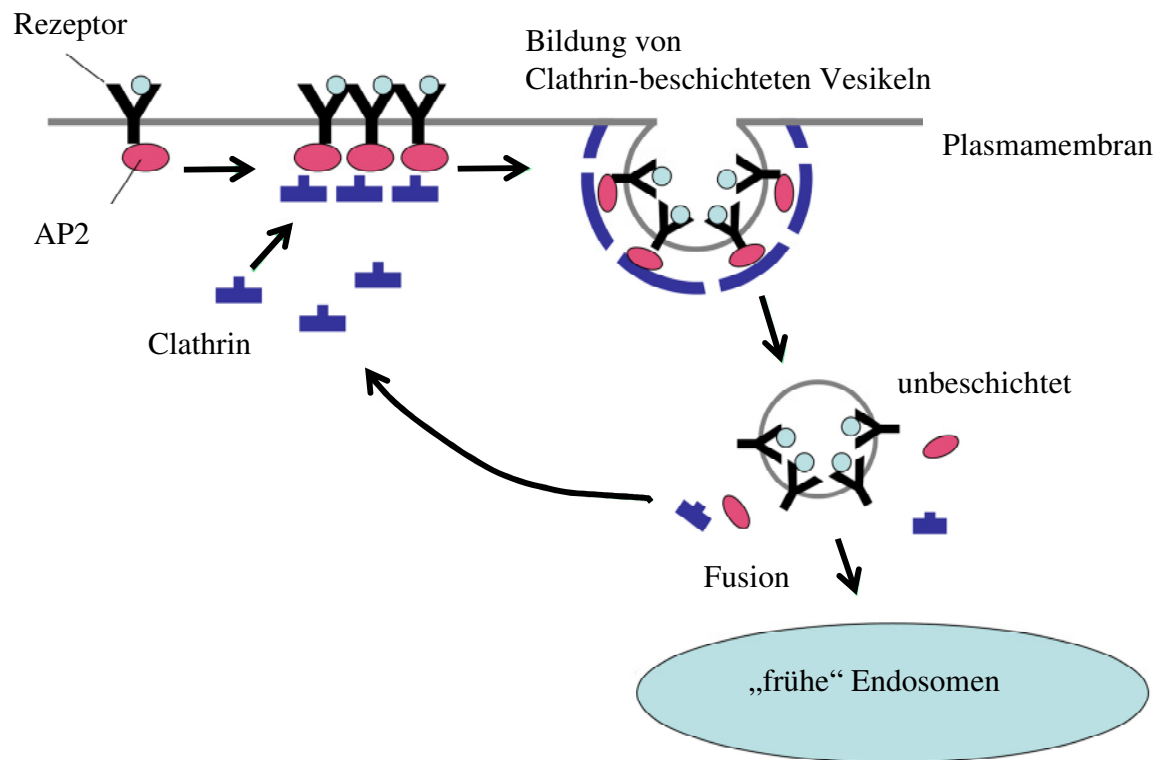


Abbildung 54: Ablauf der clathrinabhängigen Endocytose. Clathrin und Transportmoleküle sammeln sich an der Plasmamembran zusammen mit dem Adapterkomplex AP-2, welcher Clathrin mit einem Transmembranrezeptor verbindet. Anschließend findet die Bildung der CCVs, Clathrin-beschichteter Vesikel, statt. Sind die Vesikel im Cytosol, verlieren sie ihre Clathrinbeschichtung.

Überlegungen, was sich in Membranen ändern, wenn sie Salzstress ausgesetzt werden, ließ uns die Hypothese aufstellen, dass $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ während der Plasmolyse (Gomez-Lepe et al., 1979; Jurgens, 2004) durch „bulk-flow-endocytosis“ internalisiert werden könnten.

Die Analyse CCV-angereicherter subzellulärer Fraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Salzstress gab eindeutige Hinweise, dass stressinduziertes $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ mit CCVs assoziieren (Abb. 39). Der salzinduzierte $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Anstieg konnte nach 60 min in den CCVs gefunden werden (Abb. 39). Ein Anstieg in PtdIns fand nach 30 min hyperosmotischem Stress statt, die phosphorylierten Derivate wurden nach 60 min verstärkt gebildet. Die ungesättigte Fettsäurezusammensetzung von PtdIns fand sich dabei in $\text{PtdIns}4\text{P}$ und $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ wieder.

Obwohl bislang nur wenig Information für eine Rolle von PIs in Endocytoseprozessen bei Pflanzen vorliegt, spielen PI-Lipide eine wichtige Rolle in der Regulation der Endocytose bei anderen Eukaryoten. Eine Vielzahl von verschiedenen PI-Lipiden binden an den Adapterkomplex AP-2, der in menschlichen Zellen mit Clathrin und Peptiden interagiert, die endocytotische Signalmotive besitzen (Kirchhausen et al., 1997a; Kirchhausen et al., 1997b).

In chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark von Mäusen konnte gezeigt werden, dass PtdIns(4,5)P₂ eng verbunden mit der Endocytose ist. PtdIns(4,5)P₂ stellt Proteine der Plasmamembran bereit und dient dabei als ATP-Bindungsmöglichkeit für die Endocytose. Die Änderungen in PtdIns(4,5)P₂-Gehalten steuern die Ablösungsrate der Vesikel (Milosevic et al., 2005). Eine Erhöhung von PtdIns(4,5)P₂-Gehalten stiumliert die Exocytose durch den Anstieg in der Anzahl der Vesikel (Milosevic et al., 2005).

PIs sind ebenfalls wichtig für die Lokalisierung und Aktivität regulatorischer GTPasen, die die Vesikelabspaltung von der Plasmamembran steuern (de Hoop et al., 1994). Eine Abhängigkeit der clathrinvermittelten Endocytose von PtdIns(4,5)P₂ (Jost et al., 1998) konnte durch den Einsatz von PI 5-Phosphatasen gezeigt werden, die die Endocytose, durch Verringerung der PtdIns(4,5)P₂-Gehalte hemmen (Malecz et al., 2000).

Vesikeltransport in tierischen Zellen und Hefe ist durch eine große Familie von RAS-Typ-GTPasen reguliert (Novick und Zerial, 1997; Schimmoller et al., 1998; Chavier und Goud, 1999). Analysen an pflanzlichen Modellen haben gezeigt, dass GTPasen für den Vesikeltransport von Endomembranen oder der Plasmamembran wichtig sind. Kleine GTPasen spielen eine wichtige Rolle im Proteintransport zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER in Tabak und *Arabidopsis*-Zellkulturen (Takeuchi et al., 2002).

Im Gegensatz zu den besser untersuchten GTPasen sind die Funktionen von PIs in der Vesikelendocytose bislang nicht klar. Gesteigerte Biosynthese von PIs ist in verschiedenen Modellpflanzen und bei verschiedenen Stimuli mit der pflanzlichen Stressantwort assoziiert. Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise, dass die Lokalisierung von ungesättigtem PtdIns(4,5)P₂ mit dem Vesikeltransport zusammenhängen kann.

Gesteigerte Gehalte an PtdIns(4,5)P₂ nach hyperosmotischem Stress waren mit CCVs assoziiert (Abb. 39). In Einklang mit der Hypothese, dass PtdIns(4,5)P₂ eine Rolle bei der salzstressinduzierten Vesikelinternalisierung durch „bulk flow endocytosis“ von der

Plasmamembran spielt, waren nach Salzstress deutlich mehr CCVs nachzuweisen als in unstimulierten Kontrollpflanzen (Abb. 44). Der Nachweis gesteigerter CCV-Bildung wurde auf Proteinebene (Abb. 41) und auf Lipidebene geführt (Abb. 40). Um die zeitliche Korrelation von stressinduzierter PtdIns(4,5)P₂-Bildung mit verstärkter CCV-Bildung auf einen kausalen Zusammenhang zu testen, wurden neben *Arabidopsis*-Kontrollpflanzen auch *InsP 5Ptase*-Pflanzen untersucht, in denen die Akkumulation von PIs gestört ist, und die daher reduzierte Gehalte an PtdIns, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ aufweisen (Abb. 33). Die vorliegende Analyse stressinduzierter CCVs von Kontrollpflanzen und von *InsP 5Ptase*-Pflanzen ergab, dass auf Proteinebene weit weniger Proteine mit CCVs von *InsP 5Ptase*-Pflanzen assoziierten als mit CCVs der Kontrollpflanzen (Abb. 41). In den CCVs von unstimulierten *InsP 5Ptase*-Pflanzen war durch Immundetektion kein Clathrin nachweisbar, im Gegensatz zur Situation in den Kontrollpflanzen (Abb. 41A). Die Quantifizierung vesikelassoziierter Struktur lipide wie PtdCho (Abb. 44) ergab keine relevanten Unterschiede zwischen Vesikeln von Kontrollpflanzen und *InsP 5Ptase*-Pflanzen, was darauf hinweist, dass nur die vesikelassozierten Proteine, nicht aber die Gesamtmenge an gebildeten Vesikeln in den *InsP 5Ptase*-Pflanzen beeinträchtigt war. Anhand der erhobenen Daten erscheint es möglich, dass PtdIns(4,5)P₂ oder ein anders PI für die Rekrutierung von Clathrin und anderen Proteinen an endocytotischen Vesikeln nötig ist.

Stressinduzierte Kolokalisierung von Clathrin und PtdIns(4,5)P₂ in Zwiebelepidermiszellen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte unabhängig von den biochemischen Daten eine Verbindung zwischen PtdIns(4,5)P₂ und Clathrin verifiziert werden. Um die Lokalisierung von Clathrin und PtdIns(4,5)P₂ zu zeigen, wurden der PLC δ_1 -PH-Reporter (Varnai und Balla, 1998; Dowd et al., 2006) und Clathrin mit fluoreszierenden Markern verbunden. Die entsprechenden cDNA-Konstrukte wurden einzeln und zusammen transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert.

Die PLC δ_1 -PH-Domäne wurde in dieser Arbeit benutzt, um PtdIns(4,5)P₂ in lebenden Zellen sichtbar zu machen und Änderungen in der Lokalisierung nach Salzstress zu beobachten. Zwiebelepidermiszellen haben große Vakuolen, die das Cytoplasma teilweise nur als eine dünne Linie neben der Plasmamembran erscheinen lassen. Ein Unterschied zwischen cytosolischer- und plasmamembran-lokalisierter Fluoreszenz ist

daher nicht einfach auszumachen. Aus diesem Grund wurden für die gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen Zwiebelzellen ausgewählt, in denen cytoplasmatische Bereiche deutlich sichtbar waren. Aufgrund von vorangegangenen Studien in tierischen Zellen (Varnai und Balla, 1998), aber auch in pflanzlichen BY2-Suspensionskulturen (van Leeuwen et al., 2007) wurde eine cytosolische Lokalisierung der PLC δ_1 -PH Domäne erwartet.

Eine Lokalisierung der PLC δ_1 -PH-Domäne im Cytosol bedeutet nicht, dass PtdIns(4,5)P₂ frei im Cytoplasma vorhanden ist, sondern dass in den pflanzlichen Zellen zu wenig PtdIns(4,5)P₂ in der Plasmamembran vorhanden ist, dass die PLC δ_1 -PH Domäne es binden kann. Im Gegensatz zu tierischen Zellen und Grünalgen besitzen höhere Pflanzen nur wenig PtdIns(4,5)P₂ (Munnik et al., 1998; Meijer und Munnik, 2003; Vermeer et al., 2006). Als Kopfgruppe von PtdIns(4,5)P₂ kann InsP₃ ebenfalls von der PLC δ_1 -PH-Domäne gebunden werden (van Leeuwen et al., 2007), wobei die Bindungsaffinität für die Lipidkopfgruppe deutlich höher ist als für das wasserlösliche InsP₃ (Varnai und Balla, 1998). Eine Lokalisierung von PtdIns(4,5)P₂ durch GFP-PLC δ_1 -PH an der Plasmamembran zeigten auch Tang et al. (Tang et al., 2007).

Eine Überexpression eines Tandemkonstruktes von der PLC δ_1 -PH-Domäne (YFP-2x PLC δ_1 -PH) zeigte eine Lokalisierung an der Plasmamembran (Vermeer et al., 2006). In anderen Fällen konnte erst durch Salzstress eine Plasmamembranlokalisierung der PLC δ_1 -PH-Domäne induziert werden (van Leeuwen et al., 2007). Einen Anstieg in den PtdIns(4,5)P₂-Gehalten in der Plasmamembran nach Salzstress wurde auch in *Arabidopsis*-Keimlingen (DeWald et al., 2001), Wurzelepidermiszellen, und Wurzelcortexzellen und wachsenden Wurzelhaaren gezeigt (van Leeuwen et al., 2007).

In den hier gezeigten Experimenten fand eine Lokalisierung der Redstar-PLC δ_1 -PH-Domäne bereits ohne Salzstress an der Plasmamembran statt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Zellen durch den Bombardierungsvorgang und die anschließende Behandlung schon leicht gestresst waren. YFP-Clathrin zeigte zunächst eine Lokalisierung im Cytosol.

Wurde an Zellen, die YFP-Clathrin und Redstar-PLC δ_1 -PH koexprimierten, Salzstress angelegt, zeigten sich bereits nach 2 min 0,1 M NaCl eine Kolokalisierung der beiden Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran (Abb. 45H, 46K). Die schnelle

stressinduzierte Relokalisierung von Clathrin aus dem Cytosol an die Plasmamembran stimmt mit den biochemischen Daten überein. Die Eigenschaften der Plasmamembran scheinen sich mit Salzstress zu ändern, was in höheren Vergrößerungen deutlich wird (Abb. 46). Durch die Fluoreszenz kann man die Plasmamembran ohne Salzstress als feine durchgehende Linie erkennen. Nach Salzstress schien diese Linie angerauht und unregelmäßig zu werden (Abb. 46).

Anhand der präsentierten biochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Daten kann postuliert werden, dass Clathrin und PtdIns(4,5)P₂ einzeln oder auch zusammen eine Rolle bei der Endocytose spielen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen PtdIns(4,5)P₂-Bildung und Clathrinrekrutierung an CCVs konnte wegen der zeitlichen Begrenzung der Arbeit leider nicht mehr getestet werden, wird aber Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

4.5 Mögliche physiologische Funktionen stressinduzierter PIs

Die Summe der Daten weist auf die Anwesenheit mindestens eines stressinduzierbaren PtdIns(4,5)P₂-Pools hin, der aus ungesättigtem PtdIns gebildet wird. Eine postulierte Funktion in der Bildung von CCVs während der Plasmamembraninternalisierung nach hyperosmotischem Stress muss vor dem Hintergrund sowohl der Lipidquantifizierungen in CCVs als auch der Proteindaten bewertet werden.

Vesikelknospung über SNARE-Komplexe

Die Hauptkomponenten in Vesikeltransportprozessen sind Lipide und vesikelverbundene und integrale Membranproteine. Der Transportprozess ist reguliert durch Proteine, die an der Vesikelabschnürung, dem Transport und der Fusion mit Zielmembranen beteiligt sind. Von diesen vesikelverbundenen Membranproteinen besteht ein Großteil aus sog. SNARE-Komplexen, die ihre Funktion in der Fusion zwischen Vesikel und Zielmembran haben. Die Fusion eines Vesikels mit einer Zielmembran oder seine Abschnürung beginnt mit der Bildung eines Komplexes aus t-SNARE der Zielmembran und v-SNARE der Vesikelmembran. Pflanzen besitzen eine große Anzahl von SNARE-Proteinen (Sanderfoot, 2007), die mit Vakuolen und verschiedenen Funktionen des Membranflusses in Verbindung stehen (Jurgens, 2004). Vesikeltransport ist ein regulärer Prozess in Zellen, aber Hinweise in Pflanzen, Hefe und Tieren zeigen auch, dass er eine wichtige Rolle in der Stressantwort spielt (Cavalli

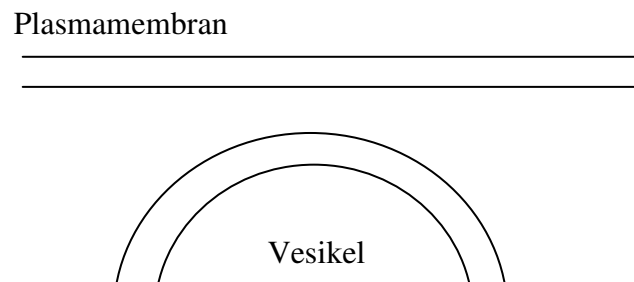
et al., 2001; Kargul et al., 2001; Mazel et al., 2004; Leshem et al., 2006; Leshem et al., 2007). Ein wichtiger Vesikeltransportweg in Pflanzen ist der Transport von Vesikeln von der Plasmamembran zum ER und zu zentralen lytischen Vakuolen.

Die Betrachtung analoger Prozesse in Säugerzellen kann zum Verständnis der Prozesse in Pflanzen beitragen. Während der neuroendocrinen Exocytose sind verschiedene Phospholipide wichtig für die Regulation des sekretorischen Vesikelflusses (Milosevic et al., 2005). Eine Überexpression einer PI4P 5-Kinase oder die Infusion von PtdIns(4,5)P₂ erhöhen die PtdIns(4,5)P₂-Gehalte in der Plasmamembran und begünstigen die Sekretion. PtdIns(4,5)P₂ hat einen Effekt auf die Sekretion durch die Regulation der Anzahl der Vesikel, die zur Freilassung bereit stehen. Die Rolle von PtdIns(4,5)P₂ bei der Vesikelbildung oder der Membranfusion wird als Konsequenz seiner biophysikalischen Eigenschaften diskutiert.

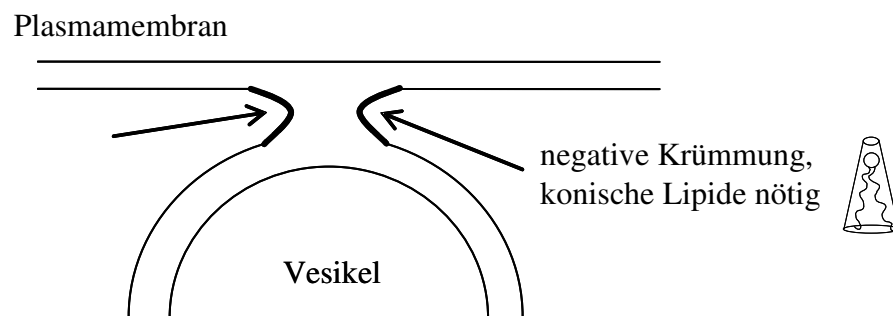
PtdIns(4,5)P₂ beeinflusst die Membrankrümmung

Effiziente SNARE-abhängige Vesikelfusion benötigt die Bildung von PtdOH und PtdIns(4,5)P₂. Die SNARE-Komplex-vermittelte Fusion ist abhängig von der Verteilung von anionischen Phospholipiden, die die Membrankrümmung für den Fusionsprozess optimieren. Die innere Membraneinzelschicht benötigt zur Fusion eine negative Krümmung, um die Membranintegrität aufrecht zu erhalten (Abb. 55B). Für eine vollständige Fusion benötigt die äußere Membraneinzelschicht eine positive Krümmung (Abb. 55C). Die PLD bildet konisches PtdOH, welches negative Krümmungen in einer Membran bewirkt. PtdIns(4,5)P₂ beeinflusst durch seine große Kopfgruppe und invers-konische Gestalt, die Membran zu positiven Krümmungen (Lee, 2004; Lee und Miller, 2007) und ist nötig für die Regulation von Fusionsprozessen in der Exocytose in neuronalen Zellen (Di Paolo et al., 2004). PtdOH und PtdIns(4,5)P₂ wirken so gemeinsam an entgegengesetzten Membranoberflächen. Während der Fusion stabilisiert und weitet PtdOH die äußeren Leaflets der Doppelschichten (Chernomordik und Kozlov, 2003, 2005; Chernomordik et al., 2006). PtdIns(4,5)P₂ sorgt im nächsten Schritt für eine positive Krümmung der inneren Leaflets (Lee, 2004). Die gegenläufigen biophysikalischen Eigenschaften der anionischen Lipide PtdOH und PtdIns(4,5)P₂ begünstigen so die Membrankrümmung für die Vesikelabschnürung und auch die Vesikelfusion.

A zylindrische Lipide in der Plasmamembran



B Fusion der cytoplasmatischen Einzelschicht



C Fusion der nicht-cytoplasmatischen Einzelschicht

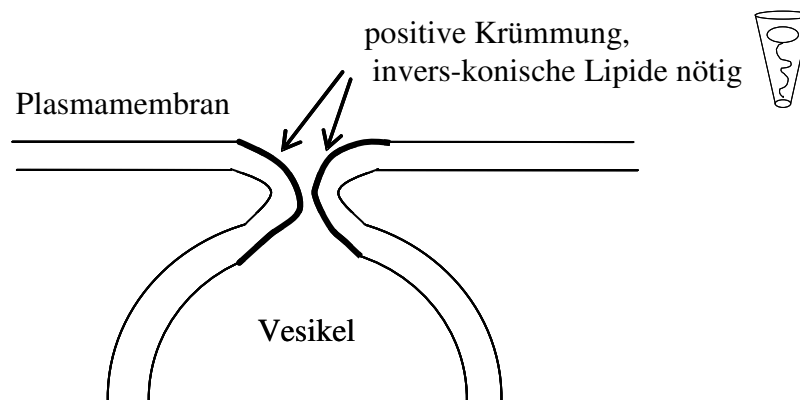


Abbildung 55: Membrankrümmung bei der Vesikelfusion. Die geometrische Form verschiedener Phosphoglyceride begünstigen negative oder positive Membrankrümmungen die für die Vesikelfusion nötig sind. A, Die Plasmamembran besteht aus zylindrischen Lipiden, die eine Doppelschicht bilden. B, Bei der Vesikelfusion bewirken konische Lipide eine negative Membrankrümmung der inneren Einzelschicht. C, Zusätzlich bewirken invers-konische Lipide eine positive Membrankrümmung der äußeren Einzelschicht. (Kooijman et al., 2003).

PtdIns(4,5)P₂ als Mediator zwischen Vesikeltransport und F-Aktin-Dynamik

Neben dem beschriebenen möglichen Funktionen von PtdIns(4,5)P₂ in der Vesikelfusion selbst kann PtdIns(4,5)P₂ auch über die Regulation des F-Aktincytoskeletts Einfluß auf die Endo- und Exocytose nehmen.

Sowohl in Pollenschläuchen als auch in Wurzelhaaren kann das in der Spitze lokalisierte PtdIns(4,5)P₂ den F-Aktin-verbundenen Vesikelfluss beeinflussen. In diesem Zusammenhang beschrieben Preuss et al. die Rolle von PIs im aktinvermittelten Vesikeltransport in Wurzelhaaren (Preuss et al., 2006). Eine Veränderung der PtdIns(4,5)P₂-Gehalte beeinflusst ausserdem die Aktinfilamentorientierung und hemmt die Zellwandbiosynthese in *Arabidopsis* (Zhong et al., 2004; Zhong et al., 2005).

PIs können mit aktinbindenden Proteinen interagieren und damit den Auf- und Abbau des Cytoskeletts beeinflussen. Zu den aktinbindenden Proteinen gehören Profilin, Gelsolin und Cofilin, die aber ihre Affinität zu Aktin verlieren, wenn sie PtdIns(4,5)P₂ binden (Lassing und Lindberg, 1985; Janmey und Kinnunen, 2006). Ein Rückgang von PIs führt zu einem starken Verlust der Gelsolin- und Profilin-Bindung (Tan und Boss, 1992; Shibasaki et al., 1997; Raucher et al., 2000; Golub und Pico, 2005). *In vitro*-Studien weisen darauf hin, dass Profilin an PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ binden kann und die Lipide dadurch vor der Hydrolyse der PLC geschützt werden (Drobak et al., 1994).

PI- und PIP-Kinasen sind im Cytoskelett sowohl pflanzlicher (Tan und Boss, 1992) als auch tierischer Zellen vorhanden (Payraastre et al., 1991), und die spezifischen Aktivitäten von Lipidkinasen hängen mit Änderungen im F-Aktincytoskelett während der Reaktion auf externe Stimuli zusammen. Änderungen des PI-Systems sind ein Teil der komplexen intrazellulären Kommunikation zwischen der Plasmamembran, dem Cytoskelett und den weiter oben beschriebenen Prozessen der Endo- und Exocytose.

5. Schlusswort

Im Rahmen dieser Arbeit wurden physiologische Funktionen von PIs in *Arabidopsis* untersucht. Durch einen neuetablierten direkten Nachweis konnten stressinduzierbare und konstitutive PIs auf molekularer Ebene unterschieden werden. Die Daten weisen daraufhin, dass ein Teil der stressinduzierten PIs durch PLC hydrolysiert werden, was Botenstoffe (InsP₃ und DAG) freisetzt. Ein weiterer Teil der PIs wurde in stressinduziert gebildeten CCVs lokalisiert, wo sie möglicherweise für die Rekrutierung von Proteinen wie z.B. Clathrin wichtig sind. Die Rolle der PIs bei der „bulk-flow-endocytosis“ ist immer noch ungeklärt. Mögliche Funktionen beinhalten die Beeinflussung der Membrankrümmung zur Vesikelabschnürung oder die Regulation des F-Aktincytoskeletts, das für den Vesikeltransport notwendig ist.

Die erhobenen Daten weisen auf Funktionen der PIs in Pflanzen hin, die für diese Lipide auch in anderen eukaryotischen Organismen schon definiert wurden. Künftige Experimente würden sich mit der Charakterisierung der an der Biosynthese von PI beteiligten Enzyme befassen, die für die hier beobachteten Effekte verantwortlich sind, und die wegen ihrer pflanzenspezifischen Vielzahl Unterschiede zu anderen Organismengruppen erwarten lassen. Die hier erhobenen Daten unterstreichen die evolutionären Gemeinsamkeiten – eher als die Gegensätze - des PI-Systems verschiedener Eukaryoten, dass schon der gemeinsame Vorfahre von Pflanzen, Tieren und Pilzen besessen haben muß. Trotz der sehr verschiedenen Lebensweisen von Pflanzen, Tieren und Pilzen hat sich das PI-System in der Evolution erhalten, was auf seine grundlegende Wichtigkeit für die Funktion eukaryotischer Zellen hinweist.

6. Zusammenfassung

Das PI-System ist in eukaryotischen Zellen an der Steuerung diverser physiologischer Prozesse beteiligt, die u.a. die Dynamik des Aktincytoskelettes, die Regulation von Vesikelverkehr, die Steuerung der Aktivitäten von Ionenkanälen und ATPasen, sowie die zelluläre Signalleitung auf hormonale Stimulation und extrazelluläre Stresse beinhalten. Viele Untersuchungen wurden an tierischen Modellsystemen oder Hefe durchgeführt, über das pflanzliche PI-System ist aber nur wenig bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die verfügbaren Analysemethoden für PIs durch die Einführung gaschromatographischer und massenspektrometrischer Techniken zur Fettsäurebestimmung erweitert. Mittels der neuetablierten Methode wurden die Gehalte und Fettsäuremuster von PIs aus verschiedenen Organen von *Arabidopsis*-Blättern sowie aus anderen Organismen untersucht. In allen Fällen zeigten sich Änderungen im PI-Stoffwechsel nach hyperosmotischer Stimulation. Anhand seiner charakteristischen Fettsäurezusammensetzung konnte ein stressinduzierbarer PI-Pool definiert werden. Die stressinduzierte Bildung von PIs ging mit der Produktion des löslichen Botenstoffes InsP₃ einher. Da die Spaltprodukte der PLC-vermittelten PtdIns(4,5)P₂-Hydrolyse die gleiche Fettsäurezusammensetzung hatten wie stressinduzierte PIs, kann angenommen werden, dass ein Teil der neu gebildeten PIs zur Bildung von InsP₃ hydrolysiert wird, während ein weiterer Teil intakt bleibt. Weitere physiologische Funktionen der stressinduzierten PIs, PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ wurde über die Eingrenzung der subzellulären Verteilung auf Organellenebene untersucht. Subzelluläre Strukturen wurden über klassische Fraktionierungsverfahren angereichert und auf Gehalt und Fettsäurezusammensetzung assoziierter PIs und anderer Lipide analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg in PIs in der Plasmamembran beginnt und sich dann in Endomembranen spezifisch in CCVs wiederfindet, nicht aber in ER, Zellkernen oder Plastiden. In Pflanzen, deren PI-Stoffwechsel auf genetischem Wege gestört ist, zeigte sich eine verringerte Rekrutierung von Clathrin und anderen Proteinen an CCVs. In Zwiebelzellen, die fluoreszenzmarkiertes Clathrin oder ein Reporterkonstrukt für PtdIns(4,5)P₂ transient exprimierten, konnte eine rasche, stressinduzierte Kolo-kalisierung von Clathrin mit PtdIns(4,5)P₂ an der Plasmamembran gezeigt werden. Die Daten weisen auf eine Funktion für stressinduziertes PtdIns(4,5)P₂ bei der Bildung von CCVs in *Arabidopsis* hin, wie sie bereits für andere eukaryotische Organismen bekannt ist.

7. Literatur

- Abe S, Davies E** (1991) Isolation of F-actin from pea stems. Evidence from fluorescence microscopy. *Protoplasma* **163**: 51-61
- Alexandre J, Lassalles JP** (1990) Effect of d-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate on the electrical properties of the red beet vacuole membrane. *Plant Physiol* **93**: 837-840
- Allen GJ, Muir SR, Sanders D** (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**: 735-737
- Amadio M, Battaini F, Pascale A** (2006) The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacol Res* **54**: 317-325
- Augert G, Blackmore PF, Exton JH** (1989) Changes in the concentration and fatty acid composition of phosphoinositides induced by hormones in hepatocytes. *J Biol Chem* **264**: 2574-2580
- Balla T** (2006) Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. *J Endocrinol* **188**: 135-153
- Balla T, Bondeva T, Varnai P** (2000) How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trends Pharmacol Sci* **21**: 238-241
- Balla T, Varnai P** (2002) Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. *Sci STKE* **2002**: PL3
- Bathey NH, James NC, Greenland AJ, Brownlee C** (1999) Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* **11**: 643-660
- Berkowitz RL, Travis RL** (1981) Characterization and quantitation of concanavalin A binding by plasma membrane enriched fractions from soybean root. *Plant Physiol* **68**: 1014-1019
- Berridge MJ** (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* **212**: 849-858
- Berridge MJ** (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325
- Berridge MJ** (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* **67**: 1-21
- Berridge MJ, Irvine RF** (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321
- Berridge MJ, Irvine RF** (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**: 197-205
- Bhat RA, Panstruga R** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5-19
- Blatt MR, Thiel G, Trentham DR** (1990) Reversible inactivation of K⁺ channels of Vicia stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **346**: 766-769
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104-116
- Bovet L, Muller MO, Siegenthaler PA** (2001) Three distinct lipid kinase activities are present in spinach chloroplast envelope membranes: phosphatidylinositol phosphorylation is sensitive to wortmannin and not dependent on chloroplast ATP. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 269-275

- Bradford MM** (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
- Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzel D** (1999) Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta* **209**: 435-443
- Brearley CA, Hanke DE** (1994) Phosphoinositides in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Aleurone Tissue. *Plant Physiol* **104**: 1381-1384
- Bubb MR, Baines IC, Korn ED** (1998) Localization of actobindin, profilin I, profilin II, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Motil Cytoskeleton* **39**: 134-146
- Bunney TD, Watkins PA, Beven AF, Shaw PJ, Hernandez LE, Lomonossoff GP, Shanks M, Peart J, Drobak BK** (2000) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with nuclear transcription sites in higher plants. *Plant Cell* **12**: 1679-1688
- Bustin SA** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193
- Caroni P** (2001) Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P₂ rafts. *Embo J* **20**: 4332-4336
- Carpenter CL, Cantley LC** (1990) Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* **29**: 11147-11156
- Carricaburu V, Fournier B** (2001) Phosphoinositide fatty acids regulate phosphatidylinositol 5-kinase, phospholipase C and protein kinase C activities. *Eur J Biochem* **268**: 1238-1249
- Cavalli V, Vilbois F, Corti M, Marcote MJ, Tamura K, Karin M, Arkinstall S, Gruenberg J** (2001) The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol Cell* **7**: 421-432
- Chavrier P, Goud B** (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 466-475
- Chen Q, Brglez I, Boss WF** (1991) Inositol phospholipids as plant second messengers. *Symp Soc Exp Biol* **45**: 159-175
- Chen R, Kang VH, Chen J, Shope JC, Torabinejad J, DeWald DB, Prestwich GD** (2002) A monoclonal antibody to visualize PtdIns(3,4,5)P₃ in cells. *J Histochem Cytochem* **50**: 697-708
- Chernomordik LV, Kozlov MM** (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* **72**: 175-207
- Chernomordik LV, Kozlov MM** (2005) Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* **123**: 375-382
- Chernomordik LV, Zimmerberg J, Kozlov MM** (2006) Membranes of the world unite! *J Cell Biol* **175**: 201-207
- Chilvers ER, Batty IH, Challiss RA, Barnes PJ, Nahorski SR** (1991) Determination of mass changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and evidence for agonist-stimulated metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in airway smooth muscle. *Biochem J* **275** (Pt 2): 373-379
- Cho H, Kim YA, Ho WK** (2006) Phosphate number and acyl chain length determine the subcellular location and lateral mobility of phosphoinositides. *Mol Cells* **22**: 97-103
- Cho MH, Chen Q, Okpodu CM, Boss WF** (1992) Separation and quantification of [³H]inositol phospholipids using thin-layer-chromatography and a computerized ³H imaging scanner. *LC-GC* **10**: 464-468
- Christie WW** (2003) Thin-layer chromatography. *In* Lipid analysis, Vol 15. The Oily Press, Bridgwater, pp 142-152

- Ciruela A, Hinchliffe KA, Divecha N, Irvine RF** (2000) Nuclear targeting of the beta isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its alpha-helix 7. *Biochem J* **346 Pt 3**: 587-591
- Clarke JH, Richardson JP, Hinchliffe KA, Irvine RF** (2007) Type II PtdInsP kinases: location, regulation and function. *Biochem Soc Symp*: 149-159
- Collin S, Justin AM, Cantrel C, Arondel V, Kader JC** (1999) Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from Arabidopsis. *Eur J Biochem* **262**: 652-658
- Cooke IR, Deserno M** (2006) Coupling between lipid shape and membrane curvature. *Biophys J* **91**: 487-495
- Cooke IR, Kremer K, Deserno M** (2005) Tunable generic model for fluid bilayer membranes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **72**: 011506
- Cremona O, De Camilli P** (2001) Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* **114**: 1041-1052
- Cullis PR, Hope MJ, Tilcock CP** (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids* **40**: 127-144
- Curatolo W** (1987) The physical properties of glycolipids. *Biochim Biophys Acta* **906**: 111-136
- de Hoop MJ, Huber LA, Stenmark H, Williamson E, Zerial M, Parton RG, Dotti CG** (1994) The involvement of the small GTP-binding protein Rab5a in neuronal endocytosis. *Neuron* **13**: 11-22
- Denecke J, Goldman MH, Demolder J, Seurinck J, Botterman J** (1991) The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. *Plant Cell* **3**: 1025-1035
- Desrivieres S, Cooke FT, Parker PJ, Hall MN** (1998) MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 15787-15793
- Dewald DB, Ozaki S, Malaviya S, Shope JC, Manabe K, Crosby L, Neilsen P, Johnston D, Harihar S, Prestwich GD** (2005) Cellular calcium mobilization in response to phosphoinositide delivery. *Cell Calcium* **38**: 59-72
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H** (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 759-769
- Di Paolo G, Moskowitz HS, Gipson K, Wenk MR, Voronov S, Obayashi M, Flavell R, Fitzsimonds RM, Ryan TA, De Camilli P** (2004) Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* **431**: 415-422
- Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA** (2003) Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P₂ in its place. *J Membr Biol* **194**: 77-89
- Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, Michell RH** (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* **390**: 187-192
- Dowd PE, Coursol S, Skirpan AL, Kao TH, Gilroy S** (2006) Petunia phospholipase c1 is involved in pollen tube growth. *Plant Cell* **18**: 1438-1453
- Downes CP, Macphee CH** (1990) myo-inositol metabolites as cellular signals. *Eur J Biochem* **193**: 1-18
- Drobak BK** (1992) The plant phosphoinositide system. *Biochem J* **288**: 697-712
- Drobak BK** (1993) Plant Phosphoinositides and Intracellular Signaling. *Plant Physiol* **102**: 705-709

- Drobak BK, Dewey RE, Boss WF** (1999) Phosphoinositide kinases and the synthesis of polyphosphoinositides in higher plant cells. *Int Rev Cytol* **189**: 95-130
- Drobak BK, Ferguson IB** (1985) Release of Ca^{2+} from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **130**: 1241-1246
- Drobak BK, Heras B** (2002) Nuclear phosphoinositides could bring FYVE alive. *Trends Plant Sci* **7**: 132-138
- Drobak BK, Watkins PA** (2000) Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Lett* **481**: 240-244
- Drobak BK, Watkins PAC, Valenta R, Dove SK, Lloyd CW, Staiger CJ** (1994) Inhibition of plant plasma membrane phosphoinositide phospholipase C by the actin-binding protein, profilin. *Plant J* **6**: 389-400
- D'Santos C, Clarke JH, Roefs M, Halstead JR, Divecha N** (2000) Nuclear inositides. *Eur J Histochem* **44**: 51-60
- Einspahr KJ, Maeda M, Thompson GA, Jr.¹** (1988) Concurrent changes in *Dunaliella salina* ultrastructure and membrane phospholipid metabolism after hyperosmotic shock. *J Cell Biol* **107**: 529-538
- Einspahr KJ, Peeler TC, Thompson GA, Jr.²** (1988) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of *Dunaliella salina* to hypoosmotic shock. *J Biol Chem* **263**: 5775-5779
- Elge S, Brealley C, Xia HJ, Kehr J, Xue HW, Mueller-Roeber B.** (2001) An *Arabidopsis* inositol phospholipid kinase strongly expressed in procambial cells: synthesis of $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ and $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ in insect cells by 5-phosphorylation of precursors. *Plant J* **26**: 561-571
- Engelman DM** (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-580
- Fairley-Grenot K, Assmann SM** (1991) Evidence for G-Protein Regulation of Inward K^+ Channel Current in Guard Cells of Fava Bean. *Plant Cell* **3**: 1037-1044
- Fan Z, Makielski JC** (1999) Phosphoinositides decrease ATP sensitivity of the cardiac ATP-sensitive K^+ channel. A molecular probe for the mechanism of ATP-sensitive inhibition. *J Gen Physiol* **114**: 251-269
- Fotin A, Cheng Y, Sliz P, Grigorieff N, Harrison SC, Kirchhausen T, Walz T,** (2004) Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**: 573-579
- Fukami K, Furuhashi K, Inagaki M, Endo T, Hatano S, Takenawa T** (1992) Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* **359**: 150-152
- Gandhavadi M, Allende D, Vidal A, Simon SA, McIntosh TJ** (2002) Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys J* **82**: 1469-1482
- Garcia A, Cayla X, Fleischer A, Guernon J, Alvarez-Franco Canas F, Rebollo MP, Roncal F, Rebollo A** (2003) Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution. *Biochimie* **85**: 727-731
- Gerard GF, d'Alessio MD** (1993) Enzymes of molecular biology. *In* MM Burell, ed, *Methods in Molecular Biology*, Vol 16. Humana Press, Inc., Totowa, NJ, pp 73-93
- Gietl C, Seidel C, Svendsen I** (1996) Plant glyoxysomal but not mitochondrial malate dehydrogenase can fold without chaperone assistance. *Biochim Biophys Acta* **1274**: 48-58
- Gillooly DJ, Melendez AJ, Hockaday AR, Harnett MM, Allen JM** (1999) Endocytosis and vesicular trafficking of immune complexes and activation of phospholipase D by the human high-affinity IgG receptor requires distinct phosphoinositide 3-kinase activities. *Biochem J* **344 Pt 2**: 605-611

- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ** (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**: 769-771
- Golub T, Pico C** (2005) Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂-rich raft assemblies. *Biochem Soc Symp*: 119-127
- Gomez-Lepe BE, Lee-Stadelmann O, Palta JP, Stadelmann EJ** (1979) Effects of Octylguanidine on Cell Permeability and Other Protoplasmic Properties of *Allium cepa* Epidermal Cells. *Plant Physiol* **64**: 131-138
- Gomord V, Denmat LA, Fichette-Laine AC, Satiat-Jeunemaitre B, Hawes C, Faye L** (1997) The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J* **11**: 313-325
- Hama H, Schnieders EA, Thorner J, Takemoto JY, DeWald DB** (1999) Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 34294-34300
- Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW** (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**: 168-170
- Heilmann I, Perera IY, Gross W, Boss WF** (1999) Changes in phosphoinositide metabolism with days in culture affect signal transduction pathways in *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol* **119**: 1331-1339
- Heilmann I, Perera IY, Gross W, Boss WF** (2001) Plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels decrease with time in culture. *Plant Physiol* **126**: 1507-1518
- Heilmann I, Stevenson-Paulik J, Perera IY** (2000) Plant PtdIns 3-kinase goes nuclear. *Plant Cell* **12**: 1511-1512
- Heim S, Wagner KG** (1986) Evidence of phosphorylated phosphatidylinositols in the growth cycle of suspension cultured plant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 1175-1181
- Heras B, Drobak BK** (2002) PARF-1: an Arabidopsis thaliana FYVE-domain protein displaying a novel eukaryotic domain structure and phosphoinositide affinity. *J Exp Bot* **53**: 565-567
- Hetherington AM** (2001) Guard cell signaling. *Cell* **107**: 711-714
- Hilgemann DW, Ball R** (1996) Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science* **273**: 956-959
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C** (2001) The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci STKE* **2001**: RE19
- Hilpela P, Vartiainen MK, Lappalainen P** (2004) Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**: 117-163
- Hinchliffe KA, Ciruela A, Irvine RF** (1998) PIPkins1, their substrates and their products: new functions for old enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1436**: 87-104
- Holthuis JC, Levine TP** (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 209-220
- Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD** (2006) Lipids and membranes. In G Carlson, ed, *Principles of Biochemistry*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp 253-292
- Holstein SE** (2004) Clathrin and Plant Endocytosis. *Traffic* **3**: 614-620
- Hyvonen M, Macias MJ, Nilges M, Oschkinat H, Saraste M, Wilmanns M** (1995) Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *Embo J* **14**: 4676-4685

- Im YJ, Davis AJ, Perera IY, Johannes E, Allen NS, Boss WF** (2007) The N-terminal Membrane Occupation and Recognition Nexus Domain of Arabidopsis Phosphatidylinositol Phosphate Kinase 1 Regulates Enzyme Activity. *J Biol Chem* **282**: 5443-5452
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Janmey PA, Kinnunen PK** (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* **16**: 538-546
- Jones AM, Assmann SM** (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep* **5**: 572-578
- Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL** (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* **8**: 1399-1402
- Jurgens G** (2004) Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 481-504
- Justin AM, Kader JC, Collin S** (2002) Phosphatidylinositol synthesis and exchange of the inositol head are catalysed by the single phosphatidylinositol synthase 1 from *Arabidopsis*. *Eur J Biochem* **269**: 2347-2352
- Kargul J, Gansel X, Tyrrell M, Sticher L, Blatt MR** (2001) Protein-binding partners of the tobacco syntaxin NtSyr1. *FEBS Lett* **508**: 253-258
- Kauffmann-Zeh A, Thomas GM, Ball A, Prosser S, Cunningham E, Cockcroft S, Hsuan JJ** (1995) Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* **268**: 1188-1190
- Kearns MA, Monks DE, Fang M, Rivas MP, Courtney PD, Chen J, Prestwich GD, Theibert AB, Dewey RE, Bankaitis VA** (1998) Novel developmentally regulated phosphoinositide binding proteins from soybean whose expression bypasses the requirement for an essential phosphatidylinositol transfer protein in yeast. *Embo J* **17**: 4004-4017
- King CE, Stephens LR, Hawkins PT, Guy GR, Michell RH** (1987) Multiple metabolic pools of phosphoinositides and phosphatidate in human erythrocytes incubated in a medium that permits rapid transmembrane exchange of phosphate. *Biochem J* **244**: 209-217
- Kinnunen PK** (2000) Lipid bilayers as osmotic response elements. *Cell Physiol Biochem* **10**: 243-250
- Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H** (1997) a Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 488-495
- Kirchhausen T, Pines J, Toldo L, Lafont F** (1997) b Membranes and sorting. Membrane permeability. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 473
- Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME, Maliga P** (1988) Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8502-8505
- Klein TM, Kornstein L, Sanford JC, Fromm ME** (1989) Genetic Transformation of Maize Cells by Particle Bombardment. *Plant Physiol* **91**: 440-444
- Kobayashi T, Takematsu H, Yamaji T, Hiramoto S, Kozutsumi Y** (2005) Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, in yeast. *J Biol Chem* **280**: 18087-18094
- König S, Mosblech A, Heilmann I** (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinct fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana*. *FASEB J* **21**: 1958-1967

- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN** (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* **4**: 162-174
- Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, Hong Y, Tolias K, Carpenter C, Chua NH** (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol* **145**: 317-330
- Kusano H, Testerink C, Vermeer JEM, Tsuge T, Shimada H, Oka A, Munnik T, Aoyama T** (2008) The *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell*: in press
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lang T, Jahn R** (2008) Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol*: 107-127
- Lassing I, Lindberg U** (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**: 472-474
- Laxminarayan KM, Chan BK, Tetaz T, Bird PI, Mitchell CA** (1994) Characterization of a cDNA encoding the 43-kDa membrane-associated inositol-polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* **269**: 17305-17310
- Lech K, Brent R** (1988) Media preparation and bacteriological tools. *In* FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidmann, JA Smith, K Struhl, eds, *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, pp 111-116
- Lee AG** (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 62-87
- Lee MC, Miller EA** (2007) Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 424-434
- Lee Y, Choi YB, Suh S, Lee J, Assmann SM, Joe CO, Kelleher JF, Crain RC** (1996) Abscisic Acid-Induced Phosphoinositide Turnover in Guard Cell Protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol* **110**: 987-996
- Lee Y, Kim YW, Jeon BW, Park KY, Suh SJ, Seo J, Kwak JM, Martinoia E, Hwang I** (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J* **52**: 803-816
- Lefebvre B, Furt F, Hartmann MA, Michaelson LV, Carde JP, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule JJ, Mongrand S** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**: 402-418
- Lemmon MA** (2003) Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**: 201-213
- Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS** (2002) Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* **513**: 71-76
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A** (2006) Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18008-18013
- Leshem Y, Seri L, Levine A** (2007) Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J* **51**: 185-197
- Lipka V, Kwon C, Panstruga R** (2007) SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 147-174
- Liu K, Li L, Luan S** (2005) An essential function of phosphatidylinositol phosphates in activation of plant shaker-type K⁺ channels. *Plant J* **42**: 433-443

- Liu SH, Wong ML, Craik CS, Brodsky FM** (1995) Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* **83**: 257-267
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16-20
- Lomasney JW, Cheng HF, Wang LP, Kuan Y, Liu S, Fesik SW, King K** (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding to the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 enhances enzyme activity. *J Biol Chem* **271**: 25316-25326
- Lopez-Huertas E, Oh J, Baker A** (1999) Antibodies against pex14p block ATP-independent binding of matrix proteins to peroxisomes in vitro. *FEBS Lett* **459**: 227-229
- Loyet KM, Kowalchuk JA, Chaudhary A, Chen J, Prestwich GD, Martin TF** (1998) Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis. *J Biol Chem* **273**: 8337-8343
- Malecz N, McCabe PC, Spaargaren C, Qiu R, Chuang Y, Symons M** (2000) Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* **10**: 1383-1386
- Manzoli L, Billi AM, Faenza I, Matteucci A, Martelli AM, Peruzzi D, Falconi M, Rhee SG, Gilmour RS, Cocco L** (1999) Nuclear phospholipase C: a novel aspect of phosphoinositide signalling. *Anticancer Res* **19**: 3753-3756
- Martelli AM, Manzoli L, Faenza I, Bortul R, Billi A, Cocco L** (2002) Nuclear inositol lipid signaling and its potential involvement in malignant transformation. *Biochim Biophys Acta* **1603**: 11-17
- Martelli AM, Sang N, Borgatti P, Capitani S, Neri LM** (1999) Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem* **74**: 499-521
- Martin SW, Konopka JB** (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 675-684
- Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, Levine A** (2004) Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol* **134**: 118-128
- Meijer HJ, Berrie CP, Iurisci C, Divecha N, Musgrave A, Munnik T** (2001) Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem J* **360**: 491-498
- Meijer HJ, Munnik T** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 265-306
- Memon AR, Boss WF** (1990) Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinases and H(+)-ATPase in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *J Biol Chem* **265**: 14817-14821
- Memon AR, Chen QY, Boss WF** (1989) Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem Biophys Res Commun* **162**: 1295-1301
- Milosevic I, Sorensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, Jahn R, Neher E** (2005) Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* **25**: 2557-2565
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* **279**: 36277-36286
- Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M** (1998) Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the Nicotiana

- plumbaginifolia plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem* **273**: 34837-34842
- Mosblech A, König S, Stenzel I, Grzeganeck P, Feussner I, Heilmann I** (2008) Phosphoinositide and inositolpolyphosphate-signaling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Molecular Plant* **2**: in press
- Mueller-Roeber B, Pical C** (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol* **130**: 22-46
- Muir SR, Sanders D** (1997) Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiol* **114**: 1511-1521
- Mukherjee S, Maxfield FR** (2004) Membrane domains. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 839-866
- Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR** (1999) Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol* **144**: 1271-1284
- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A** (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* **1389**: 222-272
- Neri LM, Capitani S, Borgatti P, Martelli AM** (1999) Lipid signaling and cell responses at the nuclear level. *Histol Histopathol* **14**: 321-335
- Nishikawa K, Toker A, Wong K, Marignani PA, Johannes FJ, Cantley LC** (1998) Association of protein kinase Cmu with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* **273**: 23126-23133
- Nishizuka Y** (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**: 661-665
- Novick P, Zerial M** (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 496-504
- Ohlrogge J, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957-970
- Okpodu CM, Gross W, Burkhardt W, Boss WF** (1995) Purification and Characterization of a Soluble Phosphatidylinositol 4-Kinase from Carrot Suspension Culture Cells. *Plant Physiol* **107**: 491-500
- Otterhag L, Sommarin M, Pical C** (2001) N-terminal EF-hand-like domain is required for phosphoinositide-specific phospholipase C activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **497**: 165-170
- Parton RG, Richards AA** (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**: 724-738
- Paul MJ, Frigerio L** (2007) Coated vesicles in plant cells. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 471-478
- Pauly BS, Drubin DG** (2007) Clathrin: an amazing multifunctional dreamcoat? *Cell Host Microbe* **2**: 288-290
- Payrastre B, van Bergen en Henegouwen PM, Breton M, den Hartigh JC, Plantavid M, Verkleij AJ, Boonstra J** (1991) Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J Cell Biol* **115**: 121-128
- Pedrazzini E, Giovinazzo G, Bielli A, de Virgilio M, Frigerio L, Pesca M, Faoro F, Bollini R, Ceriotti A, Vitale A** (1997) Protein quality control along the route to the plant vacuole. *Plant Cell* **9**: 1869-1880
- Perera IY, Heilmann I, Boss WF** (1999) Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5838-5843

- Perera IY, Heilmann I, Chang SC, Boss WF, Kaufman PB** (2001) A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. *Plant Physiol* **125**: 1499-1507
- Perera IY, Hung CY, Brady S, Muday GK, Boss WF** (2006) A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. *Plant Physiol* **140**: 746-760
- Perera IY, Love J, Heilmann I, Thompson WF, Boss WF** (2002) Up-regulation of phosphoinositide metabolism in tobacco cells constitutively expressing the human type I inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Plant Physiol* **129**: 1795-1806
- Pettitt TR, Dove SK, Lubben A, Calaminus SD, Wakelam MJ** (2006) Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. *J Lipid Res* **47**: 1588-1596
- Pfeffer SR** (2007) Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* **76**: 629-645
- Phillips SE, Vincent P, Rizzieri KE, Schaaf G, Bankaitis VA, Gaucher EA** (2006) The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**: 21-49
- Pical C, Westergren T, Dove SK, Larsson C, Sommarin M** (1999) Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J Biol Chem* **274**: 38232-38240
- Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ** (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* **270**: 11707-11710
- Preuss ML, Schmitz AJ, Thole JM, Bonner HK, Otegui MS, Nielsen E** (2006) A role for the RabA4b effector protein PI-4Kbeta1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Biol* **172**: 991-998
- Ratajczak R, Feussner I, Hause B, Bohm A, Parthier B, Wasternack C** (1998) Alteration of V-type H⁺-ATPase during methyljasmonate-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome). *J Plant Physiol* **152**: 199-206
- Raucher D, Stauffer T, Chen W, Shen K, Guo S, York JD, Sheetz MP, Meyer T** (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* **100**: 221-228
- Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY** (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**: 546-550
- Rizo J, Sudhof TC** (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* **273**: 15879-15882
- Robinson DG, Hinz G** (2001) Organelle isolation. In B Satiat-Jeunemaitre, C Hawes, eds, *Plant cell biology: A practical approach*. IRL Press, Oxford, pp 295-323
- Rochester CP, Kjellbom P, Andersson B, Larsson C** (1987) Lipid composition of plasma membranes isolated from light-grown barley (*Hordeum vulgare*) leaves: identification of cerebroside as a major component. *Arch Biochem Biophys* **255**: 385-391
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P, Goud B** (2005) Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *Embo J* **24**: 1537-1545
- Salaun C, James DJ, Chamberlain LH** (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* **5**: 255-264
- Sanderfoot A** (2007) Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant Physiol* **144**: 6-17

- Santarius M, Lee CH, Anderson RA** (2006) Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P₂ pools. *Biochem J* **398**: 1-13
- Sato H, Feix JB** (2006) Osmoprotection of bacterial cells from toxicity caused by antimicrobial hybrid peptide CM15. *Biochemistry* **45**: 9997-10007
- Sato H, Feix JB** (2006) Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1245-1256
- Schiavo G, Gu QM, Prestwich GD, Sollner TH, Rothman JE** (1996) Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13327-13332
- Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR** (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* **273**: 22161-22164
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML** (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* **39**: 257-288
- Schmid AC, Wise HM, Mitchell CA, Nussbaum R, Woscholski R** (2004) Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett* **576**: 9-13
- Schroeder JI, Hagiwara S** (1990) Repetitive increases in cytosolic Ca²⁺ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca²⁺ permeable channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9305-9309
- Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD** (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**: 88-91
- Shears SB** (1989) Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation. *Biochem J* **260**: 313-324
- Shibasaki Y, Ishihara H, Kizuki N, Asano T, Oka Y, Yazaki Y** (1997) Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J Biol Chem* **272**: 7578-7581
- Shimada H, Koizumi M, Kuroki K, Mochizuki M, Fujimoto H, Ohta H, Masuda T, Takamiya K** (2004) ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Plant Cell Physiol* **45**: 960-967
- Simons K, Toomre D** (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39
- Simons K, Vaz WL** (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 269-295
- Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H** (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 485-492
- Singer SJ, Nicholson GL** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**
- Smolenska-Sym G, Kacperska A** (1996) Inositol 1,4,5-trisphosphate formation in leaves of winter oilseed rape plants in response to freezing, tissue water potential and abscisic acid. *Physiol Plant* **96**: 692-698
- Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge JB** (2000) Lipids. *In* BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 456-526
- Sperling P, Heinz E** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* **1632**: 1-15
- Spiegelberg BD, Hamm HE** (2007) Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 40-44

- Stack JH, Herman PK, Schu PV, Emr SD** (1993) A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *Embo J* **12**: 2195-2204
- Staiger CJ, Gibbon BC, Kovar DR, Zonia LE** (1997) Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 275-281
- Staiger CJ, Goodbody KC, Hussey PJ, Valenta R, Drobak BK, Lloyd CW** (1993) The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J* **4**: 631-641
- Starling AP, East JM, Lee AG** (1995) Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of dephosphorylation of the phosphorylated Ca(2+)-ATPase. *J Biol Chem* **270**: 14467-14470
- Stenzel I, Ischebeck T, König S, Holubowska A, Sporysz M, Hause B, Heilmann I** (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 124-141
- Stevenson JM, Perera IY, Boss WF** (1998) A phosphatidylinositol 4-kinase pleckstrin homology domain that binds phosphatidylinositol 4-monophosphate. *J Biol Chem* **273**: 22761-22767
- Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S, Boss WF** (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci* **5**: 252-258
- Stevenson-Paulik J, Love J, Boss WF** (2003) Differential regulation of two *Arabidopsis* type III phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. A regulatory role for the pleckstrin homology domain. *Plant Physiol* **132**: 1053-1064
- Sun H, Lin K, Yin HL** (1997) Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol* **138**: 811-820
- Takahashi S, Katagiri T, Hirayama T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2001) Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol* **42**: 214-222
- Takeuchi M, Ueda T, Yahara N, Nakano A** (2002) Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J* **31**: 499-515
- Tan Z, Boss WF** (1992) Association of Phosphatidylinositol Kinase, Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, and Diacylglycerol Kinase with the Cytoskeleton and F-Actin Fractions of Carrot (*Daucus carota* L.) Cells Grown in Suspension Culture : Response to Cell Wall-Degrading Enzymes. *Plant Physiol* **100**: 2116-2120
- Tang RH, Han S, Zheng H, Cook CW, Choi CS, Woerner TE, Jackson RB, Pei ZM** (2007) Coupling diurnal cytosolic Ca²⁺ oscillations to the CAS-IP3 pathway in *Arabidopsis*. *Science* **315**: 1423-1426
- Temple BR, Jones AM** (2007) The Plant Heterotrimeric G-Protein Complex. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 249-266
- Toker A** (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 254-261
- van den Brink-van der Laan E, Killian JA, de Kruijff** (2004) a Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta* **1663**: 275-288
- van den Brink-van der Laan E, Chupin V, Killian JA, de Kruijff B** (2004) b Small alcohols destabilize the KcsA tetramer via their effect on the membrane lateral pressure. *Biochemistry* **43**: 5937-5942

- van Leeuwen W, Vermeer JE, Gadella TW, Jr., Munnik T** (2007) Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings. *Plant J*: in press (doi: 10.1111/j.1365-1313X.2007.03292.x)
- van Meer G** (2005) Cellular lipidomics. *Embo J* **24**: 3159-3165
- van Rossum DB, Patterson RL, Sharma S, Barrow RK, Kornberg M, Gill DL, Snyder SH** (2005) Phospholipase C γ 1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* **434**: 99-104
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD** (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**: 535-602
- Varnai P, Balla T** (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[³H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol* **143**: 501-510
- Varsanyi M, Tolle HG, Heilmeyer MG, Jr., Dawson RM, Irvine RF** (1983) Activation of sarcoplasmic reticular Ca²⁺ transport ATPase by phosphorylation of an associated phosphatidylinositol. *Embo J* **2**: 1543-1548
- Vermeer JE, van Leeuwen W, Tobena-Santamaria R, Laxalt AM, Jones DR, Divecha N, Gadella TW, Jr., Munnik T** (2006) Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J* **47**: 687-700
- Vicogne J, Vollenweider D, Smith JR, Huang P, Frohman MA, Pessin JE** (2006) Asymmetric phospholipid distribution drives in vitro reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14761-14766
- Vincent P, Chua M, Nogue F, Fairbrother A, Mekeel H, Xu Y, Allen N, Bibikova TN, Gilroy S, Bankaitis VA** (2005) A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of Arabidopsis thaliana root hairs. *J Cell Biol* **168**: 801-812
- Voelker DR** (2005) Protein and lipid motifs regulate phosphatidylserine traffic in yeast. *Biochem Soc Trans* **33**: 1141-1145
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B** (1976) A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J Clin Pathol* **29**: 150-153
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X** (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**: 31994-32002
- Welti R, Wang X** (2004) Lipid species profiling: a high-throughput approach to identify lipid compositional changes and determine the function of genes involved in lipid metabolism and signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 337-344
- Wenk MR, De Camilli P** (2004) Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8262-8269
- Wenk MR, Lucast L, Di Paolo G, Romanelli AJ, Suchy SF, Nussbaum RL, Cline GW, Shulman GI, McMurray W, De Camilli P** (2003) Phosphoinositide profiling in complex lipid mixtures using electrospray ionization mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **21**: 813-817
- Westergren T, Dove SK, Sommarin M, Pical C** (2001) AtPIP5K1, an Arabidopsis thaliana phosphatidylinositol phosphate kinase, synthesizes PtdIns(3,4)P(2) and PtdIns(4,5)P(2) in vitro and is inhibited by phosphorylation. *Biochem J* **359**: 583-589

- Westergren T, Ekblad L, Jergil B, Sommarin M** (1999) Phosphatidylinositol 4-kinase associated with spinach plasma membranes. Isolation and characterization of two distinct forms. *Plant Physiol* **121**: 507-516
- Whisstock JC, Wiradjaja F, Waters JE, Gurung R** (2002) The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life* **53**: 15-23
- Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J** (2003) Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity. *J Biol Chem* **278**: 37895-37901
- Xue HW, Pical C, Brearley C, Elge S, Muller-Rober B** (1999) A plant 126-kDa phosphatidylinositol 4-kinase with a novel repeat structure. Cloning and functional expression in baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem* **274**: 5738-5745
- Yamamoto M, Chen MZ, Wang YJ, Sun HQ, Wei Y, Martinez M, Yin HL** (2006) Hypertonic stress increases phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by activating PIP5K β . *J Biol Chem* **281**: 32630-32638
- Yoshida S, Ohya Y, Goebel M, Nakano A, Anraku Y** (1994) A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 1166-1172
- Yu H, Fukami K, Watanabe Y, Ozaki C, Takenawa T** (1998) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1. *Eur J Biochem* **251**: 281-287
- Zhong R, Burk DH, Morrison WH, 3rd, Ye ZH** (2004) FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell* **16**: 3242-3259
- Zhong R, Burk DH, Nairn CJ, Wood-Jones A, Morrison WH, 3rd, Ye ZH** (2005) Mutation of SAC1, an Arabidopsis SAC domain phosphoinositide phosphatase, causes alterations in cell morphogenesis, cell wall synthesis, and actin organization. *Plant Cell* **17**: 1449-1466
- Zini N, Lisignoli G, Solimando L, Bavelloni A, Valmori A, Cristino S, Martelli AM, Facchini A, Maraldi NM** (2005) Quantitative immunodetection of key elements of polyphosphoinositide signal transduction in osteoblasts from arthritic patients shows a direct correlation with cell proliferation. *Histochem Cell Biol* **124**: 131-137

8. Anhang

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

HsIns_for	5'ATGGCGGGGAAGGCGGCCGC-3'
HsIns_rev	5'TCACTGCACGACAGACACAACACT-3'
MORN5for BspI	5'GATCTCATGAACTACCATGCCGAGAGAGTG-3'
MORN5rev NotI	5'GATC GCGGCCGC TCATCCTGACGGATAATATGTACCATT-3'
MORN6for BspHI	5'GATCTCATGAACGAGAGTTACCACGCCGAGAAA-3'
MORN6rev NotI	5'GATC GCGGCCGCTCAAGTCGAAGGGTAATAAGTCCCC-3'
MORN7for NcoI	5'GATCCATGGATATGAGGTCTGGAGATAGA-3'
MORN7rev NotI	5'GATCGCGGCCGCTCATCCAGCAGGATAAAAAGACTCCC-3'
MORN8for NcoI	5'GATCCATGGAAACAAGGCCTGCAGAGAGAG-3'
MORN8rev NotI	5'GATCGCGGCCGCTCATCCAGCAGGATAAAAAGACTCCA-3'
MORN9for NcoI	5'GATCCATGGACAGGTTACAGAGTTAGGGAGCTG-3'
MORN9rev NotI	5'GATCGCGGCCGCTCATCCCGCTGAATAAACGAGCCT-3'
PIPK1MORN_for	5'GATCCATGGAGAAGCCGCTACCAAACGGA-3'
PIPK1MORN_rev	5'GATCCATGGAAACTCCTCATAATATTACTCTC-3'
PIPK2MORN_for	5'GATACATGTACGGAGATCTCTACATGGGA-3'
PIPK2MORN_rev	5'GATACATGTAAATTCCTCATGAGATTACTACT-3'
PIPK3MORN_for	5'GATCCATGGAGAAGGTGCTAAAGAACGGC-3'
PIPK3MORN_rev	5'GATCCATGGCTCTTCCTCCCCACCC-3'
PIPK4MORN_for	5'GATCCATGGAGAGAATACTTCCTAATGGAGA-3'
PIPK4MORN_rev	5'GATCCATGGTCTCCTGATGGATAATAAGTAC-3'
Primer_HVA22dfor	5'GTCTTCTTCTTCTACATAAAATTG-3'
Primer_HVA22drev	5'GGAAATTATTAGCGTTGTCATTA-3'
Primer_RD20for	5'AATGTGTACGTCTTTTGCATAAG-3'
Primer_RD20rev	5'GTAACATCTTCTCTTATTTATATAA-3'
atARC3_for2	5'GATC GAATTCATGCATCTACCCTGCTATCTGAGA-3'
atARC3_rev2	5'GATCGCGGCCGCTTTGTTACCTGCGGCCTCTAACT-3'
CILCfor	5'GATCGCGGCCGCCATGGGCTCTGCCTTTGAAGACGATTCCCTC-3'
CILCrev	5'GATCGCGGCCGC TTAAGCAGCAGTAACTGCCTCAGT-3'
atARC3for-T	5'GATC CCATG G CTGCATCTACCCTGCTATCTGAGA-3'

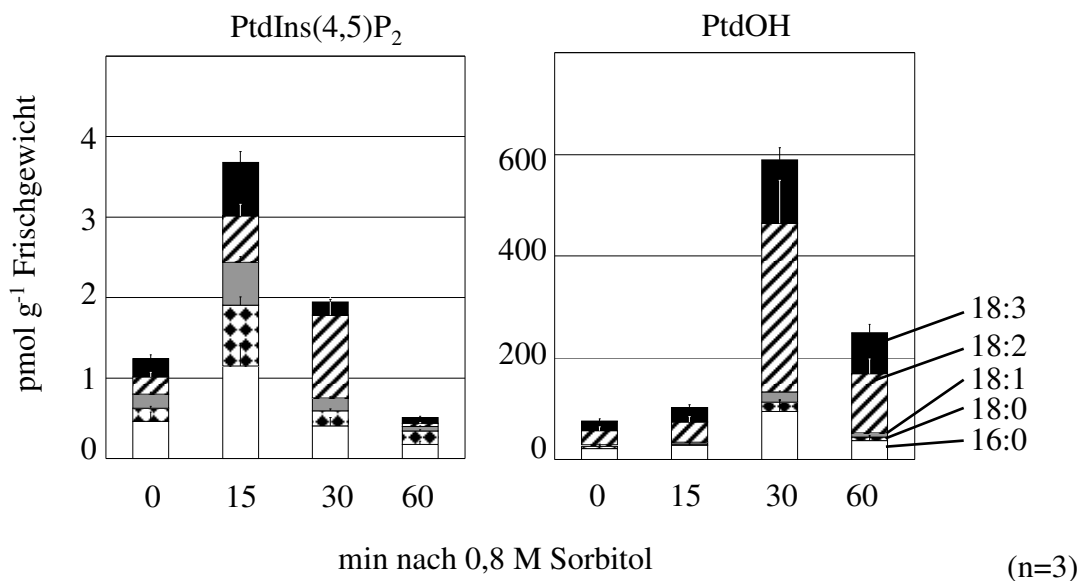


Abbildung 56: Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns(4,5)P₂ und PtdOH in *Arabidopsis*-Rosettenblättern nach Sorbitolbehandlung. Als Kontrolle für Salzeffekte wurden hydroponisch angezogene Pflanzen mit 0,8 M Sorbitol gestresst. Die Rosettenblätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Lipide analysiert. Die verschiedenen Fettsäuren sind durch die unterschiedlichen Balkensegmente dargestellt, wie rechts zusehen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung zellulärer Membranen.	2
Abbildung 2	Strukturen wichtiger Phosphoglyceride.	3
Abbildung 3	Glycerolipidzusammensetzung verschiedener pflanzlicher Gewebe.	5
Abbildung 4	Hauptreaktionen des Phosphoglyceridstoffwechsels.	7
Abbildung 5	Strukturen pflanzlicher PIs.	9
Abbildung 6	Biosynthese von PIs.	13
Abbildung 7	Aufbau eines „Lipid-Rafts“.	27
Abbildung 8	Darstellung der Gestalt von Lipiden.	29
Abbildung 9	PtdIns mit verschiedenen assoziierten Fettsäuren.	30
Abbildung 10	Aufbau der hydroponischen Kultur mit wachsenden Pflanzen.	41
Abbildung 11	Aufbau eines Zweiphasen-Gradienten.	45
Abbildung 12	Bestandteile der Nassblot-Apparatur und Aufbau eines Immun-Blots.	55
Abbildung 13	Versuchsaufbau zum RNA-Transfer ("Blot").	70
Abbildung 14	DC-Trennung verschiedener Phospholipidstandards.	75
Abbildung 15	Auftrennung von PtdIns(4,5)P ₂ und PtdIns(3,5)P ₂ .	76
Abbildung 16	Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs aus <i>Arabidopsis</i> -Rosettenblättern.	78
Abbildung 17	Chromatographische Auftrennung der Glyko- und Phospholipide von subzellulären Fraktionen.	80
Abbildung 18	Nachweis der Plasmamembranreicherung durch den Zweiphasen-Gradienten mittels Con A.	81
Abbildung 19	DAPI-Färbung zum Nachweis der Anreicherung von Zellkernen.	82
Abbildung 20	Immundetektion von Markerproteinen.	84
Abbildung 21	Fettsäurezusammensetzung von Phosphoglyceride der angereicherten subzellulären Fraktionen aus <i>Arabidopsis</i> -Rosettenblättern.	85
Abbildung 22	Fettsäurezusammensetzung von Phosphoglyceride der angereicherten subzellulären Fraktionen aus <i>Arabidopsis</i> -Zellkulturen.	87
Abbildung 23	Spezifischer Kopfgruppennachweis zur PtdIns(4,5)P ₂ -Mengenbestimmung nach hyperosmotischem Stress in <i>Arabidopsis</i> .	88
Abbildung 24	GC-Profile von transmethylierten Fettsäuren im Bereich der 18-C-Fettsäuren von Phosphoglyceriden.	89
Abbildung 25	Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PI-Spezies aus <i>Arabidopsis</i> -Blättern und -Wurzeln nach hyperosmotischem Stress.	91
Abbildung 26	Änderungen im Grad der Unsättigung der mit PtdIns und PIs assoziierten Fettsäuren nach hyperosmotischem Stress.	92
Abbildung 27	Änderungen der Fettsäurezusammensetzung von MGDG und PtdCho nach hyperosmotischem Stress in <i>Arabidopsis</i> -Rosettenblättern.	94
Abbildung 28	Änderungen der Fettsäurezusammensetzung in Gesamtlipidextrakten aus <i>Arabidopsis</i> -Rosettenblättern nach hyperosmotischem Stress.	95
Abbildung 29	Änderungen der Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PI-Spezies nach hyperosmotischen Stressexperimenten in	96

	Tabak BY2-Zellkulturen.	
Abbildung 30	Enzymaktivitätsanalyse der PtdIns(4,5)P ₂ -PLC in Mikrosomen von BY2-Zellkulturen nach Stimulation.	98
Abbildung 31	Änderungen der Fettsäurezusammensetzung von PI-Spezies in <i>S. cerevisiae</i> nach hyperosmotischen Stressexperimenten.	99
Abbildung 32	Änderungen in den Downstreamprodukten des PI-Synthesewegs während hyperosmotischem Stress in <i>Arabidopsis</i> -Kontrollpflanzen.	101
Abbildung 33	Änderungen in den Downstreamprodukten des PI-Synthesewegs während hyperosmotischem Stress in <i>InsP 5Ptase</i> -Pflanzen.	102
Abbildung 34	Änderungen der Transkriptgehalte nach hyperosmotischem Stress.	105
Abbildung 35	PtdIns und PI-Spezies in den angereicherten Fraktionen der Plasmamembran und Endomembranen nach hyperosmotischem Stress.	107
Abbildung 36	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in der Plasmamembran und den Endomembranen nach hyperosmotischem Stress.	108
Abbildung 37	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PI-Spezies in verschiedenen Endomembranfraktionen nach hyperosmotischem Stress.	110
Abbildung 38	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in verschiedenen Endomembranfraktionen nach hyperosmotischem Stress.	112
Abbildung 39	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs in der CCVs nach hyperosmotischem Stress.	113
Abbildung 40	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in der CCVs nach hyperosmotischem Stress.	114
Abbildung 41	Proteinzusammensetzung und Proteingehalte von CCVs.	115
Abbildung 42	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns und PIs in der CCVs nach hyperosmotischem Stress in <i>InsP 5Ptase</i> -Pflanzen.	117
Abbildung 43	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von Strukturlipiden in der CCVs nach hyperosmotischem Stress in <i>InsP 5Ptase</i> -Pflanzen.	118
Abbildung 44	Verringertes Verhältnis von CCV-assoziiertem PtdIns(4,5)P ₂ zu PtdCho in Kontroll- und <i>InsP 5Ptase</i> -Pflanzen nach hyperosmotischem Stress.	119
Abbildung 45	Stressinduzierte Kollokalisierung von Clathrin mit PtdIns(4,5)P ₂ in Zwiebelepidermiszellen.	121/2
Abbildung 46	Verändertes Erscheinungsbild der Plasmamembran nach hyperosmotischem Stress.	122
Abbildung 47	Phosphoglyceride aus PM und DIMs aus Tabak BY2-Zellen.	123
Abbildung 48	Fettsäurezusammensetzung von Phosphoglyceriden in angereicherten PM und DIMs von BY2-Zellkulturen.	125
Abbildung 49	Aktivitäten lipidmodifizierender Enzyme in DIMs von BY2-Zellkulturen.	126
Abbildung 50	Die N-terminalen Domänen der <i>Arabidopsis</i> PIP-Kinasen haben spezifische Lipidbindungseigenschaften.	128
Abbildung 51	Modell über die Existenz von zwei unabhängigen PtdIns-	132

Abbildung 52:	Pools. Modell zur stressinduzierten Umsetzung von ungesättigtem PtdIns.	134
Abbildung 53	Aufbau eines Clathrintrimers.	141
Abbildung 54	Ablauf der clathrinabhängigen Endocytose.	142
Abbildung 55	Membrankrümmung bei der Vesikelfusion.	148
Abbildung 56	Gehalt und Fettsäurezusammensetzung von PtdIns(4,5)P ₂ und PtdOH in <i>Arabidopsis</i> -Rosettenblättern nach Sorbitolbehandlung.	167

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete primäre Antiseren	35
Tabelle 2	Identifikationsnummern der genomischen Loci verwendeter <i>Arabidopsis</i> -Sequenzen	36
Tabelle 3	Verwendete Vektoren	36
Tabelle 4	Verwendete Lipidstandards	59
Tabelle 5	Aufstellung der R_f -Werte	75
Tabelle 6	Wiederfindungsrate von PIs nach DC	77
Tabelle 7	Verwendete Oligonukleotide	166

11. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
(w/w)	Gewicht pro Gewicht
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
³² P	Radioaktiv markiertes Isotop von Phosphor
³ H	Tritium, radioaktiv markiertes Isotop von Wasserstoff
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ACP	Acylträgerprotein
ACT	Aktin
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
Amp	Ampicillin
amp	Amper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Einheit des Drucks
BPB	Bromphenolblau-Natrium-Salz
BY	Bright Yellow
C	Kohlenstoffatom
Ca ²⁺	Calcium
CAPS	Calcium-abhängige Proteine für Sekretion
CCV	Clathrin-beschichtete Vesikel
CDP	Cytidindiphosphat
CH	Schweiz
CHCl ₃	Chloroform
Cho	Cholin
cm	Zentimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
ConA	Concanavalin A
CSP	Cytoskelett-Puffer
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag(e)
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DEDTC	Diethyldithiocarbamat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DGPP	Diacylglycerolpyrophosphat
DIM	Detergenzien-unlösliche-Membranen
DMSO	Dimethylsulfoxid

DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycotetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray Ionization Mass Spectrum
et al.	<i>et alii</i> , „und andere“
Etn	Ethanolamin
EtOH	Ethanol
FA	Fatty Acid „Fettsäure“
FA-BSA	Fettsäurefreies Bovines Serum Albumin
F-Aktin	filamentöses Aktin
FAME	„Fattyacidmethylester“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FYVE-Domäne	Fab1p-YOPB-Vps27p-EEA1-Domäne
g	Gramm
Gal	Galaktose
GC	Gaschromatographie
GFP	Green Fluoreszent Protein
G-Protein	GTP-bindendes Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HVA	High Voltage Activated
Ins	Inositol
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
<i>InsP 5P_{tase}</i>	Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosylpyranosid
JA	Jasmonsäure
K	Zellkerne
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
L	Liter
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerol
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MORN	Membrane Occupation und Recognition Nexus
MP	Mikrosomen

mRNA	<i>messenger</i> -RNA
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NBT	Natriumnitro-Tetrazoliumblau
ng	Nanogramm
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxyd
NH-Domäne	Novel-Domäne
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Pondus Hydrogenii
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI	Phosphoinositide
PI-Kinase	Phosphatidylinositol-Kinase
PIP-Kinase	Phosphatidylinositolphosphat-Kinase
PI-Synthase	Phosphatidylinositol-Synthase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Anorganisches Phosphat
PPI	Polyphosphoinositid
PtdCho	Phosphatidylcholin
PtdEtn	Phosphatidylethanolamin
PtdGro	Phosphatidylglycerol
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PtdIns(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PtdIns4P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PtdIns5P	Phosphatidylinositol-5-phosphat
PtdOH	Phosphatidsäure, Phosphatidat
PtdSer	Phosphatidylserin
PTE	Polyoxyethyltridecylether
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
PX-Domäne	Phox Homologie-Domäne
RD	responsive to dessication
R _f -Wert	Retentionsfaktoren-Werte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe

s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
s.u.	siehe unten
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SG	Sterolglycosid
SNARE	Soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-Sensitive-Fusion Factor Attachment Protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRPC3	Transienter Rezeptor in der Proteinfamilie von Kationenkanälen
Tsk	T-Zell-spezifische Kinase
U	Units
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region in der mRNA
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Watt
x g	einfache Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein

12. Lebenslauf

Name Sabine König
Geburtstag 11.08.1978
Ort Göttingen
Nationalität Deutsch

Schule

1984-1988 Adolf-Reichwein-Grundschule Göttingen
1988-1990 Orientierungsstufe, Bert-Brecht-Schule Göttingen
1990-1997 Hainberg Gymnasium Göttingen

Universität

1997 Beginn mit Biologiestudium, Universität Göttingen
11.2002 Diplomprüfungen in den Fächern:
Hauptfach: Mikrobiologie
1. Nebenfach: Biochemie
2. Nebenfach: Pharmakologie
09.2003 Diplomarbeit an der Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Dr. M. Hoppert und Prof. Dr. F. Mayer
2003-2004 Wissenschaftliches Arbeiten im Deutschen Primatenzentrum, Abteilung Virologie, Prof. Dr. G. Hunsmann
2005-2008 Anfertigung der Doktorarbeit, Universität Göttingen, Biochemie der Pflanze, Dr. I. Heilmann und Prof. Dr. I. Feußner

Veröffentlichungen

1. Hoppert M, König S, Hegermann J (2005) Mikroalgen auf Oberflächen von Baumaterialien. Z. dt. Ges. Geowiss., 156: 93-101, Stuttgart
2. König S, Mosblech A, Heilmann I. (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana*. FASEB J. 9: 1958-67.
3. Stenzel I, Ischebeck T, König S, Holubowska A, Sporysz M, Hause B, Heilmann I (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 20: 124-141
4. Mosblech A, König S, Stenzel I, Grzeganeck P, Feussner I, Heilmann I

- (2008) Phosphoinositide and inositolpolyphosphate-signaling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Molecular Plant* 1: 249-261
5. König S, Hoffmann M, Mosblech A, Heilmann I (2008) Determination of content and fatty acid composition of unlabeled phosphoinositide species by thin-layer-chromatography and gas-chromatography. *Anal Biochem* 378: 197-201
 6. Löpfke C, Ischebeck T, König S, Freitag S, Heilmann I (2008) Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by PI-synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 413: 115-124

13. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. I. Feußner für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen, für die Anregungen und die Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für die Begutachtung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Ingo Heilmann für das interessante Projekt und die besondere Betreuung. Herzlichen Dank für die Zeit, das Verständnis und die Geduld die einfach immer vorhanden waren, besonders vor Vorträgen. Danke für die innere Ruhe und Ausgeglichenheit bei der Korrektur meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an die ganze AG Heilmann, insbesondere Dr. Irene Stenzel für die Hilfe bei Klonierungen und Till Ischebeck bei molekularbiologischen Fragen und Unterstützung am Mikroskop. Danke für die einzigartige Atmosphäre im Labor.

Alina Mosblech möchte ich besonders für die vielen kleinen Tee- und Eiszeiten danken, für die nette Zimmernachbarschaft auf Tagungen, auch wenn die Dusche nicht immer funktioniert hat. Herzlichen Dank für viele unvergessliche Mittagspausen mit Reis und Erbsen und nicht zuletzt für die Gedankenstriche in meiner Arbeit.

Bei Dr. Cornelia Göbel möchte ich mich bedanken für die freundlichen Hilfen bei allen Fragen rund um die GC.

Danke an die gesamte Abteilung Biochemie der Pflanze für die nette Arbeitsatmosphäre und viele gemeinschaftlichen Veranstaltungen.

Danke an Dr. Ellen Hornung für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Hilfe bei der Formatierung.

Susanne Mesters danke ich für die Pflege der Pflanzen.

Danke an Dr. S. Mongrand und F. Furt für die interessante Zusammenarbeit und den Einblick in die „Lipid-Rafts“.

Folgenden Personen möchte ich für die Bereitstellung der Antiseren danken: Prof. I. Feußner, Prof. C. Gietl, Dr. M. Boutry, Dr. L. Frigerio, Prof. C. Gatz, B. Frode, Dr. A. Vitale und Dr. M. Maeshima.

Mein herzlicher Dank geht besonders an meinen Freund Heinrich, meine Eltern und Schwester für Liebe, Unterstützung und Verständnis.

