

**Identifizierung und Charakterisierung der Hüllproteine
von pflanzlichen COP Vesikeln**

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

vorgelegt von
Ali Movafeghi
aus Tabriz/Iran

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. D.G. Robinson

Korreferent: Prof. H.-W. Heldt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2000

Abkürzungen und Symbole.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das endoplasmatische Retikulum: Anfang des sekretorischen Weges.....	1
1.2 Der Golgiapparat: Zentrum des Transportweges.....	3
1.3 "Coated" Vesikel.....	6
1.3.1 Clathrin-"coated" Vesikel.....	7
1.3.2 COPI Vesikel.....	8
1.3.3 COPII Vesikel.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren.....	17
2.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	17
2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	18
2.1.3.1 Isolierung im kleinen Maßstab (Mini-Präparation).....	18
2.1.3.2 Isolierung im mittleren Maßstab (Midi-Präparation).....	19
2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	20
2.1.5 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	20
2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	21
2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	22
2.1.8 Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten.....	22
2.1.9 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	23
2.1.9.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	23
2.1.9.2 Transformation kompetenter Zellen.....	24
2.1.10 Identifizierung und Sequenzierung von EST-cDNA-Klonen.....	24
2.1.11 Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine und Antikörperherstellung.....	24
2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	26
2.2.1 Versuchsmaterial und Anzucht.....	26
2.2.2 Präparation von Cytosol und mikrosomalen Membranen.....	28
2.2.3 Aufarbeitung cytosolischer Proteine.....	29
2.2.3.1 Ammoniumsulfatfraktionierung.....	29
2.2.3.2 Trennung cytosolischer Proteine durch Gelfiltration.....	31
2.2.3.3 Neomycinfällung.....	31
2.2.4 Aufarbeitung der mikrosomalen Membranen.....	32
2.2.4.1 Trennung mikrosomaler Membranen mit der Gelfiltrationschromatographie.....	32
2.2.4.2 Saccharosedichtegradienten.....	33
2.2.4.3 Proteolytischer Verdau mit Papain.....	34
2.2.4.4 Membranbehandlung mit verschiedenen Reagenzien.....	35
2.2.5 BFA-Behandlung.....	35
2.3 Proteinbestimmung.....	36

2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
2.3.2	Proteinbestimmung nach Peterson	37
2.4	Azocaseintest	38
2.5	Latente Inosin-5-Diphosphatase	39
2.6	Messung der α -Amylaseaktivität.....	40
2.7	Antikörperaufreinigung über eine Protein A-Sepharosesäule	41
2.8	Elektrophoretische Methoden	42
2.8.1	Probenvorbereitung	43
2.8.2	Herstellung der Gele und Elektrophoresebedingungen.....	44
2.8.3	Proteinfärbung der Gele	45
2.8.3.1	Gelfärbung mit Coomassie Blue	45
2.8.3.2	Gelfärbung mit Silber.....	46
2.8.4	Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen.....	47
2.8.5	Western-Blotting	47
2.8.5.1	Elektrophoretischer Proteintransfer	47
2.8.5.2	Immunreaktion	48
2.9	Elektronenmikroskopie	51
2.9.1	Pflanzenmaterial und Anzucht	51
2.9.2	Fixierung von Pflanzengewebe	52
2.9.3	Kryo-Ultramikrotomie.....	53
2.9.4	Immunmarkierung der Gefrierschnitte.....	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Aufklärung der Sequenzen.....	57
3.1.1	Die Sequenz der γ -COP-cDNA und die Klonierungsstrategie.....	57
3.1.2	Die Sequenz der AtSec23-cDNA und die Klonierungsstrategie.....	62
3.2	Lokalisierung von At γ -COP und AtSec23p in den Cytosol- und Membranfraktionen	66
3.3	Charakterisierung von At γ -COP und AtSec23p aus dem Cytosol.....	67
3.3.1	Ammoniumsulfatfällung von At γ -COP und AtSec23p.....	68
3.3.2	At γ -COP und AtSec23p als Bestandteile von Proteinkomplexen.....	70
3.3.3	Neomycinfällung von At γ -COP	71
3.4	Membranassoziation von At γ -COP und AtSec23p.....	72
3.4.1	At γ -COP und AtSec23p als periphere Membranproteine	72
3.4.2	Beeinträchtigung der Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p durch niedrige Temperaturen.....	75
3.4.3	Einfluss von BFA auf die membrangebundenen At γ -COP und AtArf1p	77
3.4.4	Gelfiltrationschromatographie der mikrosomalen Membranen	78
3.4.5	Membrangebundene At γ -COP und AtSec23p in Saccharosedichtegradienten.....	80
3.5	Lokalisierung der COPI-Hüllproteine in Wurzelspitzenzellen.....	84
3.6	Lokalisierung von AtSec21p in Zellen von Erbsenkotyledonen	89

3.7	Elektronenmikroskopischer Nachweis für den Rücktransport von Proteinen aus dem <i>cis</i> -Bereich des GApp	91
4	Diskussion.....	96
4.1	Eigenschaften der löslichen At γ -COP und AtSec23p.....	96
4.2	Physiologische Bedeutung der Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p.....	99
4.2.1	At γ -COP und AtSec23p an Membranen des GApp, des ER und der COP Vesikel.....	100
4.2.2	Verhinderung der Fusion von ER und GApp durch das Coatomer.....	103
4.2.3	COPI Vesikel im <i>cis</i> -Bereich des GApp von Pflanzenzellen.....	105
4.3	COPI Vesikel in Erbsenkotyledonen	108
4.4	Ausblick	110
5	Zusammenfassung.....	112
6	Literaturverzeichnis.....	114
	Anhang.....	I

Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Adaptorkomplex
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BiP	Bindungsprotein
bp	Basenpaare
BP-80	Bindungsprotein von 80 kDa
BSA	Rinderserumalbumin
CCV	Clathrin-"coated" Vesikel
CHC	schwere Ketten des Clathrins
COP	"coat protein"
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
DV	Dense Vesikel
DXE	Asparaginsäure - beliebige Aminosäure - Glutaminsäure
E	Einstein
E64	<i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanido)-Butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	"ER-Golgi intermediate compartment"
EST	"expressed sequence tagged site"
FPLC	"fast protein liquid chromatography"
g	Gramm
GApp	Golgiapparat
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
g_{\max}	maximale Erdbeschleunigung
GMP-PNP	5'-Guanylyl-Imidodiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)

h	Stunde
H/KDEL	Histidin/Lysin - Asparaginsäure - Glutaminsäure - Leucin
H ⁺ -ATPase	Protonen-ATPase
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Hepes	2,4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonsäure
HSP	Hitzeschockprotein
IDPase	Inosin-5-Diphosphatase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KKXX	Lysin - Lysin - zwei beliebige Aminosäuren
KTC	Kalium-Tartrat-Karbonat-Reagenz
l	Liter
LMW	Marker für niedrige Molekularmassen
M	Molar
Mes	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
mM	Millimolar
Mops	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
NADH	Nikotinamiddinkleotid (reduzierte Form)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPIR	Asparagin-Prolin-Isoleucin-Arginin
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	"partially coated reticulum"
PLD	Phospholipase D
PM	Plasmamembran(en)
PM-ATPase	Plasmamembran-H ⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSV	Proteinspeichervakuole(n)
RGP	"reversibly glycosylated protein"
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNARE	SNAP-Rezeptor

TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
v/w	Volumen zu Gewicht
V-ATPase	vakuoläre H ⁺ -ATPase
w/w	Gewicht zu Gewicht

1 Einleitung

Alle eukaryotischen Zellen sind durch Membranen in einzelne Kompartimente unterteilt, die spezifische Aufgaben wahrnehmen. Dabei ist jedes Kompartiment durch zahlreiche Proteine charakterisiert, die für seine Struktur und biochemische Aktivität entscheidend sind. Die Synthese, Sortierung und der korrekte Transport dieser Proteine zu ihren Zielorganellen sind sehr komplexe Vorgänge und müssen genau reguliert werden. Die Aufklärung des biosynthetischen Proteintransports steht seit den sechziger Jahren im Mittelpunkt zahlreicher zellbiologischer Untersuchungen.

Mit Ausnahme der Proteine, die in den Mitochondrien und Plastiden gebildet werden, erfolgt die Proteinsynthese an Ribosomen, die frei im Cytosol oder an Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden vorliegen. Für die Sekretion bestimmte, lysosomale und vakuoläre Proteine sowie residente Proteine des Endomembransystems werden in das ER transportiert und als "sekretorische Proteine" zusammengefasst (Gilmore, 1993; Vitale und Denecke, 1999). Der Transportweg dieser Proteine wird auch als "sekretorischer Transportweg" bezeichnet (Chrispeels, 1991; Gomord und Faye, 1996). Verschiedene transitorische Vesikel verbinden die beteiligten Organellen miteinander und bringen die Proteine zu ihrem Zielkompartiment.

1.1 Das endoplasmatische Retikulum: Anfang des sekretorischen Weges

Das ER liegt als ein komplexes Netzwerk in eukaryotischen Zellen vor. Seine unterschiedlichen Domänen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Proteinausstattung und Funktion (Staehein, 1997). Im Elektronenmikroskop lassen sich glatte Bereiche und von Ribosomen besetzte raue Gebiete, an welchen die Proteinbiosynthese stattfindet, unterscheiden. Da das ER eine wichtige Rolle bei der Biosynthese sekretorischer Proteine und ihrem Eingang ins Membransystem spielt, wird es auch als "Tor zum sekretorischen Weg" bezeichnet (Vitale und Denecke, 1999). Der Transport sekretorischer Proteine mit einer Molekularmasse über 8 kDa in das ER ist mit ihrer Translation gekoppelt und heißt deswegen cotranslational (Rapoport et al., 1996). Die Biosynthese dieser Proteine beginnt zunächst an freien Ribosomen. Durch Bindung einer meist aminoterminalen, hydrophoben Signalsequenz an einen Signalerkennungspartikel (SRP), der wiederum an einen Rezeptor (sogenanntes "docking protein") der Zielmembran bindet, wird der Präprotein-SRP-Komplex zum ER dirigiert (Andrews und Johnson, 1996; Rapoport et al., 1996). Nach der Dissoziation des Komplexes wird die Biosynthese der Proteine fortgesetzt, wobei die noch ungefaltete Polypeptidkette durch eine Pore mit einem Durchmesser von 4-6 nm in das Lumen des ER sekretiert wird (Hamman et al., 1997). Das aminoterminal Signalpeptid löslicher Proteine wird dabei cotranslational durch eine Endopeptidase entfernt (Evans et al., 1986; Walter

und Johnson, 1994). Proteine, die eine kleinere Molekularmasse als 8 kDa haben, werden posttranslational und unabhängig vom SRP in das ER hinein transportiert (Klappa et al., 1994; Panzner et al., 1995). Membranproteine werden entweder aufgrund einer Stopp-Transfer-Sequenz, die die Translokation am carboxyterminalen Bereich der Proteine blockiert, oder mit Hilfe der Signal-Anker-Sequenzen als transmembrane Domänen in der Membran verankert (Spiess, 1995; Wahlberg und Spiess, 1997).

Der Transport, die Sortierung und die Modifikationen sekretorischer Proteine werden ebenfalls durch spezifische Signale in der Sequenz oder der Struktur der entstehenden Polypeptide festgelegt. Bereits im Lumen des ER erfolgen erste Modifikationen wie die Ausbildung von Disulfidbrücken, die N-Glykosylierung, Faltung und Oligomerisierung unter der Mitwirkung der molekularen Chaperone. Den Chaperonen wird die Funktion einer Qualitätskontrolle im ER zugeschrieben (Hammons und Helenius, 1995; Kopito, 1997). Sie erleichtern und steuern die Faltung und Oligomerisierung der Polypeptide und verhindern den Weitertransport fehlerhaft gefalteter Proteine (Hartl, 1996; Ellis und Hartl, 1999). Zu den bekanntesten Vertretern der löslichen Chaperone im ER zählen das **Bindungsprotein** (BiP), Calreticulin und die **Proteindisulfidisomerase** (PDI) (Denecke, 1996; Galili et al., 1998). Molekulare Chaperone können auch als membrangebundene Proteine vorkommen. Das beste Beispiel dafür ist Calnexin, dem eine wichtige Funktion an der Faltung der Glykoproteine in Zusammenarbeit mit BiP und Calreticulin zugeschrieben wird (Tatu und Helenius, 1997; Molinari und Helenius, 2000).

Der nächste Schritt im sekretorischen Weg ist der Proteintransport vom ER zum **Golgi-Apparat** (GApp), der von speziellen COPII Vesikeln ermöglicht wird (siehe Kap. 1.3.3). Dabei müssen Proteine, die ihre Funktion im ER erfüllen, in diesem Kompartiment zurück gehalten werden. Das kann prinzipiell sowohl durch eine Verhinderung des Austritts aus dem ER als auch durch einen selektiven Rücktransport erklärt werden (Gomord et. al., 1999; Pagny et al., 1999, 2000). Trotz der Unstimmigkeiten über den selektiven Export aus dem ER (siehe Kap. 1.3.3), wird für ER-residente lösliche Proteine im Allgemeinen ein selektiver Rücktransport aus dem GApp angenommen (Teasdale und Jackson, 1996; Gomord et. al., 1999). Zu diesem Zweck besitzen lösliche ER-residente Proteine in der Regel ein carboxyterminales Tetrapeptid (Denecke et al., 1992), die sogenannte KDEL- (in Säuger- und Pflanzenzellen; Munro und Pelham, 1987) oder HDEL-Sequenz (in Hefen- und Pflanzenzellen; Pelham, 1988), das als Retentionssignal fungiert. Am *cis*-Golgi wird diese Sequenz von einem Rezeptor gebunden, der mit seinem Liganden zum ER zurückgebracht wird (Lewis und Pelham, 1990; Griffiths et al., 1994). Residente ER-Membranproteine in Hefe und Säugetieren besitzen ebenfalls spezifische Signale wie das di-Lysin-Motiv (**KKXX** oder **KXKXX**), das deren Rücktransport zum ER vermittelt (Jackson et al., 1993; Townsley und Pelham, 1994). Da dieses Motiv auch in der Ω -3 Desaturase von Arabidopsis nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das di-Lysin-Motiv in eukaryotischen Zellen konserviert ist (Arondel et al., 1992). An dem selektiven Rücktransport der

löslichen und membrangebundenen Proteine zum ER sind COPI Vesikel beteiligt, deren Hülle anders als die der COPII Vesikel aufgebaut ist (siehe Kap. 1.3.2).

1.2 Der Golgiapparat: Zentrum des Transportweges

Der GApp nimmt eine zentrale Position im sekretorischen Transportweg ein (Rothman, 1994; Hawes und Satiat-Jeunemaitre, 1996). In tierischen Zellen besteht der GApp aus einem Komplex von miteinander verbundenen Zisternenstapeln und ist oft in der Nähe des Zellkerns zu finden (Rambourg und Clermont, 1997; Farquhar und Palade, 1998). Dagegen ist der GApp in Pflanzenzellen als Gesamtheit aller Dictyosomen im ganzen Cytoplasma verteilt (Robinson, 1985; Staehelin und Moore, 1995; Andreeva et al., 1998). Pflanzliche Zellen können sehr große Mengen von Golgistapeln pro Zelle enthalten (z. B. 300-600 in Maiswurzelspitzen) (Mollenhauer und Morr , 1994; Hawes und Satiat-Jeunemaitre, 1996; Driouich und Staehelin, 1997). Jedes Dictyosom besteht aus einem Stapel Zisternen, an deren Rändern kleinere Vesikel abknospen. Die Zahl der Zisternen pro Golgistapel liegt meist zwischen 5 und 7, kann in einigen Algen jedoch wesentlich höhere Werte erreichen (Becker und Melkonian, 1996). Diese Zahl variiert ebenso wie die Anzahl der Dictyosomen einer Zelle in Zusammenhang mit den physiologischen Bedingungen, dem Entwicklungsstadium und der Funktion der Zelle (Andreeva et al., 1998).

Im Golgistapel werden *cis*-, median- und *trans*-Bereich unterschieden, welchen verschiedene Funktionen zugeordnet werden (Rothman und Orci, 1992; Mollenhauer und Morr , 1994). Am *cis*-Bereich sind die Lumen der Zisternen weit und der Abstand zwischen ihnen ist gering. Im Gegensatz dazu haben die Zisternen am *trans*-Bereich ein schmales Lumen und weisen einen größeren Abstand voneinander auf (Robinson und Kristen, 1982). Zwischen den Zisternen sind gelegentlich sogenannte interzisternale Filamente zu erkennen, deren Dichte vom *cis*-Bereich zum *trans*-Bereich zunimmt. Sie dienen der zusätzlichen Verankerung integraler Membranproteine und halten die Zisternen eines Golgistapels zusammen (Cluett und Brown, 1992; Staehelin und Moore, 1995). Dem *trans*-Bereich benachbart befindet sich ein tubuläres, verzweigtes Membransystem, auf dem im Elektronenmikroskop Clathrin-Gitter erkennbar sind. Es wird in tierischen Zellen *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) (Griffiths und Simons, 1986) und in Pflanzenzellen "partially coated reticulum" (PCR) (Pesacreta und Lucas, 1984, 1985) genannt. Das PCR der Pflanzen ist vermutlich dem TGN in tierischen Zellen analog (Hillmer et al., 1988). In tierischen Zellen wurde auch ein "ER-Golgi intermediate compartment" (ERGIC) nachgewiesen (Schweitzer und Hauri, 1992; Pelham, 1995), das oft mit der *cis*-Zisterne assoziiert und wahrscheinlich dem *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) äquivalent ist (Teasdale und Jackson, 1996). Dieses Kompartiment zeichnet sich durch ein Protein von 53 kDa (ERGIC-53) aus (Farquhar und Hauri, 1997). Die Existenz von ERGIC oder eines Äquivalents von ERGIC-53 konnte in Pflanzenzellen bislang nicht nachgewiesen werden.

Wichtigste Funktionen des GApp sind die Sortierung und Glykosylierung von Proteinen. N-verknüpfte Oligosaccharide von im ER entstandenen Glykoproteinen werden beim Transport durch den GApp unter der Mitwirkung von Glykosidasen und Glykosyl-Transferasen stufenweise modifiziert (Colley, 1997; Füllekrug und Nilsson 1998). Während die ersten Reaktionen im GApp der tierischen und pflanzlichen Zellen gleich sind, werden durch weitere Reaktionen organismusspezifische N-gebundene Oligoglykane aufgebaut. Bei Pflanzen enthalten diese Moleküle keine Sialinsäure als terminale Reste, sondern α -1,4-Fucose und β -1,3-Galactose. Außerdem haben sie einen hohen Gehalt an immunogener α -1,3-Fucose und/oder β -1,2-Xylose (Lerouge et al., 1998; Rayon et al., 1998). Da die entstehenden Moleküle stärker als ihre Vorläufer verzweigt sind und zusätzliche Zuckerreste enthalten, werden sie komplexe Glykoproteine genannt (Sturm et al., 1987). Außer der Fortsetzung der N-Glykosylierung findet im GApp die ganze O-Glykosylierung statt. Dabei werden Zuckerreste einzeln - nicht *en bloc* wie im ER - auf Serin- und Tyrosinreste (bei Pflanzenzellen zusätzlich auf Hydroxyprolinreste) übertragen (Driouich und Staehelin, 1997). Die entstehenden Oligoglykane sind vermutlich weniger verzweigt als die komplexen Oligoglykane und bestehen vorwiegend aus Arabinose und Galactose (Staehelin und Moore, 1995). Eine weitere Funktion des GApp in Pflanzenzellen ist die Synthese der Zellwandpolysaccharide (mit Ausnahme von Zellulose). Daher enthält der GApp in Pflanzen eine größere Menge von Glykosyl-Transferasen (Driouich und Staehelin, 1997; Robinson und Hinz, 1999). Obwohl die an der Herstellung der Zellwandpolysaccharide beteiligten Enzyme teilweise identifiziert und charakterisiert worden sind, konnte bisher keines von ihnen aus Pflanzen isoliert und gereinigt werden (Hanna et al., 1991; Bruyant-Vannier et al., 1996; Baydoun und Brett, 1997).

Für den Transport zwischen *cis*- und *trans*-Bereich eines Dictyosomes werden zwei Modelle diskutiert. Nach dem klassischen Reifungsmodell, das vor allem aufgrund von Beobachtungen an Algen entwickelt wurde (Morré, 1987; Melkonian et al., 1991), entstehen im *cis*-Bereich neue Zisternen durch Fusion transitorischer Vesikel, die vom ER stammen (Mollenhauer und Morré, 1991). Jede einzelne Zisterne unterliegt einem Reifungsprozess und gelangt im Laufe ihrer Entwicklung zum *trans*-GApp, wo sie sich vom Stapel ablöst. Während dieses Durchwanderns wird transportiertes Material gemäß der Position im Stapel modifiziert. Im Gegensatz zu diesem Modell wird nach dem "vesicle shuttle"-Modell sowohl der anterograde als auch der retrograde intra-Golgi-Transport von Vesikeln ohne Clathrin-Hülle vermittelt (Farquhar und Palade, 1981; Balch et al., 1984; Orci et al., 1989). Dieses Modell konnte mit der Entdeckung der COPI Vesikel in Säugetieren (Orci et al., 1986; Malhotra et al., 1989) und Hefe (Hosobuchi et al., 1992; Duden et al., 1994) und der Aufklärung ihrer Funktion am intra-Golgi-Transport und am Transport vom GApp zum ER weiter unterstützt werden (Rothman und Wieland, 1996; Orci et al., 1998; Nickel und Brüger, 1999). Die Zisternenreifung wurde aber auch von neueren Untersuchungen bestätigt (Becker et al., 1995; Glick et al., 1997; Bonfanti et al., 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass

bestimmte Makromoleküle (wie Schuppenplatten von Algen, Prokollagen und Kaseinaggregate) wegen ihrer Größe in den kleinen COPI Vesikeln nicht vorkommen können. Aus diesen Gründen gehen viele Arbeitsgruppen davon aus, dass beide Mechanismen zusammenwirken, wobei parallel zur Reifung der Zisternen der anterograde und der retrograde Transport durch COPI Vesikel stattfinden sollen (Bannykh und Balch, 1997; Gaynor und Emr, 1997; Mironov et al., 1997). An dem anterograden und dem retrograden Vesikeltransport sind zwei unterschiedliche Populationen von COPI Vesikeln beteiligt (Orci et al., 1997). Diese Populationen werden als COPI-a und COPI-r (von anterograd und retrograd) bezeichnet und können auf der Basis ihrer Frachtmoleküle voneinander unterschieden werden (Lowe und Kreis, 1998).

Das TGN stellt die zentrale Sortierungsstelle für lysosomale, vakuoläre, zu sezernierende und Plasmamembranproteine dar (Griffiths und Simons, 1986; Rothman und Orci, 1992; Traub und Kornfeld, 1997). Lösliche Proteine, die keine besonderen Signale aufweisen, gelangen von dort zur Zelloberfläche. Dieser Transportweg wird als "default pathway" bezeichnet (Pfeffer und Rothman, 1987; Denecke et al., 1990). Im Gegensatz dazu werden Proteine, die für das lytische Kompartiment bestimmt sind, aufgrund eines spezifischen Signals am TGN in Vesikel mit einer clathrinhaltigen Hülle (Clathrin-"coated" Vesikel = CCV) sortiert (siehe Kap. 1.3.1). In Säugetierzellen fungieren Mannose-6-Phosphat-Reste bei einem Großteil lysosomaler saurer Hydrolasen als Sortierungssignal. Diese werden von einem integralen Membranprotein am TGN dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) gebunden (Kornfeld, 1992; Braulke, 1996). Mannose-6-Phosphat-Reste spielen bei der Zielsteuerung zur lytischen Vakuole in Pflanzen dagegen keine Rolle. Die Sortierung der vakuolären Proteine in Pflanzenzellen erfolgt entweder durch dreidimensionale Muster in der gefalteten Polypeptidkette ("signal patches") oder aufgrund bestimmter Aminosäuresequenzen an aminoterminalen oder carboxyterminalen Propeptiden sowie im Mittelbereich der reifen Proteine (Chrispeels, 1991; Neuhaus, 1996; Neuhaus und Rogers, 1998; Matsuoka and Neuhaus; 1999). Eine Consensus-Sequenz scheinen einige aminoterminalen Sortierungssignale in Form einer NPIR-Sequenz aufzuweisen. Diese Sequenz bindet mit hoher Affinität an ein integrales Membranprotein mit einer Molekularmasse von 80 kDa (BP-80) aus CCVs. Dieses Protein wurde zuerst aus Erbsenkotyledonen isoliert und ist wahrscheinlich der Sortierungsrezeptor für pflanzliche, vakuoläre Hydrolasen (Kirsch et al., 1994, 1996). Homologe zu BP-80, die wahrscheinlich die gleiche Rolle bei der Proteinsortierung spielen, wurden jetzt auch in anderen Pflanzen identifiziert (Paris und Rogers, 1996; Ahmed et al., 1997; Paris et al., 1997; Shimada et al., 1997; Jiang und Rogers, 1999; Miller et al., 1999). Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass BP-80 nicht nur die aminoterminalen NPIR-Sequenz sondern auch carboxyterminale Motive anderer Liganden bindet (Cao et al., 2000). Der MPR der Säugetiere bindet über ein tyrosinhaltiges Motiv in der cytoplasmatischen Domäne an die Proteinhülle der CCVs. Dieses Motiv konnte in BP-80 ebenfalls nachgewiesen werden. Weiterhin bindet das BP-80 an Untereinheiten der Proteinhülle der CCVs aus Säugetieren (Sanderfoot et al.,

1998). Deshalb scheint die Zielsteuerung von vakuolären Proteinen in Pflanzenzellen und lysosomalen Hydrolasen in Säugetieren trotz vieler Unterschiede, grundlegend ähnlich zu sein.

1.3 "Coated" Vesikel

Viele charakterisierte Transportvesikel besitzen eine Proteinhülle auf ihrer Oberfläche und werden als sogenannte "coated" Vesikel bezeichnet (Robinson et al., 1998). Nach Untersuchungen in Hefe und Säugetieren werden sie in zwei Hauptklassen unterteilt. Zu der ersten Klasse gehören vier Typen von Vesikeln, die gemeinsam als Clathrin-"coated" Vesikel (CCV) definiert werden und deren Proteinhülle aus Clathrin und Adaptorkomplexen aufgebaut wird. Die zweite Klasse umfasst die COP Vesikel. Zwei Arten von COP Vesikeln (COPI und COPII Vesikel) sind in Hefe und Säugetieren identifiziert worden. Sie wurden aber bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit in Pflanzenzellen nicht nachgewiesen. Diese Vesikel unterscheiden sich grundlegend in ihrer Größe, ihrem Inhalt und der Struktur ihrer Proteinhülle von den CCVs (Scales et al., 2000). Sowohl bei CCVs als auch bei COP Vesikeln sind die Hüllstrukturen für die Abknospung, die Selektion der Inhaltsproteine und die Regulation einer Fusion mit anderen Membranen von Bedeutung (Schmid und Damke, 1995; Robinson, 1997).

Für die Steuerung der Vesikel zu den richtigen Zielorganellen sind typische, in allen Eukaryoten vorkommende Membranproteine, die sogenannten SNAREs ("**SNAP**-receptor") verantwortlich (Söllner et al., 1993; Weber et al., 1998). Es existiert jeweils ein SNARE-Paar: eines in der Vesikelmembran, das v-SNARE, und eines in der Zielmembran ("**target**"), das t-SNARE. Bei "coated" Vesikeln ist die Wechselwirkung zwischen den SNAREs erst nach Dissoziation der Proteinhülle möglich (Tanigawa et al., 1993; Lowe und Kreis, 1998). Die Funktion der SNAREs wird durch andere Proteine wie Rab-GTPasen (Homologe zu Ypt-GTPasen in Hefe) und myosinähnliche "docking"-Faktoren reguliert (Schimmöller et al., 1998; Pfeffer, 1999). An der Fusion der Vesikel sind auch cytosolische Faktoren wie NSF (N-Ethyl-Maleimide-sensitiver Faktor) und SNAPs ("**s**oluble **N**SF-**a**ttachment **P**roteins") beteiligt (Goda und Pfeffer, 1991; Whiteheart et al., 1992). Die Fusion wird durch die Interaktion des v-SNARE mit dem t-SNARE eingeleitet. Nach der Anlagerung von SNAP und NSF an den SNARE-Komplex erfolgt die Fusion. Nach der Membranfusion führt eine von NSF katalysierte ATP-Hydrolyse zur Freisetzung von SNAPs und NSF vom Komplex und zur Dissoziation des t-SNARE vom v-SNARE (Whiteheart et al., 1994; Pfeffer, 1996; Matveeva und Whiteheart, 1998). Seit Entdeckung der pflanzlichen Homologe von t-SNAREs (Bassham et al., 1995; Conceição et al., 1997; Sanderfoot et al., 1999) und NSF (Hugueney et al., 1995) wird vermutet, dass die Sortierung der Vesikel zum Zielkompartiment und die anschließende Membranfusion der Vesikel mit ihrem Zielkompartiment auch in diesen eukaryotischen Zellen nach dem gleichen Prinzip abläuft (Sanderfoot und Raikhel, 1999).

1.3.1 Clathrin-"coated" Vesikel

CCVs vermitteln in tierischen Zellen die rezeptorgekoppelte Endozytose und den Transport lysosomaler, saurer Hydrolasen aus dem TGN (Robinson, 1994; Schekman und Orci, 1996). In Hefe wurden bislang CCVs *in situ* nicht gesehen, obwohl ihre Beteiligung sowohl an der rezeptorgekoppelten Endozytose als auch an der Sortierung von Proteinen am TGN angenommen wird (Payne et al., 1988; Seeger und Payne, 1992; Chu et al., 1996, 1999; Huang et al., 1997). In Pflanzenzellen sind sie am Transport vakuolärer Proteine (Harley und Beevers, 1989; Hoh et al., 1991; Robinson und Hinz, 1997) und wahrscheinlich auch an endozytotischen Prozessen beteiligt. Hierfür sprechen "clathrin-coated pits" an der **Plasmamembran** (PM), in deren unmittelbarer Nähe CCVs zu finden sind (Hawes et al., 1995; Robinson, 1996).

CCVs, deren Durchmesser meist 70-100 nm beträgt, sind durch ihre charakteristische Hülle gekennzeichnet. Diese Hülle enthält vor allem die in sogenannten Triskelien angeordneten Ketten des Clathrins sowie spezifische Adaptorproteine, die zwischen den Triskelien und der Membran liegen (Robinson, 1996). Das Triskelion ist eine dreibeinige Struktur, wobei jedes Bein aus je einer schweren Kette ("clathrin heavy chain" = CHC) und einer leichten Kette ("clathrin light chain" = CLC) zusammengesetzt ist. Die hochkonservierte CHC ist in Pflanzenzellen (Robinson und Depta, 1988) und in Hefe (Mueller und Branton, 1984) mit 190 kDa um 10 kDa schwerer als die tierischer CCVs. In Rinderhirn wurden zwei CLCs (CLC_a und CLC_b) mit einer Molekularmasse von 36 und 33 kDa identifiziert, die zu 60 % identisch sind. Im Gegensatz zu Säugetieren besitzt Hefe nur eine CLC von 38 kDa, deren Aminosäure-Identität zur Säuger-CLC_a nur 16 % und zur CLC_b 18 % beträgt (Silveira et al., 1990). In Pflanzen werden Proteine von 45 und 52 kDa aus Zucchinihypokotylen und von 40 bis 50 kDa aus Erbsenkotyledonen als CLCs beschrieben (Lin et al., 1992; Demmer et al., 1993). Als mögliche Funktion wird den CLCs eine Beteiligung an der Regulation der Zusammenlagerung (Ungewickell und Ungewickell, 1991; Ybe et al., 1998) und der Dissoziation der Triskelien zugesprochen (Schmid et al., 1984).

Die Bildung von CCVs beginnt mit der Ansammlung von Rezeptor-Liganden-Komplexen in bestimmten Bereichen der Donormembranen. Diese Ansammlung wird durch spezifische **Adaptorkomplexe** (AP-Komplexe) vermittelt (Robinson et al., 1998; Hirst und Robinson 1998). Bisher sind vier verschiedene AP-Komplexe beschrieben worden, die gemäß der Reihenfolge ihrer Entdeckung als AP-1-, AP-2-, AP-3- und AP-4-Komplex bezeichnet werden. Der AP-1-Komplex wurde am TGN und an frühen Endosomen lokalisiert (Ahle et al., 1988; Le Borgne et al., 1996). Der AP-2-Komplex wurde hauptsächlich an der PM, aber auch an Endosomen und Lysosomen gefunden (Pearse und Robinson, 1990; Traub et al., 1996). Kürzlich konnte der AP-3-Komplex am TGN und/oder in einem post-Golgi-Kompartiment identifiziert werden (Simpson et al., 1997; Dell'Angelica, 1997). Dieser AP-Komplex konnte zwar mit Clathrin kolokalisiert werden (Dell'Angelica, 1998), aber es wurde auch ein AP-3 vermittelter, clathrinunabhängiger

Transport beschrieben (Vowels und Payne, 1998). Der zuletzt entdeckte AP-4-Komplex wurde am TGN oder einem diesem nahestehenden Kompartiment nachgewiesen und scheint mit Clathrin nicht assoziiert zu sein (Dell'Angelica et al., 1999; Hirst et al., 1999). In molekularbiologischen Arbeiten wurden cDNA-Klone aus Pflanzen isoliert, deren abgeleitete Proteine Homologien zu Bestandteilen tierischer AP-Komplexe zeigen (Maldonado-Mendoza und Nessler, 1996, 1997; Happel et al., 1997; Roca et al., 1998; Schledzewski et al., 1999). Die AP-Komplexe sind Heterotetramere und binden an die cytoplasmatische Domäne der Rezeptoren. An die Adaptoren (mit Ausnahme von AP-4) lagern sich cytoplasmatische Triskelien an und ermöglichen dadurch die Abknospung von CCVs (Robinson, 1996). Durch die Aktivität einer "uncoating"-ATPase, die eine Dissoziation der Triskelien ermöglicht, verlieren die CCVs kurz nach dem Abschnüren ihre Hüllstruktur und können so mit ihrem Zielkompartiment fusionieren (Ungewickell, 1985; Ungewickell et al., 1995).

1.3.2 COPI Vesikel

COPI Vesikel sind an dem selektiven Transport von Proteinen im Gapp und vom Gapp zum ER beteiligt. Sie wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten Dictyosomen aus "chinese hamster ovary"-Zellen (CHO-Zellen) entdeckt (Orci et al., 1986). In Säugetieren sind sie mit einem Durchmesser von 70-80 nm kleiner als CCVs und ihre Proteinhülle hat eine Dicke von 10 nm. Der Bildungsort der COPI Vesikel befindet sich im Gegensatz zu den CCVs nicht am TGN, sondern an den seitlichen Enden der Zisternen. Obwohl sie überwiegend am *cis*-Bereich der Dictyosomen nachgewiesen werden können, knospen sie von allen Zisternen eines Dictyosomes ab (Oprins et al., 1993; Orci et al., 1997). COPI Vesikel wurden erstmals isoliert, nachdem gereinigte Dictyosomen aus Kaninchenleber mit cytosolischen Proteinen in Gegenwart von GTP γ S - ein nicht hydrolysierbarer Analog von GTP - inkubiert worden waren (Malhotra et al., 1989). In den isolierten Vesikeln wurde Albumin, ein Sekretprotein aus Hepatocyten, nachgewiesen. Dadurch konnte die Beteiligung dieser Vesikel am sekretorischen Transportweg in Säugetieren gezeigt werden. Diese Vesikel und ihre Bestandteile konnten aber bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit in Pflanzen nicht identifiziert werden.

Die Proteinhülle der COPI Vesikel setzt sich aus dem **ADP-Ribosylierungsfaktor** (Arf) und dem Coatomer zusammen. Das Coatomer besteht aus sieben Untereinheiten, die bei Säugetieren als α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - und ζ -COP bezeichnet werden. Sie assoziieren im Cytosol posttranslational in 1-2 h miteinander und bilden das Coatomer (Lowe und Kreis, 1996; Schekman und Orci, 1996). Ihre Homologe in Hefe sind Produkte von bestimmten Sec (von "secretion") und Ret (von "retrieval") Genen (siehe Tabelle 1.1), die alle mit Hilfe der defekten Mutanten an dem Transport zwischen ER und Golgi identifiziert wurden (Harter, 1999). Drei COPs zeigen strukturelle Homologien zu den Adaptinmolekülen der CCVs (β -COP zu β -/ β' -Adaptin, δ -COP zu μ -

Adaptin, und ζ -COP zu δ -Adaptin). Dennoch wurde bisher keine funktionelle Ähnlichkeit zwischen Coatomer und Adaptorkomplexen nachgewiesen (Harter, 1999). Eine andere Homologie zu bestimmten Membranproteinen zeigen α -COP und β' -COP durch WD-40 Sequenzen in ihren aminoterminalen Domänen (Neer et al., 1994). WD-40 Sequenzen bestehen aus 40 Aminosäuren und haben Asparaginsäure und Tryptophan als Motivende. Sie sind sowohl aus der β -Untereinheit der trimeren **GTP-bindenden Proteine** (G-Proteine) als auch aus den Untereinheiten von anderen oligomeren Proteinkomplexen bekannt und haben eine Funktion in der Protein-Protein- oder einer Protein-Membran-Wechselwirkung. Die Funktion der WD-40 Sequenzen beim Coatomer ist jedoch noch nicht geklärt.

Durch Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen und dem Reagenz **Dimethyl Maleic Anhydrid** (DMMA) wurde die Wechselwirkung zwischen Untereinheiten des Coatomers untersucht. Damit konnten ein $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Trimer, ein β/δ -COP Dimer und ein γ/ζ -COP Dimer identifiziert werden (Lowe und Kreis, 1995; Pavel et al., 1998). Mit anderen Methoden wurde außer dem $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Trimer ein weiteres $\beta/\gamma/\zeta$ -COP Trimer nachgewiesen. Dabei ist es nicht klar, wie δ -COP mit beiden Subkomplexen assoziiert (Fiedler et al., 1996). Nach dem Entfernen von Salz oder Einstellung des pH-Wertes auf 6,5 (für DMMA modifizierte COPs) können alle Untereinheiten des Coatomers schnell wieder assoziieren.

Tabelle 1.1: Hüllproteine der COPI Vesikel und ihre Eigenschaften (Lowe und Kreis, 1998; Harter, 1999).

Protein in Säugetieren	Homologe in Hefe	M_r (kDa)	Eigenschaften	bindende Proteine
α -COP	Ret1p	135	repetitive WD-40 Sequenzen	β' -COP, ϵ -COP
β -COP	Sec26p	107	homolog zu β -/ β' -Adaptin	δ -COP, Arf1p
β' -COP	Sec27p	102	repetitive WD-40 Sequenzen	α -COP
γ -COP	Sec21p	98		ζ -COP, Arf1p, p23, KKXX
δ -COP	Ret2p	57	homolog zu μ -Adaptin	β -COP
ϵ -COP	Sec28p	36		α -COP
ζ -COP	Ret3p	21	homolog zu δ -Adaptin	γ -COP
Arf1p	Arf1/2/3p	21	kleine GTPase	β -COP, γ -COP

Die Bildung von COPI Vesikeln wird durch Bindung von Arf1p an die Donormembran eingeleitet (Ostermann et al., 1993; Donaldson und Klausner, 1994). Arf1p ist eine N-myristylierte GTPase und liegt im Cytosol als Arf1p-GDP vor. Durch den Austausch von GDP gegen GTP, der von einem oder mehreren membrangebundenen GDP-GTP-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert wird, bindet Arf1p mit seiner N-myristylierten Domäne an die Membran (Serafini et al., 1991; Kahn et al., 1992). Als spezifische GEFs für Arf1p sind in Hefe Gea1p, Gea2p und Sec7p identifiziert worden (Peyroche et al., 1996). Gea1p und Gea2p zeigen in der Mitte ihrer Struktur bei etwa 200 Aminosäuren Homologie zu einer funktionellen Domäne von Sec7p und sind deshalb gemeinsam als Sec7-Domäne-Familie bekannt. Mit Hilfe dieser Domäne binden sie an Arf1p-GDP und ermöglichen den GDP-GTP-Austausch. Brefeldin A (BFA), ein toxischer Metabolit aus Pilzen, stabilisiert in Hefe den Arf-GDP-Sec7-Domäne-Komplex und hemmt damit die Freisetzung von GDP (Peyroche et al., 1999). Dadurch werden der GDP-GTP-Austausch, die Rekrutierung des Coatomers und infolgedessen die Bildung der COPI Vesikel verhindert (Orci et al., 1991; Donaldson et al., 1992; Helms und Rothman, 1992).

Bei der Rekrutierung des Coatomers wird eine Doppelfunktion für Arf1p postuliert. Einerseits wurde eine direkte Wechselwirkung zwischen Arf1p und β -COP in *in vitro* isolierten Vesikeln nachgewiesen (Zhao et al., 1997). Es wird vermutet, dass diese Bindung von β -COP an das membrangebundene Arf1p die Anlagerung des Coatomers an die Membran ermöglicht. Andererseits wurde gezeigt, dass die Phospholipase D (PLD) in den Golgimembranen von Arf1p-GTP aktiviert wird (Brown et al., 1993). Aktivierte PLD katalysiert die Bildung von Phosphatidinsäure und Cholin aus Phosphatidylcholin und führt zur negativen Ladung bestimmter Regionen der Membran. Das Coatomer kann nun rekrutiert werden, da es an negativ geladene Membrane bindet (Ktistakis et al., 1996). Andere Mitglieder der Arf-Familie spielen bei der Anlagerung der AP-Komplexe an ihre Donormembran eine Rolle. Dabei wird ebenfalls die vergleichbare Funktion der Arf-Proteine bei der Aktivierung der PLD vermutet (Robinson und Kreis, 1992; West et al., 1997).

In der Membran der COPI Vesikel wurden zwei Gruppen von Proteinen entdeckt, die mit ihren cytosolischen, carboxyterminalen Domänen an das Coatomer binden. Die erste Gruppe umfasst Proteine, die ein di-Lysin-Motiv besitzen und als Frachtmoleküle der COPI Vesikel vom Gapp zum ER gebracht werden (siehe Kap. 1.1) (Cosson und Letourneur, 1994; Tisdale et al., 1997). Während durch Experimente mit isolierten Untereinheiten des Coatomers eine Arf1p-unabhängige Wechselwirkung des trimeren $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Komplexes mit di-Lysin-Motiven gezeigt werden konnte (Lowe und Kreis, 1995), konnte bei Bindungsstudien mit dem intakten Coatomer γ -COP als Bindungsprotein für das di-Lysin-Signal identifiziert werden (Harter et al., 1996). Möglicherweise reagiert zuerst die $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Untereinheit mit dem di-Lysin-Motiv und dadurch ändert das Coatomer seine Konformation so, dass γ -COP mit diesem Motiv interagiert. Jedenfalls

wird die Membranassoziation des Coatomers durch die Bindung an das di-Lysin-Motiv stabilisiert (Lowe und Kreis, 1998).

Der zweiten Klasse von Membranproteinen gehören p23 und p24 aus der p24-Familie an, die in COPI Vesikeln im Vergleich zum GApp 20-fach angereichert werden (Stammes et al., 1995; Sohn et al., 1996). Die Mitglieder der p24-Familie sind meist am Transport zwischen ER und GApp beteiligt (Nickel et al., 1997; Blum et al., 1999; Marzioch et al., 1999). Diese Proteine besitzen ein carboxyterminales di-Phenylalanin oder di-Lysin Motiv, die eine Funktion bei der Bindung des Coatomers haben. Das di-Phenylalanin Motiv bindet wie das di-Lysin Motiv an die γ -COP-Untereinheit des nativen Coatomers (siehe Abb. 1.1) (Fiedler et al., 1996; Harter und Wieland, 1998). Der trimeren $\beta/\gamma/\zeta$ -COP Untereinheit des Coatomers kann möglicherweise auch eine Funktion bei der Einleitung dieser Bindung zugeschrieben werden (Lowe und Kreis, 1995, 1998; Harter, 1999). Mit der Bindung des Coatomers an die cytoplasmatische Domäne der p24-Proteine wird die spezifische Polymerisation des Coatomers induziert (Reinhard et al., 1999; Weidler et al., 2000). Es wird vermutet, dass durch diese Polymerisation die Konformation der gebundenen Coatomerkomplexe geändert und die mechanische Kraft für die Membranwölbung erzeugt wird (Bremser et al., 1999; Harter, 1999; Reinhard et al., 1999). Die luminaire Domäne der p24-Proteine hat eine coiled-coil Region, die wahrscheinlich durch die Bindung an Fracht-Moleküle deren Sortierung ermöglicht (Schimmöller et al., 1995; Fiedler et al., 1996). Sowohl gleiche als auch unterschiedliche Proteine der p24-Familie (z. B. p23 und p24 in Säugetieren) assoziieren in dieser Region und bauen einen heterotetrameren Komplex auf (Gommel et al., 1999; Marzioch et al., 1999; Ciuffo und Boyd, 2000). Die Bedeutung dieser Proteine im Proteintransport scheint in den verschiedenen Gruppen der Eukaryoten unterschiedlich zu sein: Während der Verlust der p24-Proteine durch Mutation in Säugetieren letal ist (Denzel et al., 2000), können die entsprechenden Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* weiterleben (Springer et al., 2000). So bleibt die Diskussion um die Notwendigkeit der Funktion der p24-Proteine im sekretorischen Weg verschiedener Eukaryoten weiterhin offen (siehe auch Kap. 1.3.3).

Die Fusion der COPI Vesikel mit ihrer Ziellmembran kann erst nach der Dissoziation der Proteinhülle stattfinden (Lowe und Kreis, 1998; Wieland und Harter, 1999). Die Voraussetzung für diesen Prozeß ist die Hydrolyse des gebundenen GTP von Arf1p unter Beteiligung membrangebundener und cytosolischer Faktoren (Tanigawa et al., 1993; Randazzo und Kahn, 1994; Kahn et al., 1996; Randazzo, 1997). Die GTP-Hydrolyse führt zur Konformationsänderung von Arf1p und zur Freisetzung der Proteinhülle (Kahn und Gilman, 1986; Serafini et al., 1991). Nach der Dissoziation der Proteinhülle liegen Coatomer und Arf1p-GDP im Cytosol zur Bildung der COPI Vesikel vor (Serafini et al., 1991). Durch den Einsatz nicht hydrolysierbarer Analogen von GTP, wie GTP γ S, wird aufgrund der blockierten GTP-Hydrolyse die Dissoziation der Hülle gehemmt (Melançon et al., 1987). So können *in vitro* COPI Vesikel mit einer stabilen Proteinhülle induziert und isoliert werden (Malhotra et al., 1989).

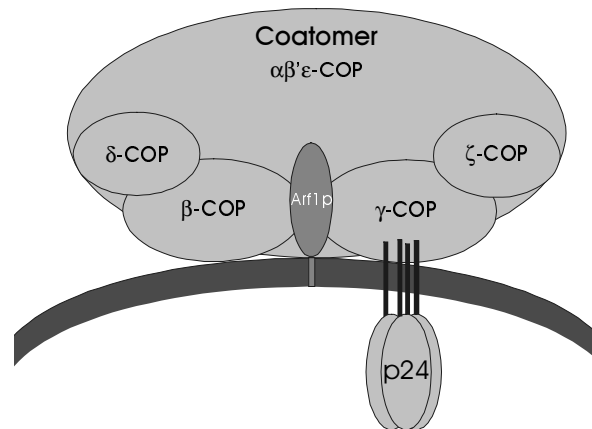


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung vom Aufbau der Proteinhülle der COPI Vesikel nach Wieland und Harter (1999).

1.3.3 COPII Vesikel

COPII Vesikel vermitteln den anterograden Transport vom ER zum GApp. Obwohl sie im Elektronenmikroskop eine ähnliche Struktur wie COPI Vesikel aufweisen, unterscheiden sie sich von diesen in der Zusammensetzung ihrer Hüllproteine sowie der Frachtmoleküle (Barlowe et al., 1994; Scales et al., 1997, 2000). Die Hülle dieser Vesikel ist aus der GTPase Sar1p und zwei heterodimeren Proteinkomplexen, dem Sec23- und dem Sec13-Komplex, aufgebaut. Der Sec23-Komplex mit einer Molekularmasse von 400 kDa besteht aus zwei Untereinheiten Sec24p und Sec23p (Hicke et al., 1992). Der Sec13-Komplex hat eine Molekularmasse von 700 kDa und wird aus Sec13p und Sec31p gebildet (Tabelle 1.2) (Pryer et al., 1993; Salama et al., 1993, 1997). Diese Untereinheiten besitzen wie α -COP und β' -COP repetitive WD-40 Sequenzen, die möglicherweise eine Funktion in der Protein-Protein- oder Protein-Membran-Wechselwirkung haben (siehe Kap. 1.3.2) (Barlowe, 1998). Außer Sar1p, das eine Homologie zu Proteinen der Arf-Familie zeigt, sind keine homologen Proteine zu anderen Bestandteilen der Proteinhülle der COPII Vesikel bekannt. Sar1p ist das einzige Protein der COPII-Hülle, dessen homologes Protein in Pflanzen identifiziert und charakterisiert wurde (Bar-Peled und Raikhel, 1997).

Tabelle 1.2: Hüllproteine von COPII Vesikeln und ihre Eigenschaften (Barlowe, 1995, 1998; Wieland und Harter, 1999)

natives Protein	Untereinheit	M _r (kDa)	Eigenschaften	bindende Proteine
Sec23 Komplex (400 kDa)	Sec23p	85	Sar1p aktivierendes Protein	Bos1p, Bet1p
	Sec24p	105		
Sec13 Komplex (700 kDa)	Sec13p	34	repetitive WD-40 Sequenzen	
	Sec31p	150	repetitive WD-40 Sequenzen	
Sar1p		21	kleine GTPase	Bos1p

Die Bildung der COPII Vesikel beginnt mit der Anlagerung von Sar1p-GTP an die ER-Membran. Sar1p liegt wie Arf1p als GTPase-GDP im Cytosol vor und kann nach dem Austausch von GDP gegen GTP an die Membran binden (Nakano und Muramatsu, 1989). Sec12p, ein integrales Glykoprotein des ER, katalysiert als GEF (siehe Kap. 1.3.2) diese Austauschreaktion (Nakano et al., 1988; d'Enfert et al., 1991; Barlowe und Schekman, 1993). Damit wird die Bindung vom Sec23-Komplex an das membrangebundene Sar1p-GTP eingeleitet. Der Sec13-Komplex bindet erst nach der Anlagerung des Sec23-Komplexes an die ER-Membran. Die Bildung der Proteinhülle der COPII Vesikel an der Donormembran wird als analog zur Zusammenlagerung der AP-Komplexe und des Clathrins bei CCVs betrachtet (siehe Kap. 1.3.1). Dabei wird der Sec23-Komplex mit den AP-Komplexen und der Sec13-Komplex, der zuletzt an die Membran bindet, mit Clathrin verglichen (Barlowe, 1998; Pagano et al., 1999). Zwei weitere Proteine, die eine Funktion bei der *in vivo* Bildung der COPII Vesikel haben, sind Sec16p und Sed4p (Espenshade et al., 1995; Gimeno et al., 1995). Sec16p wurde an der Membran des ER und an COPII Vesikeln nachgewiesen. Es bindet direkt an Sec23p, Sec24p und Sec31p und ermöglicht den Zusammenbau der Proteinhülle (Gimeno et al., 1996; Shaywitz et al., 1997). Sed4p, das eine 45%-ige Aminosäureidentität zu Sec12p besitzt (Gimeno et al., 1995), unterstützt durch direkte Wechselwirkung mit Sec16p dessen Funktion bei der Vesikelbildung (Barlowe, 1998).

Die bekanntesten Vertreter der löslichen Fracht der COPII Vesikel sind die Invertase der Hefe und das Albumin der Säugetiere. Zu den membrangebundenen Frachtmolekülen gehören Gap1p ("general amino acid permease") in Hefe und VSV-G ("vesicular stomatitis virus glycoprotein") in infizierten Säugetierzellen. Der Mechanismus des Frachtexports aus dem ER ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Es konnte in den achtziger Jahren gezeigt werden, dass Proteine, die kein besonderes Signal besitzen, automatisch über transitorische Vesikel vom ER zum GApp ("bulk flow") gelangen (Wieland et al., 1987; Pelham, 1989). Jedoch deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass bei der Bildung der COPII Vesikel die Fracht selektiv aufgenommen wird.

Sekretorische Proteine sowie membrangebundene v-SNARE Proteine (Sec22p, Bos1p und Bet1p) werden in COPII Vesikeln im Vergleich zum ER angereichert (Balch et al., 1994; Rexach et al., 1994; Bednarek et al., 1995; Campbell und Schekman, 1997). Außerdem kommen ER-residente Proteine wie Kar2p (das homologe Protein zu BiP in Hefe), Sec61p und Shr3p in *in vitro* induzierten COPII Vesikeln nicht vor (Rexach et al., 1994; Kuehn et al., 1998). In der cytoplasmatischen Domäne von VSV-G und einer Reihe von Membranproteinen der COPII Vesikel wurde eine DXE-Sequenz entdeckt (Nishimura und Balch, 1997). Ohne diese Sequenz wird VSV-G etwa 80 % langsamer in COPII Vesikel sortiert. Da die DXE-Sequenz selbst keine Rolle bei der Faltung und Oligomerisation der VSV-G Moleküle spielt, hat sie möglicherweise eine direkte Funktion bei der effektiven Proteinsortierung (Nishimura und Balch, 1997). Unabhängig davon wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Sar1p und vom Sec23-Komplex die Voraussetzung für den selektiven Eintritt von membrangebundenen Proteinen wie VSV-G in COPII Vesikel ist (Aridor et al., 1998; Kuehn et al., 1998). Eine Wechselwirkung zwischen VSV-G und dem Sec23 Komplex bzw. Sec23p wurde ebenfalls nachgewiesen (Aridor et al., 1998, 1999). Vergleichbar zu diesen Daten konnte eine Sar1p- und GTP-abhängige Interaktion zwischen Bet1p sowie Bos1p und Sec23p gezeigt werden (Springer und Schekman, 1998). Daher spielt der Sec23-Komplex möglicherweise eine Rolle bei der Sortierung der Frachtmoleküle. Es wurde kürzlich gezeigt, dass Frachtmoleküle *in vivo* und *in vitro* Einfluss auf die Rekrutierung der Proteinhülle und infolgedessen auf die Bildung der COPII Vesikel haben (Aridor et al., 1999). Wenn unter physiologischen Bedingungen die richtige Faltung der Frachtmoleküle verhindert wird, wird VSV-G im ER angesammelt und die Bildung der COPII Vesikel verlangsamt. Das zeigt, dass der Proteinexport aus dem ER mit dessen Funktion - besonders im Hinblick auf die Tätigkeit der molekularen Chaperone - zusammenhängt (Aridor et al., 1999).

Die lösliche Fracht wird vermutlich auch durch eine indirekte Wechselwirkung mit der Proteinhülle selektiert (Kuehn et al., 1998; Wieland und Harter, 1999). Dafür sind integrale Membranproteine, die sowohl eine cytoplasmatische als auch eine luminaire Domäne aufweisen, notwendig, um die Verbindung zwischen der Hülle und den löslichen Frachtmolekülen herzustellen. Die möglichen Kandidaten dafür sind p24-Proteine, die sowohl in COPI Vesikeln als auch in COPII Vesikeln als heterotetramere Membranproteine vorkommen (siehe Kap. 1.3.2). Ihre luminaire Domäne kann theoretisch durch Oligomerisation verschiedener Mitglieder dieser Familie variable Kombinationen für die Bindung der unterschiedlichen, löslichen Frachtmoleküle anbieten (Stamnes et al., 1995; Dominguez et al., 1998; Marzioch et al., 1999). Für die Hefe-Proteine Emp24p und Erv25p, die homolog zu p24 und p23 aus Säugetieren sind, wurde eine Funktion bei der Proteinsortierung in die COPII Vesikel nachgewiesen. Wenn diese Proteine durch Mutationen fehlen, werden einige sekretorische Proteine langsamer aus dem ER zum GApp transportiert (Schimmöller et al., 1995; Belden und Barlowe, 1996) und bestimmte ER-residente Proteine wie Kar2p sekretiert (Springer et al., 2000). Obwohl die Wechselwirkung der

cytoplasmatischen Domänen der p24-Proteine mit dem Sec23-Komplex inzwischen nachgewiesen wurde (Dominguez et al., 1998), konnte die mögliche Interaktion zwischen ihrer luminalen Domäne und der löslichen Fracht bisher nicht gezeigt werden. Aufgrund ihrer Rolle bei der Exportverhinderung der ER-residenten Proteine, wird für sie eine negative Steuerung des Proteintransports angenommen (Elrod-Erickson und Kaiser, 1996; Springer et al., 2000). Dabei scheinen sie an die COPII-Hülle zu binden und dadurch indirekt als Platzhalter den Eintritt der anderen Proteine in die COPII Vesikel zu beschränken (Springer et al., 2000).

Da die v-SNARE-Proteine von der COPII-Hülle bedeckt werden (siehe Abb. 1.2), können COPII Vesikel wie COPI Vesikel erst nach der Dissoziation der Proteinhülle unter Beteiligung der SNARE-Proteine mit ihrer Zielmembran fusionieren (Schekman und Orci, 1996). Nach dem Abknospen wird die GTPase-Aktivität des Sar1p von dem in der Hülle enthaltenen Sec23p stimuliert (Yoshihisa et al., 1993). Daher sind im Gegensatz zu den COPI Vesikeln keine cytosolischen Proteine zum Ablösen der Proteinhülle von den COPII Vesikeln notwendig (Barlowe et al., 1994; Aridor et al., 1998). Das Ersetzen von GTP durch GTP γ S oder GMP-PNP bei der *in vitro* Induktion der COPII Vesikel führt aufgrund der Hemmung der GTP-Hydrolyse zur Ansammlung von Vesikeln mit stabiler Proteinhülle, deren Eigenschaften weiter untersucht werden können (Barlowe et al., 1994; Oka und Nakano, 1994).

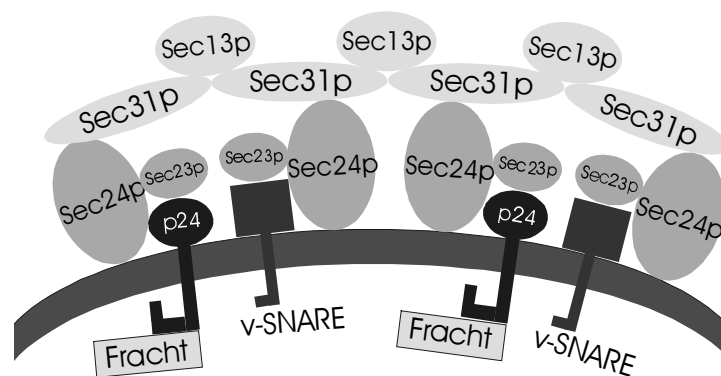


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur der Proteinhülle der COPII Vesikel nach Schekman und Orci (1996).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine Hinweise auf die Existenz von COP Vesikeln in Pflanzenzellen, obwohl ihre Beteiligung am Proteintransport in Pflanzen- wie in Hefe- und Säugetierzellen angenommen wurde. Der erste Schritt bei den Untersuchungen des Transportweges zwischen ER und GApp in Pflanzenzellen war daher die Identifizierung und Charakterisierung dieser Vesikel sowie der Bestandteile ihrer Proteinhülle. Mit molekularbiologischen Methoden sollten zwei rekombinante Proteine gewonnen werden, die Homologien zu Hüllproteinen von COPI und COPII Vesikeln von Hefe und Säugetieren aufweisen. Gegen diese Proteine sollten Antikörper gerichtet werden, mit deren Hilfe durch biochemische Methoden die Hüllproteine der pflanzlichen COP Vesikel identifiziert und charakterisiert werden. Als Schwerpunkt wurde dabei die Untersuchung der Eigenschaften der löslichen bzw. membrangebundenen Proteine und ihrer Funktion im sekretorischen Transportweg in Pflanzenzellen festgelegt. Durch Immunmarkierungen und Elektronenmikroskopie sollten pflanzliche COP Vesikel und ihre Frachtmoleküle *in situ* lokalisiert werden, um neue Erkenntnisse über das Proteinrecycling zwischen ER und GApp in Pflanzenzellen zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Stämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet:

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
BL-21	<i>hsdS gal</i> (λ <i>cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	Studier und Moffatt, 1986

pGEX-4T-3 (Pharmacia, Freiburg, BRD), der ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, wurde als Expressionsvektor benutzt. Mittels der pGEX-Vektoren werden Fusionsproteine hergestellt, die **G**lutathion-**S**-Transferase (GST) in ihrer Struktur enthalten. Mit Hilfe von GST können diese Fusionsproteine durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden (Smith und Johnson, 1988).

2.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Lösungen:

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml Ampicillin
in H₂O bidest., sterilfiltriert

Luria-Bertani-Medium:
(LB-Medium) 10 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l Trypton in H₂O bidest.
pH 7,0 mit NaOH eingestellt und autoklaviert

LB_{Amp}-Medium: 100 μ g/ml Ampicillin
in LB-Medium
Ampicillin wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C
gegebenenfalls zugesetzt. Zum Gießen von Agarplatten wurde 1 %
(w/v) Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die *E. coli*-Flüssigkulturen bei 37 °C und 220 Upm auf einem Schüttelinkubator angezogen. Auf Agarplatten ausgestrichen, wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Um die *E. coli*-Zellen für längere Zeit aufbewahren zu können, wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt, wobei 1 ml Flüssigkultur mit 0,5 ml 98%-igen (v/v) Glycerin vermischt und bei –80 °C gelagert wurde.

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Sämtliche hier aufgeführten Verfahren zur Aufreinigung von Plasmid-DNA basieren auf dem Prinzip einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen in Gegenwart von SDS (Sambrook et al., 1989), bei der die bakterielle genomische DNA sowie die Proteine denaturiert werden und somit durch Zentrifugation entfernt werden können. Auf die alkalische Lyse folgt dann eine Isopropanol-Fällung der Plasmid-DNA aus dem verbleibenden Überstand.

2.1.3.1 Isolierung im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Diese Aufreinigungsmethode wurde zur Isolierung von kleineren Mengen DNA (bis zu 5 µg/ml Kultur) für analytische Zwecke verwendet.

Lösungen:

Lösung A: 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 50 mM Glucose
 10 mM EDTA, pH 8,0

Lösung B: 200 mM NaOH
 1 % (w/v) SDS

Lösung C: 60 ml 5 M Kaliumacetat
 11,5 ml Eisessig
 28,5 ml steriles H₂O bidest.

Resuspendierungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 % (v/v) DNase-freie RNase (Boehringer Mannheim)

1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden für 30 s bei 20.800 g_{max} (Eppendorf 5417C) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment in 100 μ l Lösung A resuspendiert. Nun erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 200 μ l Lösung B, mehrmaliges Invertieren und 5-minütige Inkubation auf Eis. Die Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zugabe von 150 μ l eiskalter Lösung C und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis ausgefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 20.800 g_{max} und 4 °C (Eppendorf 5417C) sedimentiert. Danach wurden 400 μ l des Überstandes mit 200 μ l Isopropanol gemischt und für 15 min bei 20.800 g_{max} und 4 °C (Eppendorf 5417C) zentrifugiert. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend 15 min bei RT trocknen gelassen, bevor sie in 20 μ l Resuspendierungspuffer aufgenommen wurde.

2.1.3.2 Isolierung im mittleren Maßstab (Midi-Präparation)

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA in Mengen von 50-100 μ g und für Arbeiten mit hochreiner Plasmid-DNA, z. B. für eine Sequenzierung wurde das "Plasmid-Midi-Kit" (Qiagen, Hilden, BRD) verwendet. Die jeweilige Präparation wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

Lösungen:

Puffer P1:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 10 μ g/ml RNase A in H ₂ O bidest.
Puffer P2:	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS in H ₂ O bidest.
Puffer P3:	3 M Kaliumacetat, pH 5,5 in H ₂ O bidest.
Puffer QBT:	50 mM Mops, pH 7,0 750 mM NaCl 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % Triton X-100 in H ₂ O bidest.

Puffer QC:	50 mM Mops, pH 7,0 750 mM NaCl 15 % Isopropanol in H ₂ O bidest.
Puffer QF:	50 mM Tris/HCl, pH 8,5 1,25 M NaCl 15 % Isopropanol in H ₂ O bidest.
TE:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA in H ₂ O bidest.

Als Ausgangsmenge wurden hierfür 100 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* für 10 min bei 5.000 g_{max} und 4 °C (Sorvall RC-5B, Rotor GS3) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 für 5 min bei RT lysiert. Dem Ansatz wurden anschließend 4 ml Puffer P3 zugesetzt und dabei die Proteine mit anhaftender chromosomaler DNA für 10 min auf Eis gefällt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 30.000 g_{max} und 4 °C (Sorvall RC-5B, Rotor GS3) wurde der Überstand auf eine Qiagen-tip 100 Säule aufgetragen, die vorher mit Puffer QBT äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei 15.000 g_{max} und 4 °C (Eppendorf 5417C) zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, 15 min bei RT getrocknet und schließlich in 50 µl H₂O bidest. oder TE gelöst.

2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in sterilem H₂O bidest. wurde photometrisch durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. Eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 20 µg/ml für Oligonukleotide entspricht dabei einer OD von 1 bei 260 nm. Da aromatische Aminosäuren und Phenol Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren, wurde der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ als Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA gemessen, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte (Sambrook et al., 1989).

2.1.5 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden zum Schneiden von DNA aus zwei Gründen eingesetzt: entweder um definierte Enden zum Klonieren zu erhalten oder um das Vorhandensein von Schnittstellen zu überprüfen. Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Herstellern mit

100 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel für 30 min in einer Ethidiumbromidlösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml inkubiert und danach die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht. Sollten DNA-Fragmente aus einem präparativen Gel isoliert werden, wurde nur längerwelliges UV-Licht (365 nm) verwendet, um eine Beschädigung der DNA-Moleküle zu vermeiden.

Um die Länge der DNA-Fragmente zu bestimmen wurde λ-DNA, die mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Hind* III gespalten worden war (MBI, St. Leon-Rot, BRD), als Längenstandardsatz verwendet. Der Standardsatz enthält 13 Fragmente, die aus 21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564 und 125 bp bestehen.

2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen erfolgte unter der Verwendung des "QiaQuick Gel Extraction Kits" und der mitgelieferten Puffer (Qiagen, Hilden, BRD). Gemäß den Angaben des Herstellers wurden Gelstücke, welche die zu isolierende DNA enthielten, mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten, gewogen und pro 100 mg Gel 300 µl Puffer QG zugesetzt. Durch 10-minütiges Erhitzen bei 50 °C wurden die Gelstücke verflüssigt. Dann wurde ein Drittel der verwendeten Menge von Puffer QG Isopropanol hinzupipetiert und auf die QiaQuick-Säule aufgetragen. Die Säule wurde in ein 2 ml fassendes Reaktionsgefäß gehängt und 1 min bei 14.000 g_{max} (Eppendorf 5417C) zentrifugiert. Die Säule wurde mit 500 µl Puffer QG und danach mit 750 µl Puffer PE auf gleiche Weise gewaschen und einmal 1 min bei 14.000 g_{max} (Eppendorf 5417C) trocken zentrifugiert. Zur Elution wurden 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 oder H₂O bidest. auf die Säule gegeben und für 1 min wie vorher beschrieben zentrifugiert.

2.1.8 Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten

Die Ligation dient der Verknüpfung linearisierter DNA-Fragmente. Die dazu eingesetzte T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von intra- oder intermolekularen Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe eines DNA-Stranges. Die jeweilige Ligation wurde unter Verwendung der T4-Phagen-DNA-Ligase und des Ligasepuffers (GibcoBRL, Eggenstein, BRD) durchgeführt. Ein Unit bezeichnet hier die Menge Enzym, die bei 37 °C in 20 min 1 nmol ³²PPi in (γ/β-³²P)ATP umwandelt.

Ligationsansatz: 0,1-1 µg DNA (Vektor und Fragment)
1 Unit Ligase
2 µl 5-fach konzentrierte Ligase-Puffer (250 mM Tris/HCl, pH 7,6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25 % (w/v) PEG-8000)
mit sterilem H₂O bidest. auf 10 µl aufgefüllt

Das molare Verhältnis von Fragment- und Vektor-DNA betrug im Ligationsansatz 3:1. Die Inkubation erfolgte 4 h bei RT oder 16 h bei 16 °C. Mit der ligierten DNA wurde anschließend einer der unter Kap. 2.1.1 aufgeführten *E. coli*-Stämme transformiert.

2.1.9 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Fähigkeit (Kompetenz) von *E. coli*-Zellen Plasmid-DNA aufzunehmen, lässt sich durch bestimmte Behandlungen erheblich steigern. Eine Möglichkeit ist das Anlegen eines elektrischen Feldes (Elektroporation) (Dower et al., 1988), eine andere die Behandlung mit Calciumchlorid (Cohen et al., 1972). In dieser Arbeit wurden *E. coli*-Zellen mit CaCl₂ vorbehandelt und nachher durch Hitzeschock transformiert.

2.1.9.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Präparation von kompetenten Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1985).

Lösungen:

Waschlösung: 100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM Kaliumacetat
10 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

Lagerungspuffer: 10 mM Mops/NaOH, pH 6,8
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin
frisch angesetzt und sterilfiltriert

200 ml LB-Medium (siehe Kap. 2.1.2) wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen. Die Kultur wurde 15 min in Eiswasser unter Schwenken abgekühlt und dann 15 min bei 5.000 g_{max}, 4 °C (Sorvall RC-5B, Rotor GS3) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml vorgekühlter Waschlösung resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml Lagerungspuffer resuspendiert, in 200 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.1.9.2 Transformation kompetenter Zellen

200 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Vektor-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 1 min bei 42 °C. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gestellt und anschließend mit 500 µl LB-Medium vermischt. Die Zellen wurden nun für 30 min bei 37 °C und 220 Upm auf einem Schüttelinkubator angezogen und durch eine Zentrifugation bei 5.000 g_{max} (Eppendorf 5417C) sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen, das Sediment vorsichtig resuspendiert und auf LB_{Amp}-Platten (siehe Kap. 2.1.2) ausgestrichen.

2.1.10 Identifizierung und Sequenzierung von EST-cDNA-Klonen

Zur Suche von Arabidopsis EST-cDNA-Klonen, die Homologien zu bekannten *SEC21* und *SEC23* von Hefe aufweisen, wurde eine Stichwortsuche in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) via Internet unter der folgenden Adresse durchgeführt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Die cDNA Klone wurden vom "Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University, Columbus, USA)" angefordert und in der Abteilung für Molekulare Genetik des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie (Göttingen) sequenzieren gelassen.

Identische und ähnliche Aminosäuren von Proteinmolekülen wurden per Internet unter der folgenden Adresse bestimmt:

<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/alignment.html>.

2.1.11 Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine und Antikörperherstellung

Die Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte nach Hakes und Dixon (1992).

Lösungen:

IPTG-Stammlösung: 100 mM in H₂O bidest.
sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert

PMSF-Stammlösung: 50 mM in eine 1:1 Mischung
von 2-Propanol p.a. und Ethanol p.a.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):

150 mM NaCl
16 mM Na₂HPO₄
4 mM NaH₂PO₄
pH 7,3 mit NaOH eingestellt

PBS-T: 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM Glutathion

Dialysepuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Zunächst wurde von dem *E. coli*-Klon (Stamm BL-21) mit dem gewünschten Expressionsvektor eine Übernachtskultur in LB_{Amp}-Medium (siehe Kap. 2.1.2) bei 37 °C angezogen. Diese Vorkultur wurde 1:10 im gleichen Medium verdünnt und bei 37 °C wachsen gelassen bis die OD₆₀₀ 0,8 betrug. Die Expression wurde nach Erreichen der optimalen OD₆₀₀ durch Zugabe von IPTG (finale Konzentration: 0,2 mM) induziert und für 3 Stunden bei 28 °C durchgeführt.

Zur schnellen Überprüfung der Expression des Fusionsproteins wurde von der Kultur 1 ml abgenommen, sedimentiert (3 min bei 5.000 g_{max}, Eppendorf 5417C) und in 120 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit 20 µl 10 % (w/v) SDS, 60 µl 4-fach konzentriertem Probenpuffer und 100 µl einfachem Probenpuffer gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die so aufbereitete Probe wurde als Gesamtzelllysat per SDS-PAGE analysiert (siehe Kap. 2.8).

Die restlichen Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 15 min bei 5.000 g_{max} (Sorvall RC 5B, Rotor GS3) im vorgekühlten Rotor geerntet. Die Sedimente wurden in PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei –80 °C gelagert.

Murashige und Skoog-Medium: (MS-Medium)	4,3 g/l MS-Salz (Sigma, Taufkirchen, BRD) 30 g/l Saccharose 0,2 mg/l 2,4-D in H ₂ O bidest., pH 5,7 mit KOH eingestellt Nach dem Autoklavieren wurden sterile MS-Vitamine aus der Stammlösung (Sigma, Taufkirchen, BRD) zugegeben.
Sabourauds Glucose-Medium:	40 g/l Glucose 10 g/l Peptone in H ₂ O bidest., pH 5,5 mit HCl eingestellt

Der Blumenkohl (*Brassica oleracea* L. var *botrytis*) wurde im Gewächshaus im Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkel angezogen. 10-15 cm große Infloreszenzen wurden geerntet, von den Strüngen befreit und frisch aufgearbeitet. Für die Kältebehandlung wurden Blumenkohlpflanzen über Nacht für 14 h bei 4 °C gekühlt und direkt danach homogenisiert.

Für die Herstellung der Arabidopsis-Suspensionskultur wurden Arabidopsis-Samen (*Arabidopsis thaliana*, var *Columbia*) auf MS-Platten, die keine Saccharose und 2,4-D enthielten, gelegt und für 10 Tage bei 24 °C und 16 h Licht wachsen gelassen. Danach wurden die Blätter der kleinen Pflanzen abgetrennt und in kleinen Stücken auf Gamborgs-Platten verteilt. Nachdem die Kalli dreimal (jeweils 3-4 Wochen Wachstumszeit) auf frische Gamborgs-Platten umgesetzt worden waren, wurde jeweils eine kleine Menge Kallus durch ein Haarsieb gestrichen und in 50 ml Gamborgs-Medium gegeben. Die Zellsuspensionen wurden wöchentlich in frisches Gamborgs-Medium eingesetzt. Zum Ernten wurden die Suspensionszellen mit Hilfe eines Papierfaltensfilters vom Medium getrennt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Anzucht von Mais (*Zea mays* L. var *mutin*) wurden Samen über Nacht in Leitungswasser eingeweicht. Dann wurden sie in abgedeckten Anzuchtschalen auf hochreinem Papier (Nette GmbH, Göttingen, BRD) ausgesät und in einer Klimakammer bei 27 °C inkubiert. Die Keimlinge wurden täglich gegossen. 2-3 mm lange Wurzelspitzen von 3-4 Tage alten Keimlingen wurden abgetrennt und aufgearbeitet.

Suspensionskultivierte Tabakzellen (*Nicotiana tabacum* L. **Bright Yellow 2**: BY2) wurden von Dr. Yuji Moriyasu (School of Food and Nutritional Sciences, Shizuoka University, Shizuoka, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im MS-Medium unter keimarmen Bedingungen. Die Zellen wurden regelmäßig alle sieben Tage subkultiviert. Dafür wurden mit jeweils 2 ml Zellsuspension je 100 ml frisches Nährmedium angeimpft. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln auf einem Schüttler bei 27 °C und 120 Upm.

Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* cv Vital Gold) wurden in Sabourauds Glucose-Medium bei 28 °C in einem Wasserbad für 12 h gezüchtet (Campbell, 1988). Sie wurden für 15 min bei 5.000 g_{max} (Sorvall RC 5B, Rotor SLA-1000) sedimentiert, in 200 ml Homogenisationsmedium (siehe Kap. 2.2.2) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit frisch geernteten Zellen.

Schweinehirn wurde auf dem örtlichen Schlachthof von frisch geschlachteten Tieren entnommen, auf Eis ins Labor transportiert und sofort verarbeitet.

2.2.2 Präparation von Cytosol und mikrosomalen Membranen

Um den proteolytischen Abbau gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt.

Lösungen:

HDKE10-Puffer: 40 mM **H**epes/KOH, pH 8,0
 1 mM **D**TT
 10 mM **K**Cl
 3 mM **E**DTA

Homogenisationsmedium: 320 mM Saccharose
 2 µg/ml Aprotinin
 0,5 µg/ml Leupeptin
 1 µg/ml Pepstatin
 0,39 mg/ml o-Phenanthrolin
 1 µg/ml E-64
 in HDKE10 Puffer

Die Proteaseinhibitoren wurden vor der Aufarbeitung frisch aus folgenden Stammlösungen zugesetzt:

Aprotinin: 1 mg/ml in H₂O bidest.
Leupeptin: 1 mg/ml in H₂O bidest.
Pepstatin: 0,7 mg/ml in H₂O bidest.
o-Phenanthrolin: 19,8 mg/ml in Ethanol p.a.
E-64: 10 mg/ml in 50 % (v/v) Ethanol p.a. in H₂O bidest.

Waschlösung: 250 mM Saccharose in HDKE10-Puffer

25 g Blumenkohlinfloreszenzen, Maiswurzeln oder Arabidopsiszellen wurden jeweils in 25 ml Homogenisationsmedium mit Hilfe eines Waring-Blendors durch drei Impulse von je 15 s homogenisiert. Das Rohhomogenat wurde durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden, BRD) und zwei Lagen Mull filtriert und anschließend 20 min bei 18.000 g_{\max} in einem Ausschwingrotor (Sorvall RC 5B, Rotor HB 4) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für eine weitere Stunde bei 100.000 g_{\max} in einer Ultrazentrifuge (Kontron, Centrikon T-1170; Rotor TFT 50.38) zentrifugiert. Dieser Überstand wurde auf eine zuvor mit HDKE10-Puffer äquilibrierten 50 ml großen Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Freiburg, BRD) mit einem Durchmesser von 2,5 cm aufgetragen. Bei einer Flussrate von 2 ml/min wurden die Proteine mit HDKE10-Puffer eluiert (Econo-System FPLC-Anlage, Bio-Rad, München, BRD). Mit Hilfe eines Durchfluss-UV-Monitors konnten die Proteine im Eluat detektiert werden. Der Proteingehalt des Eluats wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Die isolierten cytosolischen Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Das entstandene Membransediment nach der Ultrazentrifugation wurde in 10 ml Waschpuffer aufgenommen und wieder für 1 h bei 100.000 g_{\max} pelletiert. Die mikrosomalen Membranen wurden in 1 ml Waschpuffer mit Hilfe eines Glashomogenisators gut resuspendiert. Nach dem Bradfordtest konnte die Membranfraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Isolierung cytosolischer Proteinen aus Schweinehirn und Hefezellen erfolgte nach der gleichen Methode, wobei jedoch 25 g Versuchsmaterial in 50 ml Homogenisationsmedium homogenisiert wurden. Der Aufbruch der Hefezellen erfolgte in einer Zelmühle (Vibrogen, Bühler, Tübingen, BRD) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch sechs Impulse von je 30 s mit einer jeweiligen Pause von 1 min.

2.2.3 Aufarbeitung cytosolischer Proteine

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, um den proteolytischen Abbau gering zu halten.

2.2.3.1 Ammoniumsulfatfraktionierung

Für diese Aufarbeitung wurde TDKE-Puffer mit höherer KCl-Konzentration verwendet, um die membrangebundenen peripheren Proteine abzulösen und deren Konzentration im Homogenat zu erhöhen.

Lösungen:

TDKE500-Puffer: 25 mM **Tris/HCl**, pH 8,0
 1 mM **DTT**
 500 mM **KCl**
 3 mM **EDTA**

TDKE150-Puffer: 25 mM **Tris/HCl**, pH 7,5
 1 mM **DTT**
 150 mM **KCl**
 3 mM **EDTA**

Homogenisationsmedium: 320 mM Saccharose
 2 µg/ml Aprotinin
 0,5 µg/ml Leupeptin
 1 µg/ml Pepstatin
 0,39 mg/ml o-Phenanthrolin
 1 µg/ml E-64
 in TDKE500-Puffer

25 g Blumenkohlinfloreszenzen wurden in 25 ml Homogenisationsmedium mittels eines Waring-Blendors durch 3 Impulse von je 15 s homogenisiert. Das Rohhomogenat wurde durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden, BRD) und zwei Lagen Mull filtriert und für 20 min bei 18.000 g_{\max} (Sorvall RC 5B, Rotor HB 4) zentrifugiert. Der Überstand wurde für eine weitere Stunde bei 100.000 g_{\max} in einer Ultrazentrifuge (Kontron, Centrikon T-1170; Rotor TFT 50.38) zentrifugiert. Der Proteingehalt des entstandenen Cytosols wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und danach die Proteinkonzentration mit Homogenisationsmedium auf 5 µg/µl verdünnt.

Beim ersten Schritt der Ammoniumsulfatfraktionierung wurden Proteine zunächst durch Zugabe von 20 % (Sättigung) Ammoniumsulfat gefällt. Hierzu wurde über 15 min fein gemörsertes Ammoniumsulfat in kleinen Portionen unter Rühren zugegeben, die Lösung weitere 15 min bei 4 °C gerührt und für 20 min bei 20.000 g_{\max} (Sorvall RC 5B, Rotor HB 4) zentrifugiert. Das erhaltene Proteinpräzipitat wurde in 1 ml TDKE150-Puffer gelöst, auf eine 2 ml große PD-10 Säule (Pharmacia, Freiburg, BRD) aufgetragen und mit TDKE150-Puffer eluiert. Zum Überstand wurde weiteres Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 30 % (Sättigung) zugegeben

und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Insgesamt wurden 7 solche Fällungsschritte durchgeführt, so dass schließlich eine Ammoniumsulfatsättigung von 80 % erreicht wurde. So erhielt man eine Reihe von Proteinfractionen, die mit steigender Konzentration von Ammoniumsulfat in 10 %-Schritten gefällt waren. Die Proteinkonzentration jeder Fraktion wurde nach der Methode von Peterson bestimmt und jeweils 20 µg Protein nach einer TCA-Fällung mit Western-Blotting analysiert. Die proteolytische Aktivität jeder Fraktion wurde mittels des Azocaseintests (siehe Kap. 2.4) bestimmt, um die Verteilung der Proteasen in den Ammoniumsulfatfraktionen zu prüfen.

2.2.3.2 Trennung cytosolischer Proteine durch Gelfiltration

Zur Vorbereitung wurde TDKE150-Puffer durch einen 0,2 µm Millipore-Filter steril filtriert. Die Cytosolfraktion von 25 g Blumenkohlinfloreszenzen wurde wie vorher beschrieben (siehe Kap. 2.2.3.1) isoliert. Nach der Zentrifugation bei 100.000 g_{\max} wurde die Proteinkonzentration mit dem Bradfordtest bestimmt und mit Homogenisationsmedium auf 5 µg/µl eingestellt. Nun wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 40 % (Sättigung) über 20 min zugegeben und die Lösung für weitere 30 min gerührt. Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 20.000 g_{\max} (Sorvall RC 5B, Rotor HB 4) sedimentiert, in 2 ml TDKE150-Puffer gelöst und auf einer zuvor mit TDKE150-Puffer äquilibrierten 80 ml großen Sepharose CL-6B Gelfiltrationssäule (Sigma, Taufkirchen, BRD) mit einem Durchmesser von 1 cm aufgetragen. Cytosolische Proteine wurden bei einer Flussrate von 0,1 ml/min mit TDKE150-Puffer eluiert (Bio-Rad, Econo-System FPLC-Anlage). Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurden die proteinhaltigen Fraktionen (Fraktionen 16-35) identifiziert. Jeweils 100 µl dieser 2 ml großen Fraktionen wurden mit TCA gefällt und mit Western-Blotting analysiert.

Die Säule wurde gründlich mit Elutionspuffer gewaschen und zur Aufbewahrung mit 20 % (v/v) Ethanol in H₂O bidest. äquilibriert.

Als Molekularmassenmarker wurden folgende Proteine mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml in TDKE150-Puffer verwendet:

Thyroglobulin	669 kDa
Apoferritin	443 kDa
β-Amylase	200 kDa
BSA	67 kDa

2.2.3.3 Neomycinfällung

Das Coatomer aus Säugetieren und Hefe kann mit bestimmten aminoglykosidierten Antibiotika wie Neomycin präzipitiert werden (Hudson und Draper, 1997). Um diese Eigenschaft des pflanzlichen Coatomers zu prüfen wurde folgender Versuch durchgeführt.

Resuspendierungspuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM KCl

Die cytosolischen Proteine von Blumenkohlinfloreszenzen wurden wie unter 2.2.3.1 beschrieben aufgereinigt und ihre Konzentration auf 5 µg/µl eingestellt. Durch Zugabe von 40 % Ammoniumsulfat (Sättigung) erfolgte eine Proteinfällung. Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 20.000 g_{max} (Sorvall RC 5B, Rotor HB 4) sedimentiert, in Resuspendierungspuffer gelöst und ihre Konzentration auf 1,5 µg/µl eingestellt. Zu 1,5 ml großen Aliquots wurde Neomycin (Sigma, Taufkirchen, BRD) bis zu einer finalen Konzentration von 0,05, 0,5, 1, 4 und 10 mM zugegeben. Ein Aliquot ohne Neomycin diente als Kontrolle. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 100.000 g_{max} (Beckman TL-100, Rotor TLA 100.3) und einer TCA-Fällung wurden die Überstände mit Western-Blotting analysiert.

2.2.4 Aufarbeitung der mikrosomalen Membranen

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.2.4.1 Trennung mikrosomaler Membranen mit der Gelfiltrationschromatographie

Die Aufreinigung der mikrosomalen Membranen von Blumenkohlinfloreszenzen erfolgte wie bei Kap. 2.2.2 beschrieben, wobei jedoch statt HDKE10-Puffer TDKE10-Puffer verwendet wurde.

Lösungen:

TDKE10-Puffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM DTT
10 mM KCl
3 mM EDTA

Homogenisationsmedium: 320 mM Saccharose und Proteaseinhibitoren (siehe Kap. 2.2.2)
in TDKE10-Puffer

Kalibrierungslösung: 0,5 mg/ml Thyroglobulin
in TDKE10-Puffer

Sättigungslösung: 10 mg/ml L- α -Lecithin (Typ XV-E; Sigma, Taufkirchen, BRD) in TDKE10-Puffer
200 mg L- α -Lecithin wurden bei RT auf einem Schüttler in 20 ml TDKE10-Puffer vorgelöst und anschließend 10-mal in Intervallen von 30 s mit Ultraschall (Branson Ultrasonic, Danbury, CT, USA) bei 200 W behandelt. Die Suspension wurde für 20 min bei 12.000 g_{\max} zentrifugiert und der Überstand zur Absättigung der Säule verwendet.

Frisch aufgereinigte, mikrosomale Membranen wurden in 2 ml TDKE10-Puffer pH 7,0 resuspendiert. Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt und eine Membranfraktion mit einem Proteingehalt von 10 mg auf eine 100 ml große Sephacryl S-1000 Säule (Durchmesser 2 cm) aufgetragen. Die Säule war zuvor mit Thyroglobulin (669 kDa) als Molekularmassenmarker kalibriert, mit 20 ml Sättigungslösung vorgewaschen und mit TDKE10-Puffer pH 7,0 äquilibriert worden. Bei der Elution mit TDKE10-Puffer wurden 3 ml große Fraktionen gesammelt. 200 μ l der proteinhaltigen Fraktionen wurden mit TCA gefällt und später der Analyse durch Western-Blotting unterzogen.

2.2.4.2 Saccharosedichtegradienten

Verschiedene Zellkompartimente lassen sich wegen ihrer unterschiedlichen Schwebedichte durch Dichtegradientenzentrifugation auftrennen. Durch unterschiedliche Auftrennung in An- und Abwesenheit von Magnesium kann geprüft werden, in welchen Kompartimenten bestimmte Proteine vorkommen (Robinson und Hinz, 2000). Daher wurde die Aufarbeitung mikrosomaler Membranen unter zwei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt.

Für Minus-Magnesium-Bedingungen wurden der TDKE10-Puffer (als Grundmedium) und das Homogenisationsmedium aus Kap. 2.2.4.1 verwendet. Als Grundmedium für Plus-Magnesium-Bedingungen wurden in diesen beiden Medien 3 mM EDTA durch 3 mM $MgCl_2$ ersetzt. Für die Gradienten wurden 20 % (w/w) bzw. 55 % (w/w) Saccharose in dem jeweiligen Grundmedium angesetzt.

Mikrosomale Membranen aus 5 g Blumenkohlinfloreszenzen wurden jeweils unter Plus- und Minus-Magnesium-Bedingungen frisch aufgearbeitet und anschließend durch eine einstündige Zentrifugation bei 100.000 g_{\max} (Kontron, Centrikon T-1170; Rotor TST 28.38) auf einem 5 ml großen Saccharosekissen (55 % (w/w) in Grundmedium) gesammelt. Die Membranfraktionen wurden vorsichtig von der Interphase abgenommen, ihr Saccharosegehalt mit Hilfe eines Handrefraktometers (Carl Zeiss, Jena, BRD) bestimmt und durch Zugabe von Grundmedium ein Saccharosegehalt von 15 % (w/w) eingestellt. Diese Fraktionen wurde danach auf 30 ml große

lineare 20-55 % (w/w) Saccharosedichtegradienten aufgetragen, die mittels eines Gradientenmischers aus 20%- und 55%-igen Saccharoselösungen hergestellt worden waren. Nach einer 3-stündigen Zentrifugation in einem Vertikalrotor bei 150.000 g_{\max} (Kontron, Centrikon T-1170; Rotor TV-850) wurden schließlich 1,5 ml große Fraktionen mit einer peristaltischen Pumpe (ISCO, Modell 183) aufgefangen.

Die Saccharosedichte der Einzelfraktionen wurde mit einem Handrefraktometer (Carl Zeiss, Jena, BRD) und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford bestimmt. Die Proteine von 100 μ l jeder Fraktion wurden mit TCA gefällt und die Verteilung der einzelnen Membrankompartimente in den Gradienten mit Western-Blotting analysiert. Zudem wurde durch Messung der latenten Inosin-5-Diphosphatase (siehe Kap. 2.5) die Verteilung des GApp in den Gradienten untersucht.

2.2.4.3 Proteolytischer Verdau mit Papain

Frische mikrosomale Membranen aus Blumenkohlinfloreszenzen wurden in Abwesenheit von Magnesium (siehe Kap. 2.2.4.2) aufgereinigt. Nach der einstündigen Zentrifugation bei 100.000 g_{\max} (Kontron, Centrikon T-1170; Rotor TST 28.38) wurden sie vorsichtig in TDKE10-Puffer (+/- Triton X-100) resuspendiert. Die Proben mit Detergenz enthielten dabei 0,1 % (v/v) Triton. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt und die Proteinkonzentration mit TDKE10-Puffer auf 2 μ g/ μ l eingestellt.

100 μ l große Fraktionen wurden mit 2 μ g Papain (Sigma, Taufkirchen, BRD) in TDKE10-Puffer pH 7,0 (+/- Triton X-100) gemischt und für den Verdau für 5, 15 oder 30 min auf Eis inkubiert. Eine Kontrollfraktion wurde ohne Papain für 30 min auf Eis gestellt. Die Verdaureaktion wurde durch Zugabe von 10 μ g Leupeptin, 50 μ l heißem, 3-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer und 5-minütiges Kochen gestoppt. Die Proteine aus 15 μ l jeder Fraktion wurden durch Western-Blotting analysiert.

3-fach konzentrierter SDS-Probenpuffer:

690 mM Tris/HCl, pH 6,8

6 % (w/v) SDS

48 % (v/v) Glycerin

0,15 % (w/v) Bromphenolblau (Na^+ -Salz)

13,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

2.2.4.4 Membranbehandlung mit verschiedenen Reagenzien

Frisch aufgereinigte mikrosomale Membranen aus Blumenkohlinfloreszenzen (siehe Kap. 2.2.2) wurden nach der einstündigen Zentrifugation bei $100.000 g_{\max}$ in HDKE10-Puffer resuspendiert. Als Referenz wurde ein Teil dieser Fraktion nach dem Bradfordtest für eine spätere Western-Blotting-Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. 9 weitere Membranfraktionen mit einem Proteingehalt von jeweils 5 mg wurden erneut bei $100.000 g_{\max}$ pelletiert und anschließend in je 2,5 ml folgender Lösungen auf Basis des HDKE10-Puffers aufgenommen:

1. Kontrollansatz ohne Zusätze
2. + 0,1 % Triton X-100
3. + 1 % Triton X-100
4. + 0,5 M Harnstoff
5. + 2 M Harnstoff
6. + 0,1 M Na_2CO_3
7. + 0,25 M NaCl
8. + 0,5 M NaCl
9. + 1 M NaCl

Diese Fraktionen wurden für eine Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad geschwenkt und anschließend für eine Stunde bei $100.000 g_{\max}$ zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen, die Sedimente in 2,5 ml resuspendiert und für beide die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford bestimmt. Je $50\ \mu\text{l}$ dieser Proben wurden mit Chloroform/Methanol gefällt (siehe Kap. 2.8.1) und für ein Western-Blotting vorbereitet.

2.2.5 BFA-Behandlung

Um den Effekt von **Brefeldin A** (BFA) auf die Membranbindung der Hüllproteine der COP Vesikel zu zeigen, wurden kultivierte Tabakzellen mit diesem toxischen Metabolit aus Pilzen folgendermaßen behandelt.

Lösungen:

Grundmedium: 40 mM HEPES/KOH, pH 7,4
 1 mM DTT
 10 mM KCl

	3 mM MgCl ₂
Homogenisationsmedium:	320 mM Saccharose und Proteaseinhibitoren (siehe Kap. 2.2.2) im Grundmedium
Saccharoselösung:	20 % (w/w) Saccharose im Grundmedium
BFA-Stammlösung:	5 mg/ml BFA (Sigma, Taufkirchen, BRD) in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Der Versuchsansatz erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben, die jeweils 200 ml vier Tage alte suspensionskultivierte Tabakzellen enthielten. In die 7 Medien wurden 400 µl der BFA-Stammlösung pipettiert (finale Konzentration im Medium 10 µg/ml) und die Zellen wurden in der Klimakammer weiter geschüttelt. Die Zellen eines Mediums wurden als Kontrolle ohne Zugabe von BFA geerntet. Nach 5, 10, 15, 30, 60, 120 und 300 min wurden die mit BFA behandelten Zellen mit Hilfe eines Büchner-Trichters mit einer Saugflasche auf einen Papierfaltenfilter gesaugt. Sie wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Isolierung der Membran- und Cytosolfraktion wurden die gefrorenen Tabakzellen zum Aufbruch in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 10 ml 4 °C kaltes Homogenisationsmedium überführt. Die Rohhomogenate wurden durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden, BRD) und zwei Lagen Mull filtriert und anschließend 15 min bei 5.000 g_{max} in einem Ausschwingrotor (Sorvall RC 5B, Rotor HB 4) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und auf 10 ml Saccharoselösung aufgetragen. Durch eine einstündige Zentrifugation bei 100.000 g_{max} (Kontron, Centrikon T-1170; Rotor TST 28.38) wurden die Membranen sedimentiert und so von den Cytosolfractionen, die auf der Saccharoselösung blieben, getrennt. Sie wurden jeweils in 2 ml Homogenisationsmedium resuspendiert. Der Proteingehalt der beiden Membran- und Cytosolfractionen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. 30 µg Protein von jeder Fraktion wurden mit Chloroform/Methanol gefällt (siehe Kap. 2.8.1) und mit Western-Blotting untersucht.

2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Probe wurde entweder nach Bradford (1976) oder nach Peterson (1977) bestimmt. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde als Schnelltest verwendet, während der Proteintest nach Peterson vorgezogen wurde, wenn es auf die Genauigkeit der Messung ankam.

2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einer quantitativen Bindung von Coomassie G an Argininreste von Polypeptidketten.

Bradford-Reagenz: 70 mg/l Coomassie G (Serva, Heidelberg, BRD)
 5 % (v/v) Ethanol p.a.
 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure in H₂O bidest.

Für den Proteintest wurden 50 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und gut geschüttelt. Innerhalb von 2 min bei RT entwickelte sich ein blauer Farbkomplex, der bei 595 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Kontron, Uvikon 810) quantitativ nachgewiesen werden konnte. Alle Proben wurden gegen einen entsprechenden Blindwert gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve von 0-500 µg BSA/ml H₂O bidest. konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Peterson

Der quantitative Nachweis von Proteinen nach Peterson stellt eine Erweiterung der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) dar und ist genauer und empfindlicher als die Methode von Bradford. Die Grundlage des Verfahrens ist die Bildung eines Biuret-Komplexes aus Cu²⁺-Ionen und Peptidbindungen in alkalischen Lösungen, der das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reduziert, wodurch eine intensive Blaufärbung entsteht.

Lösungen:

0,15 % (w/v) Natriumdesoxycholat (DOC)
72 % (w/w) Trichloressigsäure (TCA)
10 % (w/v) SDS in H₂O bidest.
0,8 M NaOH

Kupfer-Tartrat-Karbonat-Reagenz (KTC):

Lösung 1: 10 g Na₂CO₂ in 40 ml H₂O bidest.
Lösung 2: 0,2 g K₂-Tartrat (C₄H₄K₂O₆) in 50 ml H₂O bidest.
Lösung 1 und Lösung 2 wurden vereinigt und mit H₂O bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

Reagenz A: H₂O, SDS, KTC und NaOH im Verhältnis 4:1:1:1
Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Reagenz B: 16,6 % (v/v) Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz in H₂O bidest.

10 oder 20 µl der Probe wurden mit H₂O bidest. auf 1 ml aufgefüllt und mit 100 µl DOC vermischt. Die Solubilisierung von Membranproteinen wurde nach 10 min bei RT mit 100 µl eiskalter TCA abgestoppt. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 9.000 g_{max} in einer Eppendorffzentrifuge wurden die Proteine sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente bei RT über Kopf getrocknet und in 1 ml Reagenz A resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze mit 250 µl Reagenz B versetzt. Innerhalb von 30 min entwickelte sich ein blauer Farbkomplex, dessen Bildung auf der Biuret-Reaktion beruht. Die Absorptionsmessung wurde bei 750 nm gegen Luft an einem Spektralphotometer (Kontron, Uvikon 810) durchgeführt. Eine Eichkurve wurde mit BSA-Mengen zwischen 0 und 20 µg in H₂O bidest. erstellt.

Zur Berechnung wird ein Wert aus dem niedrigen (n) und ein zweiter aus dem hohen Konzentrationsbereich (h) der Eichkurve entnommen. Die Proteinmenge einer Probe errechnet sich aus:

$$\mu\text{g Protein} = (A_{750} \cdot I)^s$$

$$s = \lg(h/n) : \lg(A_{750}^h / A_{750}^n)$$

$$I = \text{antilg}(\lg h/s - \lg A_{750}^h)$$

A₇₅₀ = Absorption bei 750 nm

h = µg Protein der Probe mit hoher Proteinkonzentration

A₇₅₀^h = deren Absorption bei 750 nm

n = µg Protein einer Probe mit niedriger Proteinkonzentration

A₇₅₀ⁿ = deren Absorption bei 750 nm

2.4 Azocaseintest

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von verschiedenen cytosolischen Fraktionen wurde der Azocaseintest, modifiziert nach Gröne (1986), verwendet. Bei diesem Test wird der Probe als künstliches Proteasesubstrat Azocasein zugesetzt, welches durch Proteolyse

hydrolysiert wird. Die dabei entstehenden farbigen Oligopeptidbruchstücke lassen sich im Gegensatz zu unhydrolysiertem Azocasein nicht mit Perchlorsäure fällen und deshalb im Überstand eines sauren Cytosolpräzipitates photometrisch bestimmen.

Lösungen:

Grundpuffer (KPP): 100 mM **Kaliumphosphatpuffer**, pH 7,5

Substratlösung: 50 mg/ml Azocasein in H₂O bidest.

Fällungsreagenz: 14 % (v/v) HClO₄

200 µl der cytosolischen Fraktionen wurden mit 200 µl KPP und 50 µl Azocaseinlösung versetzt und für 2 h bei 7 °C inkubiert. Als Blindwertansatz wurden 200 µl von einer cytosolischen Fraktion und eine Mischung von 200 µl KPP und 50 µl Azocaseinlösung getrennt im Wasserbad inkubiert und am Ende der Inkubationszeit vereinigt. Durch Zugabe von 500 µl Perchlorsäure wurde die proteolytische Aktivität abgestoppt. Die Ansätze wurden 10 min bei 9.000 g_{max} sedimentiert und anschließend die Extinktion der Überstände bei 340 nm in Quarzküvetten gemessen. Ein Unit (U) Azocaseinaseaktivität wurde nach Hamano (1983) berechnet:

$$1 \text{ U} = 10^{-2} \times \Delta E_{340} : (\text{Zeit (min)} \times \text{mg Protein})$$

2.5 Latente Inosin-5-Diphosphatase

Die latente **Inosin-5-Diphosphatase** (IDPase) wird als ein Markerenzym für den GApp angesehen (Nagahashi und Nagahashi, 1982). Da bei der Reaktion dieses Enzyms Phosphat freigesetzt wird, kann die Messung der IDPase-Aktivität nach der Menge des abgespaltenen Phosphats quantitativ nachgewiesen werden (Chen et al., 1956). Die Aktivität jeder Probe wird mit und ohne Zugabe von 0,2 % (v/v) Triton X-100 gemessen und die Differenz aus beiden Werten gebildet.

IDPase-Lösung: 50 mM Tris/HCl, pH 7,0
2 mM MgCl₂
4 mM Inosin-5-Diphosphat
+/- 0,2 % (v/v) Triton X-100

Farbreagenz: 6 Teile H₂O bidest.
 1 Teil 6 N H₂SO₄
 1 Teil 2,5 % (w/v) Ammoniumheptamolybdat
 1 Teil 10 % (w/v) Ascorbinsäure

50 µl der Probe wurden mit 50 µl der IDPase-Lösung versetzt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl eiskalter 10%-iger (w/w) TCA beendet. Die Ansätze wurden für 1 h bei 4 °C gelagert und anschließend bei 9.000 g_{max} zentrifugiert. Das freigesetzte anorganische Phosphat befand sich im Überstand, von dem je 100 µl für die Phosphatbestimmung eingesetzt wurden. Dazu wurden 900 µl frisches Farbreagenz gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion bei 820 nm wurde gemessen und die Berechnung der Phosphatkonzentration erfolgte über eine Eichkurve, die mit 0-200 nM KH₂PO₄ erstellt wurde.

2.6 Messung der α-Amylaseaktivität

Die Messung der Aktivität der α-Amylase (EC 3.2.1.1) erfolgte in Anlehnung an ein von McCleary und Sheehan (1987) entwickeltes Nachweisverfahren, das mit Hilfe des "Cereal α-amylase assay" der Firma Megazyme (County Wicklow, Irland) durchgeführt wurde. Das zur Messung der α-Amylaseaktivität eingesetzte Substrat p-Nitrophenol-Maltoheptaosid trägt am nicht reduzierenden Ende eine 4,6-O-verknüpfte Benzylidengruppe, so dass seine Hydrolyse durch β-Amylase, Glucoamylase und α-Glucosidase blockiert wird. Nach der Hydrolyse einer α-1,4-glycosidischen Bindung innerhalb des Oligomers durch die α-Amylase wird das entstandene p-Nitrophenyl-Maltosaccharid durch Glucoamylase und α-Glucosidase in Glucose und p-Nitrophenol gespalten, wobei die Konzentration des freigesetzten p-Nitrophenols photometrisch bestimmt wird.

Lösungen:

Extraktionspuffer: 50 mM Maleinsäure
 80 mM NaOH
 50 mM NaCl
 2 mM CaCl₂
 0,05 % (w/v) Natriumazid
 in H₂O bidest., pH 5,2 mit HCl eingestellt

Substratlösung: 54,5 mg p-Nitrophenol-Maltoheptaosid
100 U α -Glucosidase (bei pH 5,2)
100 U Glucoamylase (bei pH 5,2)
in 10 ml H₂O bidest.

Stopplösung: 1 % (w/v) Trizma base in H₂O bidest.

Da α -Amylase von transformierten Tabakpflanzen ins Anzuchtmedium sekretiert wird, wurden für den Enzymtest 30 μ l eines 1:10 mit Extraktionspuffer verdünnten Mediums, in dem die Tabakpflanzen angezogen worden waren, in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Die so vorbereiteten Proben und die Substratlösung wurden in einem Wasserbad bei 40 °C für 5 min erwärmt. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von je 30 μ l der erwärmten Substratlösung zu den vorgewärmten Proben. Nach 30 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von je 150 μ l der Stopplösung abgebrochen. Im Anschluss wurde die Extinktion der Proben mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Als Blindwert diente das 1:10 verdünnte Medium. Die Aktivität der α -Amylase wurde nach der folgenden Gleichung berechnet.

$$\text{Aktivität (Kat/l)} = E_{405} \times V_{\text{Ansatz}} : t \times \epsilon_{\text{p-Nitrophenol}} \times d \times V_{\text{Aliquot}}$$

E_{405} = Extinktion bei 405 nm

V_{Ansatz} = Volumen des gesamten Testansatzes

V_{Aliquot} = Volumen der eingesetzten Probe vor der Verdünnung

t = Reaktionszeit (1800 s)

d = Schichtdicke der Mikrotiterplatte (0,74 cm)

$\epsilon_{\text{p-Nitrophenol}}$ = molarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (17,8 M⁻¹ cm⁻¹)

2.7 Antikörperaufreinigung über eine Protein A-Sepharosesäule

Um Antikörper aus dem Serum anzureichern, konnte die "low salt" Methode angewendet werden, bei der Antikörper aufgrund ihrer hochaffinen Bindungsstellen für Protein A aufgereinigt werden (Ey et al., 1978). Dazu wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von Immunglobulinen über Protein A-Sepharose-Säulen verwendet (Harlow und Lane, 1988).

Lösungen:

Waschlösung: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Elutionspuffer:	100 mM Glycin/HCl, pH 2,9
Titrationlösung:	1 M Tris/HCl, pH 8,0
Dialysepuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl

Die Protein A-Sepharose CL-4B (Sigma, Taufkirchen, BRD) als Säulenmaterial mit einer Bindungskapazität von 20 mg humanen IgG/ml wurde zunächst für 24 h in H₂O bidest. vorgequollen. Die Säule (Durchmesser 1 cm, Säulenvolumen ca. 4 ml) wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen bei einer Geschwindigkeit von 0,33 ml/min mit dem Econo-System der Firma Bio-Rad (München, BRD) gepackt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Jeweils 3 ml Antiserum wurden für 4 h mit Hilfe eines geschlossenen Kreislaufsystems (Pumpe von Desaga GmbH, Heidelberg, BRD) bei einer Flussrate von 0,12 ml/min durch das Säulenmaterial gepumpt. Das nicht gebundene Material wurde aufgefangen und die Säule an das Econo-System angeschlossen. Die Säule wurde mit 20-fachem Säulenvolumen Waschpuffer bei einer Geschwindigkeit von 0,30 ml/min von ungebundenen Proteinen befreit und anschließend bei einer Flussrate von 0,15 ml/min mit dem sauren Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml großen Portionen fraktioniert, wobei in jedem Röhrchen 100 µl der Titrationlösung vorgelegt worden waren, so dass der pH-Wert der Fraktion durch sanftes Schütteln auf den Neutralpunkt eingestellt werden konnte. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm (die optische Dichte 1 entspricht dabei etwa 0,8) identifiziert und vereinigt (meist Fraktionen Nr. 6-8). Die immunglobulinhaltigen Fraktionen wurden über 16 h bei dreimaligem Pufferwechsel gegen 3 l Dialysepuffer dialysiert. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (siehe Kap. 2.3.1) bestimmt und danach die Proteinkonzentration mit Dialysepuffer auf 1 µg/µl verdünnt. Das Dialysat wurde in 200 µl Portionen bei -80 °C eingefroren. Die Säule wurde gründlich mit Elutionspuffer gewaschen bis die optische Dichte unter 0,05 lag und zur Aufbewahrung mit 20 % (v/v) Ethanol in H₂O bidest. gespült.

2.8 Elektrophoretische Methoden

Zur Auftrennung einzelner Proteine nach ihrer Molekularmasse wurde die **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichen Gelen (Laemmli, 1970) verwendet. Dabei werden Proteine mit SDS denaturiert, so dass sie überwiegend entfaltet vorliegen.

Phosphorylase b	94 kDa
BSA	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	20 kDa
Lactalbumin	14 kDa

2.8.2 Herstellung der Gele und Elektrophoresebedingungen

Die verwendeten diskontinuierlichen Polyacrylamidgele setzten sich aus einem 3,75%-igen Sammelgel und einem 10%-igen Trenngel zusammen. Die Herstellung der Gele sowie die Gelelektrophorese erfolgte in einem Biometra-Minigelsystem (Größe des Trenngels $80 \times 60 \times 1$ mm, Größe des Sammelgels $80 \times 20 \times 1$ mm).

Lösungen:

Ammoniumperoxydisulfatlösung (Ammoniumpersulfatlösung):

2,4 % (w/v) Ammoniumpersulfat in H₂O bidest.

Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

Acrylamidlösung:

30 % (w/w) Acrylamid

0,8 % (w/w) N,N'-Methylenbisacrylamid in H₂O bidest.

Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert.

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

0,4 % (w/v) SDS in H₂O bidest.

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

0,4 % (w/v) SDS in H₂O bidest.

Zusammensetzung des Sammelgels (3,75%-ig):

0,8 ml Sammelgelpuffer

0,4 ml Acrylamidlösung

1,83 ml H₂O bidest.

2,63 µl TEMED

133 µl Ammoniumpersulfatlösung als Starter der

Radikalreaktion

Zusammensetzung des Trenngels (10%-ig):

2,27 ml Trenngelpuffer
3,04 ml Acrylamidlösung
3,63 ml H₂O bidest.
4,4 µl TEMED
200 µl Ammoniumpersulfatlösung

Elektrodenpuffer: 0,025 M Tris
0,192 M Glycin
0,1 % (v/v) SDS in H₂O bidest.

Vor Zugabe des Ammoniumpersulfats musste das Polymerisationsgemisch mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast werden, um den die Polymerisierungsreaktion störenden Sauerstoff zu entfernen. Zunächst wurde das Trenngel zügig zwischen die mit Aceton entfetteten Glasscheiben gegossen und mit 2-Propanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach einer Stunde bei RT konnte das 2-Propanol dekantiert und das Sammelgel auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen werden. Die Probentaschen wurden mit einem entsprechenden Kamm geformt. Nach einer weiteren Stunde war das Gel ausgehärtet und gebrauchsfertig.

Die Elektrophoresekammern wurden mit Elektrodenpuffer gefüllt, der Kamm vorsichtig entfernt und die Proben aufgetragen. Sowohl die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel als auch ihre Auftrennung im Trenngel erfolgten bei 20 mA.

2.8.3 Proteinfärbung der Gele

2.8.3.1 Gelfärbung mit Coomassie Blue

Die Proteinfärbung nach Neuhoff et al. (1985) basiert auf einer Färbung der Argininreste von Peptiden mit Coomassie Blue (Serva Blue, G-250). Dazu färbten die Gele für mindestens 6 h in einer Neuhofflösung. Die Hintergrundfärbung wurde dann durch ausgiebiges Waschen mit H₂O so weit wie möglich verringert.

Neuhofflösung: 2 % (w/w) Phosphorsäure
10 % (w/w) Ammoniumsulfat
0,1 % (w/w) Coomassie G
Die Lösung wurde vor Gebrauch mit Methanol p.a. im Verhältnis 4:1 (v/v) gemischt.

2.8.3.2 Gelfärbung mit Silber

Die Silberfärbung von Gelen ist sensitiver als die Coomassie Blue-Färbung. Bei dieser Methode lagern sich Silberionen an Proteine an und werden chemisch reduziert, so dass sich analog zur photochemischen Silberreduktion ein bräunliches Präzipitat dort bildet, wo sich Protein befindet.

Lösungen:

Fixierlösung: 50 % (v/v) Methanol p.a.
12 % (v/v) Essigsäure
0,019 % (v/v) Formaldehyd in H₂O bidest.

Waschlösung 1: 50 % (v/v) Ethanol vergällt in H₂O bidest.

Imprägnierlösung: 0,022 % (w/v) Na₂S₂O₃·5 H₂O in H₂O bidest.

Färbelösung: 0,2 % (w/v) AgNO₃
0,028 % (v/v) Formaldehyd in H₂O bidest.

Reduzierlösung: 6 % (w/v) Na₂CO₃
0,019 % Formaldehyd
4 mg/l Na₂S₂O₃·5 H₂O in H₂O bidest.

Stopplösung: 50 % (v/v) Methanol p.a.
12 % (v/v) Essigsäure in H₂O bidest.

Waschlösung 2: 50 % (v/v) Methanol p.a. in H₂O bidest.

Zur Silberfärbung nach Blum et al. (1987) wurden die Gele mindestens eine Stunde in Fixierlösung aufbewahrt und dreimal für jeweils 20 min mit Waschlösung 1 gewaschen. Nach der

Imprägnierung für 1 min wurden die Gele dreimal für 20 s mit H₂O bidest. gewaschen. Nach der 20-minütigen Färbung, die, um einen möglichst hellen Hintergrund zu erhalten, im Dunkeln stattfand, wurde abermals gründlich mit H₂O bidest. gewaschen. Die nachfolgende Reduktion des Silbers wurde nach 1-10 min in Abhängigkeit von der Intensität der Färbung abgestoppt. Nach mindestens 20-minütigem Aufenthalt in der Stopplösung wurden die Gele für weitere 20 min mit Waschlösung 2 gewaschen und danach für 20 min in H₂O bidest. aufgequollen und zur Dokumentation fotografiert.

2.8.4 Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Die Elution von Proteinen aus Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen wurde mit einem Elektroseparatorssystem (Biotrap, Schleicher & Schüll, Dassel, BRD) durchgeführt. Die Proteinbande mit dem zu eluierenden Protein wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in die dafür vorgesehene Kammer des Systems gegeben. Diese wurde dann in eine mit Elektrophoresepuffer (siehe Kap. 2.8.2) gefüllte Flachbettgelkammer (BlueMarine 200; Serva, Heidelberg, BRD) gelegt. Die Elution fand für 24 h bei 4 °C bei einer Stromstärke von 50 mA statt. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wanderten dabei aus dem Gelstück in Richtung Anode, wo sie in einer von den beiden Spezialfiltern BT1 und BT2 gebildeten Tasche aufgefangen und entnommen werden konnten.

2.8.5 Western-Blotting

Um bestimmte Proteine immunologisch nachzuweisen, wurde die Western-Blotting-Technik benutzt. Unter Western-Blotting versteht man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen (Towbin et al., 1979).

2.8.5.1 Elektrophoretischer Proteintransfer

Der elektrophoretische Transfer wurde entweder in einem Nasskammersystem oder als Schnellblot mit Hilfe eines Halbtrockensystems (Biometra, Göttingen, BRD) durchgeführt.

Lösungen:

Blotpuffer für das Nasskammersystem:

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol p.a. in H₂O bidest.

Blotpuffer für das Halbtrockensystem:

- 25 mM Tris
- 150 mM Glycin
- 10 % (v/v) Methanol p.a. in H₂O bidest.

Färbelösung:

- 0,2 % (w/v) Ponceau S (Sigma, Taufkirchen, BRD)
- 3 % (w/v) TCA in H₂O bidest.

Die Nitrozellulosemembranen (SC 128/0,2 µm; Sartorius, Göttingen, BRD) und Filter (Whatman 3 mm Chromatographiepapier) wurden etwa 30 min vor Gebrauch in Blotpuffer äquilibriert. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Trenngel für das Nasskammersystem luftblasenfrei auf die Membran gelegt, zwischen je 4 Lagen Filterpapier geschichtet und in die mit Puffer gefüllte Blotkammer gestellt. Bei 70 mA wurden die Proteine über Nacht aufgrund ihrer negativen Ladung auf die der Anode zugekehrten Membran übertragen. Für den Halbtrockenblot wurden 5 Lagen Whatmanpapier, Trenngel, Nitrozellulosefolie und weitere 5 Lagen Whatmanpapier ebenfalls luftblasenfrei so übereinander geschichtet, dass das Gel der Kathode zugewandt war. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte über 90 min bei 100 mA pro Minigel. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Proteine direkt auf der Nitrozellulosefolie reversibel mit der Färbelösung sichtbar gemacht (Salinovic und Montelaro, 1989). Aufgrund der Reversibilität stört die Färbung den immunologischen Nachweis nicht. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran für 30 s in der Färbelösung geschwenkt und der Hintergrund durch Spülen in H₂O bidest. entfernt. Die Folie wurde nach der Kontrolle durch schwenken im Waschpuffer (TBS-T) (siehe Kap. 2.8.5.2) entfärbt.

2.8.5.2 Immunreaktion

Bei der Immunreaktion wird das gesuchte Protein mit Hilfe von Antikörpern auf der Nitrozellulosefolie (Blot) sichtbar gemacht.

Lösungen:

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS):

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 0,9 % (w/v) NaCl
- in H₂O bidest.

Waschpuffer (TBS-T): 0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS

Blocklösung: 5 % (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer

Striplösung: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7
100 mM 2-Mercaptoethanol
2 % (w/v) SDS in H₂O bidest.

Verwendete Primärantikörper:

Gegen COP Vesikel gerichtete Antikörper:

- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von *Arabidopsis thaliana* γ -COP (At γ -COP) (Movafeghi et al., 1999) (1:2.000 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von *Arabidopsis thaliana* **Sec23** (AtSec23p) (Movafeghi et al., 1999) (1:2.000 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von *Arabidopsis thaliana* **Arf1** (AtArf1p) (1:2.000 verdünnt) (Pimpl et al., 2000)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von *Arabidopsis thaliana* **Sar1** (AtSar1p) (1:2.000 verdünnt) (Pimpl et al., 2000)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen δ -COP von *Zea mays* (Zm δ -COP) (1:5.000 verdünnt) (Pimpl et al., 2000)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ϵ -COP von *Zea mays* (Zm ϵ -COP) (1:10.000 verdünnt) (Pimpl et al., 2000)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen GST von *Schistosoma Japonicum* (1:5.000 verdünnt) (von Dr. H.D. Schmitt (Abteilung für Molekulare Genetik des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie, Göttingen, BRD) zur Verfügung gestellt)

Gegen sonstige Antigene gerichtete Antikörper:

- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von BiP (als luminales ER-Protein) aus *Nicotiana tabacum* (Denecke et al., 1991) (1:8.000 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein im *trans*-GApp lokalisiertes 40 kDa reversibel glykosyliertes Polypeptid (RGP1) aus *Pisum sativum* (Dhugga et al., 1997) (1:20.000 verdünnt)

- monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die 100 kDa Untereinheit der E1/E2-Typ H^+ -ATPase der Plasmamembran (PM-ATPase) aus Maiskoleoptilen (Fichman et al., 1989; Villalba et al., 1991) (1:1.000 verdünnt)
- monoklonaler Antikörper (B1M6) aus Maus gegen β -Adaptin (Robinson, 1987) (1:500 verdünnt)

Die Primärantikörper wurden jeweils in TBS nach Zusatz von 1 % (w/v) BSA verdünnt. Nach Zugabe von 0,02 % (w/v) Natriumazid konnten sie im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Verwendete Sekundärantikörper:

- Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen IgG (Sigma, Taufkirchen, BRD)(1:10.000 (v/v) in Waschpuffer verdünnt)
- Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus IgG (Sigma, Taufkirchen, BRD) (1:10.000 (v/v) in Waschpuffer verdünnt)

Die Transfer-Membran wurde 1 h in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Bindungskapazitäten der Membran abzusättigen. Nach dreimaligem, 5-minütigem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran für 1 h bei RT in der Primärantikörperlösung bewegt. Anschließend wurde sie dreimal für 10 min gewaschen und der Blot für 1 h in dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen für dreimal 10 min wurde mit Hilfe eines ECL-Kits (Amersham-Buchler, Braunschweig) die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase detektiert. Dieser auf Chemilumineszenz basierende Test ("enhanced chemiluminescence" = ECL) ist sehr empfindlich und daher auch zum Nachweis sehr geringer Proteinmengen geeignet. Der Blot wurde für 1 min in Immunnachweisreagenzien (Mischungsverhältnis 1+1) inkubiert, in Klarsichtfolie eingepackt und in Abhängigkeit von der Stärke des Signals für wenige Sekunden bis zu mehreren Stunden auf einem Fotofilm exponiert (Hyperfilm; Amersham-Buchler, Braunschweig). Der Fotofilm wurde 1 min entwickelt, kurz gewässert, für 1 min fixiert und nochmals gewässert. Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal 5 min in Waschpuffer gespült und nach dem Trocknen im Kühlschrank aufbewahrt.

Sollte der Blot noch für eine weitere Immunreaktion benutzt werden, wurde er für 5 min in Waschpuffer geschwenkt und für 30 min bei 50 °C in einem Schüttelwasserbad mit Striplösung von den Antikörpern befreit. Dann wurde er dreimal für 5 min mit Waschlösung gewaschen und 1 h mit Blocklösung geblockt, bevor er mit einem anderen Primärantikörper inkubiert wurde.

2.9 Elektronenmikroskopie

Einige Antigene sind bei der Immunelektronenmikroskopie auf Kunststoffschnitten schwer nachzuweisen. Dies liegt zum Teil an den verwendeten Harzen. Dieses Problem kann durch die Tokuyasu-Technik vermieden werden (Tokuyasu, 1980, 1986). Hierbei werden die Zellen lediglich nach einer leichten Fixierung und Infiltration mit Saccharose eingefroren und nicht in Kunststoff eingebettet.

2.9.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Murashige und Skoog-Medium (MS-Medium):

4,3 g/l MS-Salz (Sigma, Taufkirchen, BRD)

0,5 g/l myo-Inositol

0,25 g/l Mes

20 g/l Saccharose

in H₂O bidest., pH 5,7 mit KOH eingestellt

Nach dem Autoklavieren wurden sterile MS-Vitamine aus der Stammlösung (Sigma, Taufkirchen, BRD) zugegeben.

40-50 Arabidopsis-Samen (*Arabidopsis thaliana*, var *Columbia*) wurden für 5 min in 5 % (v/v) Na-Hypochlorid-Lösung sterilisiert. Nachdem die Samen dreimal mit autoklaviertem H₂O bidest. gewaschen worden waren, wurden sie für 7 bis 10 Tage in 50 ml Anzuchtmedium auf einem Schüttelinkubator im Licht-Dunkel-Rhythmus von 15 h Licht und 9 h Dunkel bei 120 Upm und 24 °C angezogen.

Maispflanzen (*Zea mays* L. var *mutin*) wurden wie vorher unter Kap. 2.2.1 beschrieben gezüchtet.

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. var *SRI Petit Havanna*), die mit einem Genkonstrukt, das für die Synthese der α -Amylase mit einer am Carboxyterminus angefügten HDEL-Sequenz versehen war, oder mit dem α -Amylasegen transformiert worden waren, wurden von Dr. J. Denecke (Institut für Plant Biotechnologie und Agrikultur der Universität Leeds, Leeds, GB) zur Verfügung gestellt. Die Samen der dritten Generation der transformierten Pflanzen wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendet. Die Samen von der gleichen, aber nicht transformierten, Tabakpflanze (Wildtyp) wurden wie transformierte Pflanzen angezogen. Die Samen wurden für 5 min in 5 % (v/v) Na-Hypochlorid-Lösung sterilisiert und dreimal mit autoklaviertem H₂O bidest. gewaschen. In Zellen einer Mikrotiterplatte wurde jeweils 1 ml MS-Medium pipettiert und die Samen einzeln in Zellen verteilt. So konnte die Aktivität der sekretierten α -Amylase jeder einzelnen Pflanze gemessen werden. Die Anzucht der Pflanzen

erfolgte für 7 bis 10 Tage auf einem Schüttler im Licht-Dunkel-Rhythmus von 15 h Licht und 9 h Dunkel bei 27 °C und 120 Upm.

Erbsenpflanzen (*Pisum sativum* L. var *Haubners Excellenz*) wurden in einem Hydrokultursystem in Klimakammern angezogen. Während der 15-stündigen Lichtperiode betrug die Temperatur 18 °C und die Lichtstrahlung 250-350 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Während der Dunkelperiode war die Temperatur auf 14 °C abgesenkt.

2.9.2 Fixierung von Pflanzengeweben

Lösungen:

Kaliumphosphatpuffer (KPP):	100 mM KH_2PO_4 100 mM K_2HPO_4 gegeneinander auf pH 7,4 titriert
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):	10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4 150 mM NaCl
Glutaraldehyd (GA)-Lösung:	8 % (v/v) GA (Polyscience Inc., Warrington, USA) in PBS
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung:	10 % (w/v) PFA (Polyscience Inc., Warrington, USA) in 100 mM KPP

20 g Paraformaldehyd wurden mit 90 ml H_2O bidest. unter Rühren für 1 h bei 60 °C erwärmt. Danach wurde solange 0,1 M NaOH zugegeben bis die Lösung klar war. Die Lösung wurde anschließend durch einen Celluloseacetatfilter (Porengröße: 0,45 μm) filtriert und mit gleichem Volumen 200 mM KPP aufgefüllt, so dass eine Endkonzentration von 10 % (w/v) Paraformaldehyd in 100 mM KPP eingestellt wurde. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Fixativ:	1,5 % (w/v) PFA 0,2 % (v/v) GA in KPP
-----------------	--

Infiltrationslösung:	2,3 M Saccharose in KPP
-----------------------------	-------------------------

Gelatine: 10 % (w/v) Gelatine (Dr. Oetker, Veenendaal, BRD)
in KPP bei 60 °C gelöst

Von den Arabidopsis-, Tabak- und Mais-Pflanzen wurden 2-3 mm lange Wurzelspitzen abgeschnitten und über Nacht bei 4 °C in Fixativ inkubiert. Reifende Erbsensamen wurden nach dem Ernten von ihrer Samenschale befreit und von der inneren Seite der Kotyledonen (Durchmesser rund 9 mm) wurde eine dünne Scheibe abgetrennt. Sie wurde mit einer Rasierklinge in KPP in kleine Blöcke geschnitten und anschließend wie die Wurzelspitzen über Nacht fixiert. Die fixierten Gewebe wurden stufenweise mit Saccharose infiltriert. Die Proben wurden dazu nacheinander mit in KPP 3:1, 1:1, bzw. 1:3 verdünnter Infiltrationslösung versetzt, für 10 min auf Eis unter Vakuum infiltriert und auf dem Drehrad für 2 h bei 4 °C bewegt. Zuletzt wurden sie über Nacht mit der Infiltrationslösung ebenso inkubiert.

Die Wurzelspitzen von Arabidopsis und Tabak wurden dann auf zylinderförmige Gelatineblöcke, die zuvor auf einem Probenhalter aus Kupfer aufgebracht worden waren, aufgesetzt. Die Blöcke wurden für weitere 8 h mit der Infiltrationslösung inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und in diesem gelagert.

Die Wurzelspitzen von Mais wurden halbiert, damit sie mit einer flachen Oberfläche auf dem Probenhalter aus Kupfer aufgesetzt werden konnten. Die Kotyledonenblöcke der Erbsen wurden direkt auf den Probenhalter aus Kupfer aufgesetzt. Beide Proben wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung in diesem gelagert.

2.9.3 Kryo-Ultramikrotomie

Lösungen:

Methylcellulose-Lösung: 2 % (w/w) Methylcellulose (25 centipose; Sigma,
Taufkirchen, BRD) in H₂O bidest.

2 g Methylcellulose wurden bis zum lösen in 98 g 90 °C warmem H₂O bidest. gerührt. Dann wurde die Lösung auf Eis weiter gerührt bis sie eine Temperatur von 10 °C erreicht hatte. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei 4 °C gerührt. Nachdem die Lösung 3 Tage lang bei 4 °C gelagert worden war, wurden durch eine Zentrifugation für 90 min bei 100.000 g_{max} unlösliche Bestandteile abgetrennt.

Saccharose-Methylcellulose-Lösung: 1,2 M Saccharose
1 % (w/v) Methylcellulose
Eine 2%-ige Methylcellulose-Lösung und eine 2,4 M Saccharose-Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 für 30 min bei 4 °C auf einem Drehrad vermischt.

Sämtliche Schneidevorgänge erfolgten bei -120 °C an einem Ultramikrotom (Ultracut, UCT + EM FCS, Leica, Bensheim, BRD). Zunächst wurden die Wurzelspitzen mit einem Glasmesser zu einem Pyramidenstumpf getrimmt. Die Anfertigung der ultradünnen Gefrierschnitte erfolgte dann mit einem Diamantmesser bei einer Messer- und Blocktemperatur von -120 °C und einer Schnittgeschwindigkeit von 80 mm/s in 70 nm dicke Schnittbänder. Diese Schnittbänder wurden mit einer Silberdrahtöse, die einen Tropfen Saccharose-Methylcellulose-Lösung enthielt, aufgenommen und anschließend auf ein mit Formvar beschichtetes und kohlebedampftes Nickelgrid gelegt (Liou et al., 1996; Hinz et al., 1999). Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.4 Immunmarkierung der Gefrierschnitte

Lösungen:

Gelatine-Platten: 2 % (w/v) Gelatine
0,05 % (w/v) Natriumazid
in KPP (siehe Kap. 2.9.2)
in Petrischalen mit 3 cm Durchmesser gegossen
und bei 4 °C gelagert

Glycin-PBS: 20 mM Glycin in PBS

Blocklösung: 1 % (w/v) BSA in PBS

Waschlösung: 0,1 % (w/v) BSA in PBS

Uranyl-Oxalat-Lösung: 2 % (w/v) Uranylacetat, pH 4,0
150 mM Oxalsäure

Zur Herstellung der Uranyl-Oxalat-Lösung wurden zunächst eine 4%-ige (w/v) Uranylacetat-Lösung und eine 300 mM Oxalsäure-Lösung hergestellt, die dann im Verhältnis von 1:1 gemischt wurden. Der pH-Wert wurde mit 25%-iger (w/v) Ammoniumhydroxid-Lösung auf 7,0 eingestellt.

Methylcellulose-Uranylacetat-Lösung:

1,8 % (w/v) Methylcellulose
0,4 % (w/v) Uranylacetat, pH 4,0
in H₂O bidest.

Verwendete Primärantikörper:

Alle Primär-Antikörper wurden über Protein A gereinigt (siehe Kap. 2.7), um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.

- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von *Arabidopsis thaliana* Sec21 (Movafeghi et al., 1999) (1:200 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen δ -COP von *Zea mays* (Pimpl et al., 2000) (1:100 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ϵ -COP von *Zea mays* (Pimpl et al., 2000) (1:200 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein von *Arabidopsis thaliana* Arf1p (Pimpl et al., 2000) (1:500 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Calreticulin von *Ricinus communis* (Coughlan et al., 1997) (1:200 verdünnt)
- polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen α -Amylase von *Hordeum vulgare* (1:200 verdünnt) (von Dr. B. Svensson (Carlsberg Laboratory, Department of Chemistry, Valby, Dänemark) zur Verfügung gestellt)

Die Primärantikörper wurden jeweils in Blocklösung verdünnt.

Sekundär-Antikörper:

Die sekundären Antikörper waren an 10 nm kolloidales Gold gebunden. Die aus Ziegen gewonnenen Sekundärantikörper (British BioCell, Cardiff, GB) wurden gemäß der Herstellerangaben 1:30 in Blocklösung verdünnt.

Zunächst musste die Saccharose-Methylcellulose-Schicht von den Grids entfernt werden. Dazu wurden die Grids mit den Schnitten nach unten auf Gelatine-Platten gelegt, leicht angedrückt und für 15 min auf eine 37 °C warme Heizplatte gestellt, so dass die Gelatine flüssig wurde. In den

folgenden Wasch- und Inkubationsschritten wurden die Grids, wenn nicht anders angegeben, bei RT mit den Schnitten nach unten auf 50 µl große Tropfen aufgelegt.

1. Waschen:	3 × 3 min	mit Glycin-PBS bei 37 °C
2. Blocken:	5 min	mit Blocklösung
3. Primär-Antikörper:	1 h	mit der jeweiligen Antikörperlösung
4. Waschen:	3 × 5 min	mit Waschlösung
5. Sekundär-Antikörper:	1 h	auf einem 30 µl Tropfen
6. Waschen:	5 min	mit Waschlösung
7. Waschen:	3 × 5 min	mit PBS
8. Waschen:	5 × 2 min	mit H ₂ O bidest.
9. Kontrastieren:	5 min	mit Uranyl-Oxalat-Lösung
10. Waschen:	2 × 30 s	mit H ₂ O bidest.

Zum Schluss wurden die Grids mit Methylcellulose-Uranylacetat beschichtet. Dazu wurden sie kurz auf einen Tropfen Methylcellulose-Uranylacetat aufgelegt, dann auf einem weiteren Tropfen kreisförmig bewegt, um eine vollständige Benetzung zu gewährleisten und zuletzt auf einem dritten Tropfen für 5 min auf Eis inkubiert. Die Grids wurden mit einer Drahtöse (Ø 3,5 mm) von den Methylcellulose-Uranylacetat-Tropfen genommen und in einem Winkel von 45° über ein angefeuchtetes Filterpapier gezogen, um überschüssige Lösung abzusaugen und gleichzeitig eine gleichmäßige Methylcellulosebeschichtung zu erhalten. Die Grids wurden in den Ösen für 15 min an der Luft getrocknet und anschließend vor Staub geschützt aufbewahrt.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Hüllproteinen der pflanzlichen COPI und COPII Vesikel. Da zu Beginn der Arbeit keine Antikörper gegen diese Proteine aus Pflanzen zur Verfügung standen, sollte eine Identifizierung mit Antikörpern durchgeführt werden, die gegen Hüllproteine von COP Vesikeln aus Hefe gerichtet waren. Mit diesen Antikörpern - mit Ausnahme des Antikörpers gegen Sec23p - gab es aber keine spezifischen Kreuzreaktionen in pflanzlichen Cytosolfractionen aus Blumenkohlinfloreszenzen und kultivierten Suspensionszellen aus Arabidopsis. Der Sec23p-Antikörper reagierte nur schwach mit einem Protein mit einer Molekularmasse von 85 kDa. Aus diesem Grund wurden cDNA-Sequenzen aus Arabidopsis in der dbEST-Datenbank des NCBI gesucht (siehe Kap. 2.1.10), deren abgeleiteten Proteine Homologien zu Bestandteilen der Proteinhüllen von COPI und COPII Vesikeln aus Hefe und Säugetieren aufwiesen. Zwei cDNA-Klone wurden dabei identifiziert, deren abgeleiteten Proteine hohe Homologien zu Sec21p (das Homologprotein zu γ -COP aus Säugetieren) bzw. Sec23p aus Hefe zeigten.

3.1 Aufklärung der Sequenzen

3.1.1 Die Sequenz der γ -COP-cDNA und die Klonierungsstrategie

Der γ -COP-cDNA-Klon 150F14T7 mit der "GenBank Accession" Nummer T75984 (Newman et al., 1994) wurde beim Arabidopsis Biological Resource Centre (Ohio State University, Columbus, USA) bezogen. Die Sequenzierung ergab, dass die cDNA eine Länge von 1565 bp hat und ein Stoppkodon an bp-Position 1362 besitzt (Abb. 3.1). Das von dieser cDNA abgeleitete Polypeptid (P*) besteht daher aus 454 Aminosäuren. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit wurde ein weiteres, vollständiges γ -COP (P**) aus Arabidopsis veröffentlicht, das von einer genomischen Nukleotidsequenz mit der "GenBank Accession" Nummer AL023094 kodiert wird (siehe Anhang 1). Die Aminosäuresequenzen der beiden Polypeptide wurden miteinander verglichen. Dieser Vergleich zeigte, dass es sich bei dem von der cDNA abgeleiteten Polypeptid (P*) um ein γ -COP-Fragment handelt und es mit den letzten 417 Aminosäuren am Aminoterminus des vollständigen γ -COP (P**) (unterstrichen in Anhang 1) zu 88 % identisch und zu 89 % ähnlich ist (für die Bestimmung der Identität und Ähnlichkeit von Aminosäuren siehe Kap. 2.1.10). Ein auffälliger Unterschied zwischen beiden Fragmenten ist, dass ein 36-Aminosäuren langer Abschnitt im vollständigen γ -COP (P**) fehlt. Diese Sequenz ist in dem von der cDNA abgeleiteten Polypeptid (P*) in Position 109-144 vorhanden (unterstrichen in der Abb. 3.1). Abgesehen von dieser Lücke sind beide Fragmente zu 95 % identisch und 96 % ähnlich.

Interessanterweise zeigt das vollständige γ -COP (P**) aus Arabidopsis genau in dieser Domäne einen Unterschied zu dem homologen Protein Sec21p aus Hefe, das von einer genomischen Nukleotidsequenz mit der "GenBank Accession" Nummer NC_001146 (Goffeau et al., 1996) abgeleitet wird. Ein Sequenzvergleich von dem vollständigen γ -COP (P**) aus Arabidopsis mit dem Sec21p aus Hefe ergab 35 % identische und 54 % ähnliche Aminosäuren. In Anhang 1 ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine inklusive ihrer identischen bzw. ähnlichen Bereiche (schwarz hinterlegt) dargestellt. Der Bereich der letzten 415 Aminosäuren am Aminoterminus des putativen γ -COP (P**) aus Arabidopsis (unterstrichen in Anhang 1) zeigt zum entsprechenden Bereich von Sec21p aus Hefe 32 % Identität und 47 % Ähnlichkeit. Im Vergleich dazu ist das von der γ -COP-cDNA abgeleitete Polypeptid (P*) zu diesem Bereich von Sec21p zu 33 % identisch und zu 49 % ähnlich.

<i>Sal I</i>	<i>Mlu I</i>	*		30	*		60	*	
GTC GAC	CCA CGC GTC	CGG GAA AGT GGA	CTG CTT CAT CTA TGT GAA TTC ATT GAA GAT	TGT GAA TTC ACA TAT CTT					75
V D	P R V	R E S G	L L H L C E F I E D C E F T Y L						25
		*		105	*		135	*	
TCA ACA CAG ATC CTT CAT TTT CTG GGA AIT GAG GGG CCT AAC ACC TCA GAT CCA AGC AAG TAT ATA CGA TAT ATA									150
S T Q I L H F L G I E G P N T S D P S K Y I R Y I									50
		*		180	*		210	*	
TAT AAT CGT GTG CAT CTA GAA AAC GCC ACT GTC CGG GCT GCT GCT GGT TCC ACA CTT GCA AAG TTT GGG TTT ATG									225
Y N R V H L E N A T V R A A A V S T L A K F G F M									75
		*		225	*		285	*	
GTT GAA TCC TTG AAG CCC CGG AIT ACT GGT CTA TTG AAG CGT TGC AIC TAT GAC AGT GAT GAT GAG GTC CGT GAT									300
V E S L K P R I T V L L K R C I Y D S D D E V R D									100
		*		300	*		375	*	
AGG GCA ACA CTA TAT TTG AGT GGT CTT GGT GGT GAT GGT ACT GGT GAC ACT GAT AAA GAG AGC AAG GAT TTC CTA									375
R A T L Y L S V L G G D G T V D T D K E S K D F L									125
		*		405	*		435	*	
TTT GGT TCC CTG GAG GGT CCT CTA GTC AAC ATG GAA ACT AGT CTG AAG AAT TAT GAG CCC TCT GAA GAA GCT TTT									450
F G S L E V P L V N M E T S L K N Y E P S E E A F									150
		*		480	*		510	*	
GAT ATC AAC TCC GTA CCT AAG GAA GGT AAA TCT CAG CCC CTT GCA GAG AAG AAA GCC CAG GGT AAA AAG CCC ACT									525
D I N S V P K E V K S Q P L A E K K A Q G K K P T									175
		*		555	*		585	*	
GGT CTT GGT GCA CCA CCA GCT GCA CCT GCT TCT GGT TTT GAT GGC TAT GAA AGA CTT CTC TCA TCC AIT CCA GAG									600
G L G A P P A A P A S G F D G Y E R L L S S I P E									200

Abb. 3.1: Nukleotidsequenz der cDNA des Klons 150F14T7 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Der unterstrichene Teil fehlt in der vollständigen γ -COP-Sequenz aus Arabidopsis (siehe Anhang 1).

Die cDNA war zwischen den Schnittstellen von *Sal* I und *Not* I im Vektor λ PRL2 inkloniert. Das cDNA-Insert wurde komplett mit *Sal* I und *Not* I aus diesem Vektor herausgeschnitten und in dem richtigen Leseraster in den mit *Sal* I und *Not* I geöffneten Expressionsvektor pGEX-4T-3 kloniert (siehe Anhang 2). Da die cDNA aus 1565 bp und der Vektor aus 4968 bp bestanden, war das Ligationsprodukt 6533 bp groß. Mit dem Ligationsprodukt wurden zunächst *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Zur Kontrolle der Klonierung wurde das Konstrukt aus einem positiven Klon isoliert und sequenziert. Nachdem die Sequenzierung die Korrektheit der Klonierung bestätigt hatte, wurden *E. coli*-Zellen des Expressionsstammes BL-21 mit dem Konstrukt transformiert. Durch Mini-Präparation von Plasmid-DNA und zwei unterschiedlichen Restriktionsverdau-Ansätzen wurde die Korrektheit des Konstrukts in den BL-21-Zellen überprüft. Der erste Verdau wurde mit *Sal* I und *Not* I durchgeführt. Die Abb. 3.2 A, Bahn 3 zeigt das 1565 bp große *Sal* I/*Not* I-Fragment, das in den 4968 bp großen Expressionsvektor pGEX-4T-3 inkloniert war. Da der Expressionsvektor und das cDNA-Insert jeweils eine Schnittstelle für *Mlu* I hatten (siehe Abb. 3.1 und Anhang 2), wurde dieses Enzym für einen zweiten Verdau verwendet, um ganz sicher zu sein, dass die BL-21-Zellen mit dem richtigen Ligationsprodukt transformiert worden waren. Wenn die Schnittstelle für *Sal* I als bp-Position 1 definiert wird, ist die erste Schnittstelle für *Mlu* I (im cDNA-Insert) an bp-Position 8 und die zweite (im Vektor) an bp-Position 4284. Deshalb wurde erwartet, dass durch den Verdau mit *Mlu* I zwei 4276 und 2257 bp große Fragmente entstehen. Wie Abb. 3.2 A, Bahn 4 zeigt, konnten zwei Fragmente der richtigen Größe nach dem Restriktionsverdau mit *Mlu* I nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde die Expression des GST-Fusionsproteins mit IPTG induziert und das Protein durch eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt (siehe Kap. 2.1.11). Das aufgereinigte GST-Fusionsprotein wurde nach einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung aus dem Gel eluiert und in dieser Form direkt als Antigen verwendet. In Abb. 3.2 B ist die Fraktion des aufgereinigten Fusionsproteins nach der SDS-PAGE und der Silberfärbung zu sehen. Das Fusionsprotein zeigte eine apparente Molekularmasse von 81 kDa. Dieses Protein wurde von dem gegen Sec21p gerichteten Antikörper nicht erkannt. Der Antikörper gegen GST zeigte aber mit diesem GST-Fusionsprotein eine spezifische Kreuzreaktion (Abb. 3.2 B, Bahn 4). Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem Fusionsprotein wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Das Immunisierungsprotokoll ist in Kap. 2.1.11 aufgeführt. Das zur Immunisierung verwendete Antigen wurde beim Western-Blotting von dem Antiserum sehr spezifisch erkannt (Abb. 3.2 B, Bahn 5). Das Präimmunserum ergab dagegen in verschiedenen Verdünnungen kein Signal.

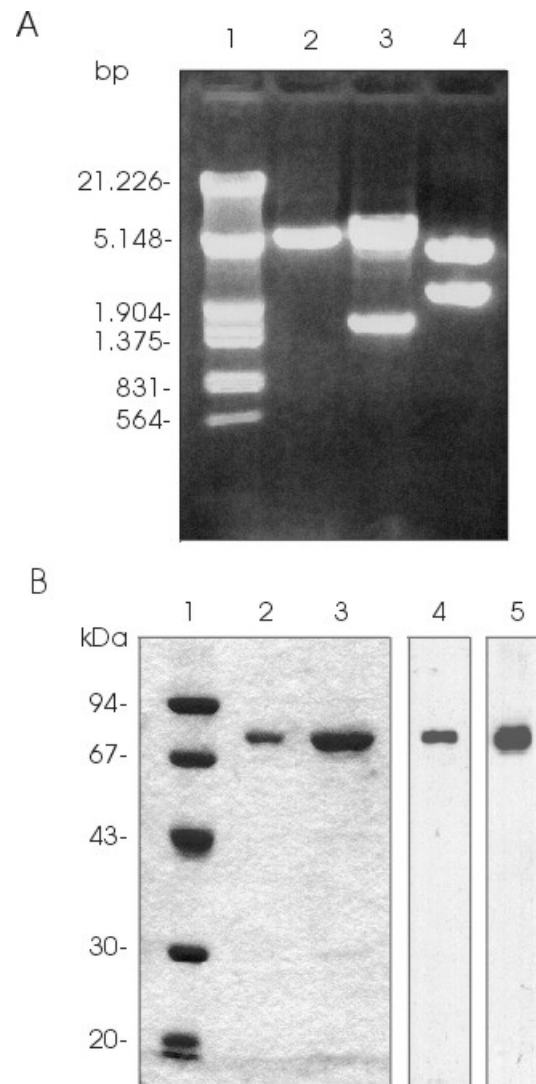


Abb. 3.2: Gewinnung eines Antikörpers gegen γ -COP aus Arabidopsis.

- A) Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel. Bahn 1: Längenstandard, Bahn 2: der Expressionsvektor nach der *Sal I/Not I*-Spaltung, Bahn 3: *Sal I/Not I*-Spaltungsprodukte des Expressionsvektors nach der Einklonierung der γ -COP-cDNA, Bahn 4: *Mlu I*-Spaltungsprodukte des Expressionsvektors nach der Einklonierung der γ -COP-cDNA.
- B) SDS-PAGE und Western-Blotting. Bahn 1: Molekularmassenmarker, Bahn 2 und 3: GST-Fusionsprotein (Antigen) nach der Aufreinigung im sibergefärbten Acrylamidgel, Bahn 4: die Kreuzreaktion des GST-Fusionsproteins mit dem Antikörper gegen GST, Bahn 5: Kreuzreaktion des GST-Fusionsproteins mit dem gewonnenen Antikörper. Pro Bahn wurden 1 μ g (Bahn 2), 4 μ g (Bahn 3), 0,2 μ g (Bahn 4 und 5) Protein aufgetragen.

3.1.2 Die Sequenz der AtSec23-cDNA und die Klonierungsstrategie

Der AtSec23-cDNA-Klon 34B8T7 mit der "GenBank Accession" Nummer T04245 (Newman et al., 1994) wurde beim Arabidopsis Biological Resource Centre (Ohio State University, Columbus, USA) bestellt. Die Sequenzierung ergab, dass die cDNA eine Länge von 996 bp hat und ein Stoppkodon an bp-Position 702 besitzt (Abb. 3.3). Das von dieser cDNA abgeleitete Polypeptid (P^{*}) besteht daher aus 234 Aminosäuren. Kürzlich wurde ein weiteres, vollständiges Sec23p (P^{**}) aus Arabidopsis veröffentlicht (siehe Anhang 3), das von einer genomischen Nukleotidsequenz mit der "GenBank Accession" Nummer AB023036 kodiert wird (Sato et al., 2000). Der Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Polypeptide zeigte, dass es sich bei dem von der cDNA abgeleiteten Polypeptid (P^{*}) um ein Sec23p-Fragment handelt. Dieses Polypeptid ist zu dem Bereich der letzten 234 Aminosäuren am Aminoterminus des vollständigen Sec23p (P^{**}) (unterstrichen in Anhang 3) zu 89 % identisch und zu 94 % ähnlich. Ein Sequenzvergleich zwischen dem erwähnten Sec23p (P^{**}) aus Arabidopsis und dem Sec23p aus Hefe, das von der genomischen DNA mit der "GenBank Accession" Nummer NC_001148 kodiert wird (Goffeau et al., 1996), ergab 41 % identische und 63 % ähnliche Aminosäuren (siehe Anhang 3). Im Vergleich dazu zeigt der Bereich der letzten 234 Aminosäuren am Aminoterminus des putativen Sec23p (P^{**}) aus Arabidopsis (unterstrichen in Anhang 3) zum homologen Bereich von Sec23p aus Hefe 49 % Identität und 68 % Ähnlichkeit. Das von der Sec23-cDNA abgeleitete Polypeptid (P^{*}) ist zu diesem Bereich von Sec23p aus Hefe zu 51 % identisch und zu 70 % ähnlich.

<i>Sal</i> I	<i>Mlu</i> I *	30	*	60	*
GTC GAC CCA CGC GTG CCG CAA ACA GAG GAG GGA TTT GAT GCA ACT CCG TGG CTA GAT CCG ACT CTC AIT CGT CTG					75
V D P R V R E T E E G F D A T R W L D R T L I R L					25
	*	105	*	135	*
TGT TCA AAA TTT GGT GAA TAT AGA AAG GAT GAT CCA ACC TCG TTT ACG CTG AAA CCA TAT CTT ACA TTG TTC CCT					150
C S K F G E Y R K D D P T S F T L K P Y L T L F P					50
	*	180	*	210	*
CAA TTC ATG TTT AAC CTG AGG CCG TCA CAG TTT GTT CAG GTC TTT AAC AAT AGT CCT GAT GAA ACC GCA TAC TTC					225
Q F M F N L R R S Q F V Q V F N N S P D E T A Y F					75
	*	255	*	285	*
CGC ATG TTG CTA AAC CCG GAA AAC AIT TCA AAT GCA AIT GTC ATG AIC CAA CCT TCT CTG ACG TCA TAT TCA TTC					300
R M L L N R E N I S N A I V M I Q P S L T S Y S F					100
	*	330	*	360	*
AAT TCA GGA CCT CAG GCA GCT TTG CTG GAT GTG GCT TCC AIT GCA GCT GAC AAG AIT CTT CTA TTA GAT GCA TAT					375
N S G P Q A A L L D V A S I A A D K I L L L D A Y					125
	*	405	*	435	*
TTT AGT GTT GTT GTC TTC CAT GGA ATG ACT ATA TCG CAA TGG CGA AAC ATG GGT TAT CAT CAT CAG CCC GAA CAT					450
F S V V V F H G M T I S Q W R N M G Y H H Q P E H					150
	*	480	*	510	*
GAG GCC TTT GCT CAG TTA TTG CAA GCT CCG CAA GAG GAT TCC CAG ATG TTA GTC CCG GAG CGT TTC CCA GTC CCG					525
E A F A Q L L Q A P Q E D S Q M L V R E R F P V P					175
	*	555	*	585	*
AGA TTA GTT GTG TGT GAT CAA CAT GGA TCA CAG GCA AGG TTT TTA TTG GCT AAG CTG AAT CCA TCA GCG ACT TAC					600
R L V V C D Q H G S Q A R F L L A K L N P S A T Y					200
	*	630	*	660	*
AAC AAT GCA AAC GAG ATG TCA GCT GGG TCA GAC ATA ATC TTC ACT GAC GAT GTG AGC CTC CAA GTC TTT AIT GAA					675
N N A N E M S A G S D I I F T D D V S L Q V F I E					225
	*	705	*	740	*
CAT CTT CAG AAA CTG GCC GTG CAA TCC TGA GCA AAG TAG TCA CAG TCC CAG TTT GIT TTT TGC TTA AAT TAT CCA					750
H L Q K L A V Q S * 234					
	*	780	*	815	*
TAT CTT CCT GAT TAC CCG CAT GCC CGT TTG TAC TAT TTT AGA GCT CTT TGT TAT TTT GGT AGC ACA TAA AAT ACA					825
	*	855	*	890	*
TCA TAG TTG GAA GTC TTT TAT TTG CAT TGG GAT TTG TCT GGA GTA CAG AGA TTT ACT AIT TGC TTC TTC TTT CTT					900
	*	930	*	965	*
TTT TTT TTG GGA TGA AAT CTC TTG TAT GAT TGA TCA AIT ATA TGG TTT GGG TCT GTG GCT TTA GTA AAA AAA AAA					975
	* Not I				
AAA AAA AAA AAG GGC <u>GCC CGC</u>		996			

Abb. 3.3: Nukleotidsequenz der cDNA des Klons 34B8T7 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz.

Die Sec23-cDNA lag zwischen den *Sal* I und *Not* I Schnittstellen des Genbank-Vektors λ PRL2 einkloniert vor. Das cDNA-Insert wurde komplett mit *Sal* I und *Not* I herausgeschnitten und in den mit *Sal* I und *Not* I geöffneten Expressionsvektor pGEX-4T-3 einkloniert (siehe Anhang 2). Mit diesem 5970 bp großen Ligationsprodukt wurden zunächst *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Durch die Sequenzierung der Plasmid-DNA aus einem positiven Klon wurde die Korrektheit der Klonierung verifiziert. In einem weiteren Schritt wurden *E. coli*-Zellen des Expressionsstammes BL-21 mit dem Konstrukt transformiert. Durch Mini-Präparation der Plasmid-DNA und zwei unterschiedliche Restriktionsverdau-Ansätze wurde die Korrektheit des Konstrukts in den BL-21-Zellen überprüft. Der erste Verdau wurde mit *Sal* I und *Not* I durchgeführt. Abb. 3.4 A zeigt das 1002 bp große *Sal* I/*Not* I-Fragment, das in dem Expressionsvektor pGEX-4T-3 einkloniert wurde. Da der Expressionsvektor und das cDNA-Insert jeweils eine Schnittstelle für *Mlu* I hatten (siehe Abb. 3.3 und Anhang 2), wurde ein zweiter Restriktionsverdau mit diesem Enzym durchgeführt. Wenn die Schnittstelle von *Sal* I als bp-Position 1 definiert wird, ist die erste Schnittstelle für *Mlu* I (im cDNA-Insert) an bp-Position 8 und die zweite (im Expressionsvektor) an bp-Position 3721. Durch den Verdau wurden, wie erwartet, zwei 3713 und 2257 bp große Fragmente herausgeschnitten (siehe Abb. 3.4 A). Die Expression und Reinigung des Fusionsproteins erfolgten wie unter Kap. 3.1.1 beschrieben. In Abb. 3.4 B ist die Fraktion des aufgereinigten Fusionsproteins nach SDS-PAGE und Silberfärbung zu sehen. Das Fusionsprotein zeigte eine apparente Molekularmasse von 63 kDa. Der Antikörper gegen das Sec23p der Hefe sowie der Antikörper gegen GST zeigten eine spezifische Kreuzreaktion mit dem GST-Fusionsprotein. Dieses Protein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet (siehe Kap. 3.1.1). Im Western-Blotting markierte das Antiserum sehr spezifisch das zur Immunisierung verwendete Antigen (Abb. 3.4 B). Das Präimmunserum zeigte dagegen in verschiedenen Verdünnungen keine Kreuzreaktion mit dem Fusionsprotein.

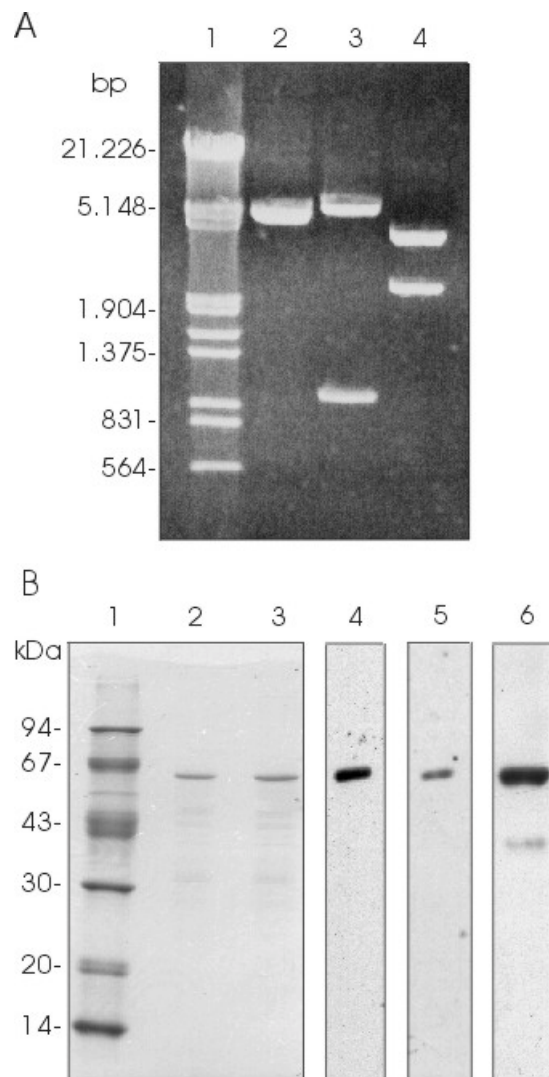


Abb. 3.4: Gewinnung eines Antikörpers gegen Sec23p aus Arabidopsis.

- A) Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel. Bahn 1: Längenstandard, Bahn 2: der Expressionsvektor nach der *Sal I/Not I*-Spaltung, Bahn 3: *Sal I/Not I*-Spaltungsprodukte des Expressionsvektors nach der Einklonierung der *AtSec23*-cDNA, Bahn 4: *Mlu I*-Spaltungsprodukte des Expressionsvektors nach der Einklonierung der *AtSec23*-cDNA.
- B) SDS-PAGE und Western-Blotting. Bahn 1: Molekularmassenmarker, Bahn 2 und 3: GST-Fusionsprotein (Antigen) nach der Aufreinigung im sibergefärbten Acrylamidgel, Bahn 4: die Kreuzreaktion des GST-Fusionsproteins mit dem Antikörper gegen GST, Bahn 5: Kreuzreaktion des GST-Fusionsproteins mit dem Antikörper gegen Sec23p von Hefe, Bahn 6: Kreuzreaktion des GST-Fusionsprotein mit dem gewonnen Antikörper. Pro Bahn wurden 1 μg (Bahn 2), 2 μg (Bahn 3), 0,2 μg (Bahn 4, 5 und 6) Protein aufgetragen.

3.2 Lokalisierung von At γ -COP und AtSec23p in den Cytosol- und Membranfraktionen

Um die Kreuzreaktion der hergestellten Antikörper mit homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen zu untersuchen, wurden Cytosol und mikrosomale Membranen von Arabidopsis, Blumenkohl, Mais, Hefe und Schweinehirn isoliert (siehe Kap. 2.2.2). Mit diesen Fraktionen wurden dann Western-Blots angefertigt. Durch diese Experimente konnte auch die intrazelluläre Lokalisierung von At γ -COP und AtSec23p festgestellt werden. Der Antikörper gegen At γ -COP zeigte dabei eine Kreuzreaktion mit einem Protein von 100 kDa in allen Fraktionen aus Pflanzenzellen, wobei die Kreuzreaktion mit dem Cytosol in allen Fällen deutlich stärker ausfiel als die mit den mikrosomalen Membranen (Abb. 3.5). In den Fraktionen aus Hefe und Schweinehirn wurde dagegen kein Protein erkannt.

Bei den Fraktionen aus Arabidopsis, Blumenkohl und Mais zeigte der Antikörper gegen AtSec23p ein ähnliches Verhalten wie der gegen At γ -COP (Abb. 3.5). Ein Protein von 85 kDa wurde sowohl in den cytosolischen als auch in den mikrosomalen Membranfraktionen erkannt, wobei die Kreuzreaktion mit den cytosolischen Fraktionen stärker ausfiel. Im Gegensatz zu dem Antikörper gegen At γ -COP erkannte dieser Antikörper auch Proteine von Hefe und Schweinehirn. Dabei war die Kreuzreaktion mit dem Protein von 85 kDa in den cytosolischen Fraktionen stärker ausgeprägt. Diese Kreuzreaktion fiel aber im Vergleich zu den pflanzlichen Geweben schwächer aus.

Gegen Ende der vorliegenden Arbeit wurden weitere Antikörper gegen Hüllproteine der pflanzlichen COPI und COPII Vesikel erhältlich. Die Antikörper gegen δ -COP und ϵ -COP aus Mais wurden von Dr. Saun Coughlan (AG Biotechnology, DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware, USA) und die Antikörper gegen Sar1p und Arf1p aus Arabidopsis von Herrn Peter Pimpl (Abteilung für Strukturelle Zellphysiologie, Albrecht von Haller Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen, BRD) zur Verfügung gestellt (siehe Kap. 2.8.5.2). Dies ermöglichte einen Vergleich der Verteilung dieser Hüllproteine zwischen Cytosol- und Membranfraktionen. Die Antikörper gegen Zm δ -COP und Zm ϵ -COP reagierten mit pflanzlichen Proteinen der Molekularmassen 58 kDa (δ -COP) und 31 kDa (ϵ -COP) (Abb. 3.5). Es gab jedoch keine Kreuzreaktion mit Proteinen aus Hefe und Schweinehirn. Beide Proteine waren in den Cytosolfraktionen stärker als in den mikrosomalen Membranfraktionen nachweisbar. Die Antikörper gegen die GTPasen der COP Vesikel, AtSar1p und AtArf1p, reagierten nur mit Proteinen aus pflanzlichen Geweben mit Molekularmassen von 22 kDa (AtSar1p) und 20 kDa (AtArf1p) (Abb. 3.5). Im Gegensatz zu den vorgestellten Antikörpern gegen Hüllproteine der COP Vesikel reagierte der Antikörper gegen AtSar1p mit den

mikrosomalen Membranfraktionen stärker als mit den Cytosolfraktionen. Im Vergleich dazu war die Kreuzreaktion des Antikörpers gegen AtArf1p mit den mikrosomalen Membranfraktionen nur wenig stärker als mit den Cytosolfraktionen ausgeprägt.

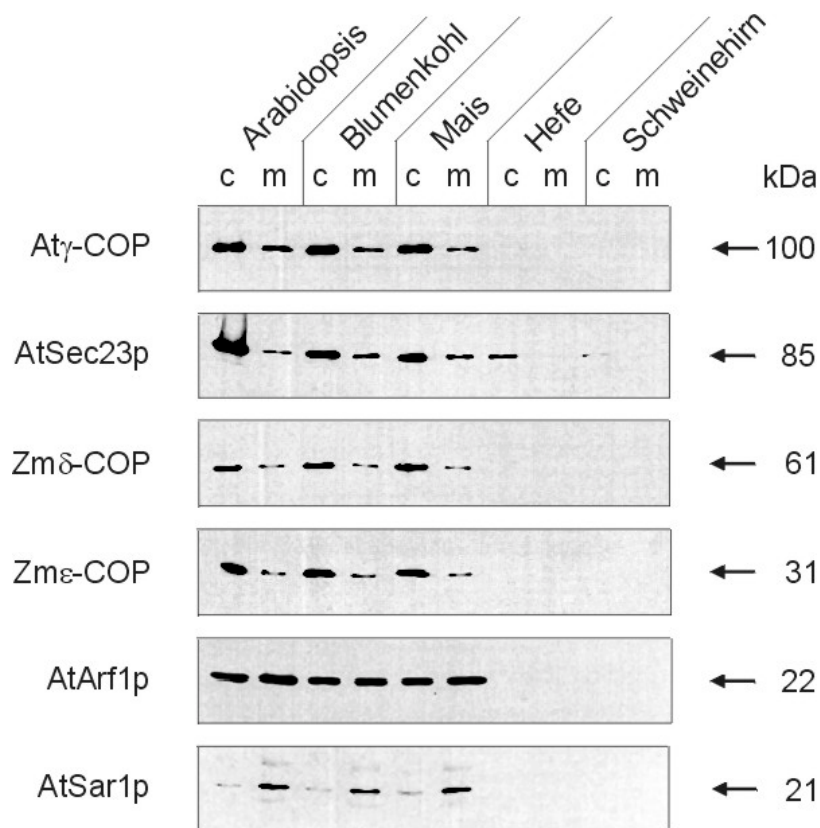


Abb. 3.5: Die Kreuzreaktionen der Antikörper gegen Hüllproteine der pflanzlichen COP Vesikel mit den Cytosol- (c) und Membranfraktionen (m) aus verschiedenen Organismen.

3.3 Charakterisierung von Atγ-COP und AtSec23p aus dem Cytosol

Da mit den Antikörpern gegen Atγ-COP und AtSec23p gezeigt werden konnte, dass ihre Antigene sowohl gelöst als auch membrangebunden vorkommen, wurde zunächst versucht, diese Proteine aus dem Cytosol zu charakterisieren. Durch die Ammoniumsulfatfällung sollten Fraktionen mit erhöhter Atγ-COP- und AtSec23p-Konzentration gewonnen werden, die möglichst geringe Mengen endogener Proteasen enthalten. In einem weiteren Schritt konnte dann

erforscht werden, ob beide Proteine, ebenso wie in Hefe und Säugetieren, als Bestandteile der verschiedenen Proteinkomplexe im Cytosol vorliegen.

3.3.1 Ammoniumsulfatfällung von At γ -COP und AtSec23p

Um die Konzentration von At γ -COP und AtSec23p in der cytosolischen Fraktion zu erhöhen und sie von einem großen Teil der endogenen Proteasen zu trennen (siehe unten), wurde eine Fraktionierung des Cytosols mit Ammoniumsulfat eingesetzt. Für die Isolierung und Konzentrierung von Proteinen ist ihre Fällung mit anorganischen Salzen eine sehr geeignete Methode. Dabei wird Ammoniumsulfat am häufigsten zur Fraktionierung von Proteinen benutzt (Cooper, 1980). In Rohpräparationen mit großem Volumen wird das Salz in trockener Form zugegeben. Beim Lösen des Ammoniumsulfats wird eine große Anzahl von Wassermolekülen pro Ammoniumsulfat-Molekül gebunden. Je mehr Ammoniumsulfat in der Lösung vorhanden ist, desto weniger Wasser steht für die Wechselwirkung mit den Proteinen zur Verfügung. An einem bestimmten Punkt ist nicht mehr genug Wasser vorhanden, um eine Reihe von Proteinen in Lösung zu halten, so dass diese ausfallen. Das Aussalzen kann deswegen als ein Dehydratationsprozess bezeichnet werden.

Nach der Fraktionierung der cytosolischen Proteine von Blumenkohlinfloreszenzen (siehe Kap. 2.2.3.1), wurde die Verteilung der Hüllproteine durch Western-Blotting untersucht. Wie Abb. 3.6 zeigt, wurde At γ -COP mit Ammoniumsulfatkonzentrationen bis 50 % (Sättigung) gefällt, wobei die größte Menge beim Schritt von 30 % zu 40 % Ammoniumsulfat gefällt wurde. Im Vergleich dazu fiel AtSec23p bereits bei 40 % Ammoniumsulfat vollständig aus. Der größte Teil dieses Antigens wurde bei den Schritten von 0 zu 20 % und von 20 bis 30 % Ammoniumsulfat gefällt. Das Verhalten der GTPasen AtSar1p und AtArf1p bei der Ammoniumsulfatfraktionierung war ebenfalls verschieden. AtArf1p blieb zum Teil bis zur Zugabe von 60 % Ammoniumsulfat in Lösung, wobei die größte Menge von diesem Protein durch die Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration von 30 % zu 40 % ausfiel. AtSar1p wurde dagegen durch die Zugabe von 40 % Ammoniumsulfat vollständig präzipitiert.

Ein Problem der Cytosol- und Membranisolierung von Pflanzenmaterial ist die Freisetzung der in der Vakuole vorhandenen Proteasen bei der Homogenisation. Durch ihre Aktivität werden viele lösliche Proteine sowie extrinsische Membranproteine im Laufe der Aufarbeitung abgebaut. Diese proteolytische Aktivität kann durch Zugabe der Proteaseinhibitoren und durch niedrige Temperaturen reduziert, aber nicht vollständig verhindert werden. Die Ammoniumsulfatfraktionierung bietet die Möglichkeit, bei bestimmten Salzkonzentrationen die Proteasen von anderen Proteinen zu trennen. Daher wurde die Aktivität der Proteasen in Ammoniumsulfatfraktionen mit dem Azocaseintest gemessen (siehe Kap. 2.4). Wie man bereits in der Abb. 3.6 sieht, ist diese Aktivität in den ersten drei Fraktionen niedriger als im Cytosol. Erst nach der

Zugabe von 50 % Ammoniumsulfat wird sie höher als im Cytosol und bei 60 % erreicht sie ihr Maximum. Daher kann mit Zugabe von 30 % und 40 % Ammoniumsulfat eine cytosolische Fraktion aus Blumenkohl gewonnen werden, die im Vergleich zum Cytosol hohe Konzentration der untersuchten Hüllproteine der COPI und COPII Vesikel und weniger Proteasen beinhaltet.

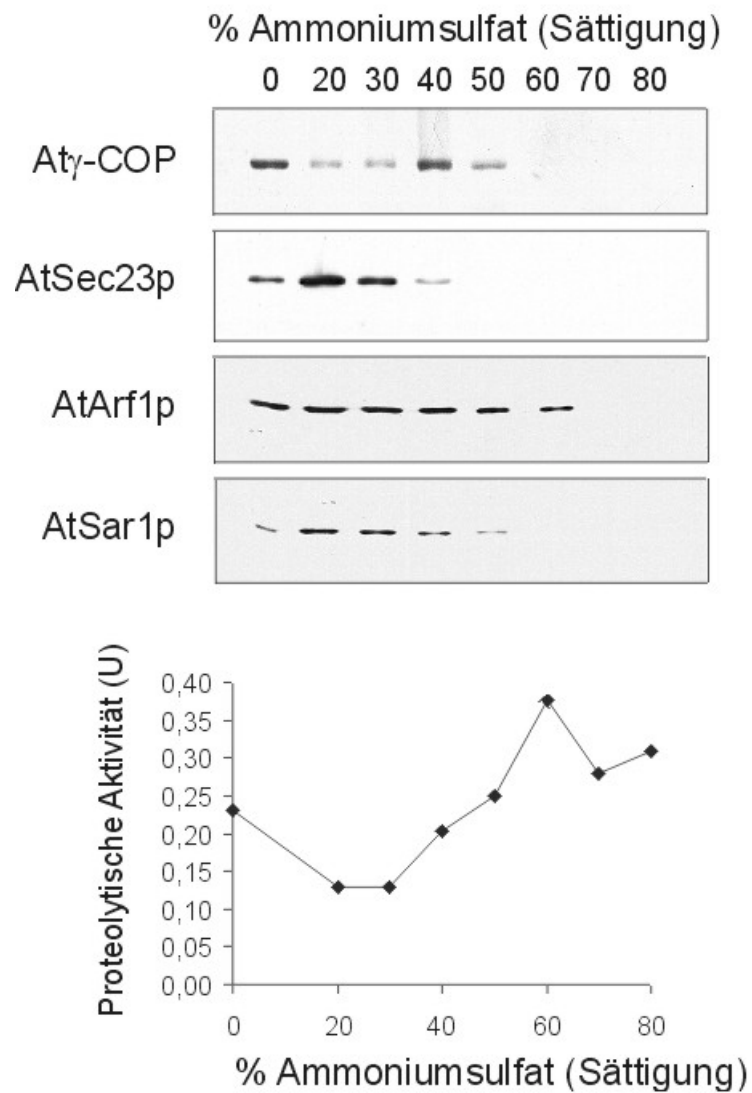


Abb. 3.6: Verteilung von Atγ-COP, AtSec23p, AtArf1p und AtSar1p sowie der Proteaseaktivität (auf Basis des Azocaseintests) in Ammoniumsulfatfraktionen des Cytosols aus Blumenkohl.

3.3.2 At γ -COP und AtSec23p als Bestandteile von Proteinkomplexen

Sec21p und Sec23p in Hefezellen und ihre Homologen in Säugetieren sind Bestandteile von Proteinkomplexen (siehe Kap. 1.3.2 und Kap. 1.3.3). Um zu prüfen, ob At γ -COP und AtSec23p im Cytosol von Pflanzen isoliert oder in Proteinkomplexen vorkommen, wurde eine Gelfiltration der cytosolischen Proteine aus Blumenkohlinfloreszenzen durchgeführt (siehe Kap. 2.2.3.2). Mit dieser Methode werden Proteine bzw. Proteinkomplexe aufgrund unterschiedlicher Größe getrennt und ihre Größe mit Hilfe der geeigneten Molekularmassenmarker geschätzt. Da vorher gezeigt worden war, dass die meisten At γ -COP und AtSec23p einer Cytosolfraktion aus Blumenkohl mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt werden können und die Proteaseaktivität in dieser Ammoniumsulfatfraktion im Vergleich zum Cytosol deutlich reduziert ist (siehe Kap. 3.3.1), wurde zunächst eine entsprechende Fällung durchgeführt. Die Proteine der so gewonnenen Fraktion wurden entsprechend ihrer Größe durch die Gelfiltration über eine Sepharose CL-6B-Säule aufgetrennt. Diese Säule hat einen Trennbereich von 10-4000 kDa. Die anschließende Western-Blot-Analyse zeigte, dass At γ -COP in den Fraktionen 23 bis 30 eluiert wird (Abb. 3.7). Die größten Antigen-Mengen wurden dabei in den Fraktionen 26 und 27 nachgewiesen. Da At γ -COP trotz seiner Molekularmasse von 100 kDa vor dem Molekularmassenmarker Thyroglobulin (669 kDa) eluiert wurde, deutet dieser Versuch darauf hin, dass dieses Protein ein Bestandteil eines Proteinkomplexes ist, der eine Molekularmasse von etwas über 669 kDa hat. AtSec23p mit einer Molekularmasse von 85 kDa wurde in den Fraktionen 27 bis 34 mit einem Peak bei den Fraktionen 30, 31 und 32 vor der β -Amylase (200 kDa) eluiert. Damit wurde gezeigt, dass AtSec23p auch als Bestandteil eines Proteinkomplexes mit der Molekularmasse von über 200 kDa in der Cytosolfraktion vorkommt. Das Ergebnis dieser Gelfiltrationschromatographie lässt darauf schließen, dass At γ -COP und AtSec23p im Cytosol als Bestandteile verschiedener Proteinkomplexe vorliegen.

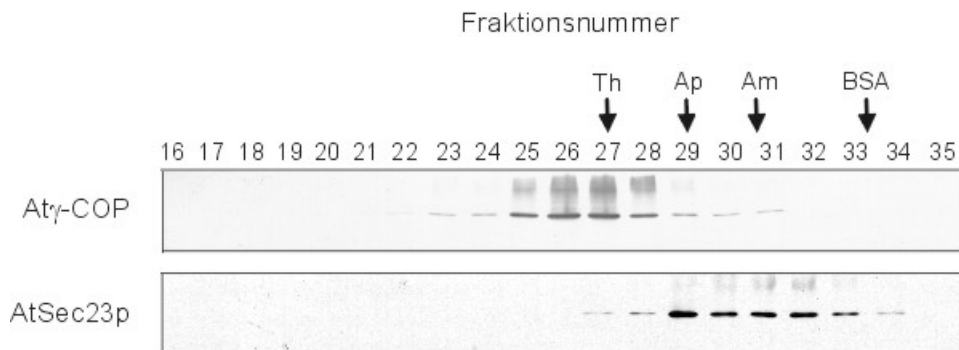


Abb. 3.7: Immunoblots der durch Gelfiltration über eine Sepharose CL-6B-Säule aufgetrennten Cytosolfractionen. At γ -COP wird vor Thyroglobulin und AtSec23p vor der β -Amylase eluiert. Molekularmassenmarker: Th, Thyroglobulin (669 kDa); Ap, Apoferritin (443kDa); Am, β -Amylase (200 kDa) und BSA (66 kDa).

3.3.3 Neomycinfällung von At γ -COP

Um zu verifizieren, dass At γ -COP und AtSec23p als Bestandteile von zwei Proteinkomplexen mit verschiedenen Bindungseigenschaften vorkommen, wurden cytosolische Proteine mit Neomycin gefällt. Bestimmte aminoglykosylierte Antibiotika - wie Neomycin - bilden durch eine direkte Kreuzreaktion mit dem Coatomer aus Säugetieren und Hefe große Aggregate, die durch Zentrifugation aus der löslichen Phase getrennt werden können (Hudson und Draper, 1997). Alle diese Antibiotika besitzen in ihrer Struktur mindestens zwei Paare von benachbarten Aminogruppen, ähnlich wie die Struktur des di-Lysin-Signals, das an das Coatomer bindet. Es ist bekannt, dass das Coatomer aus Säugetieren zwei oder mehr Bindungsstellen für die benachbarten Aminogruppen hat (Hudson und Draper, 1997). Neomycin, das drei Paare von Aminogruppen hat, vernetzt durch Kreuzreaktion mit diesen Bindungsstellen das Coatomer. Um die Wechselwirkung des pflanzlichen Coatomers mit Neomycin zu untersuchen, wurden zu einer mit 40 % Ammoniumsulfat gewonnenen Cytosolfraction aus Blumenkohl verschiedene Konzentrationen von Neomycin gegeben. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände durch Western-Blotting analysiert (siehe Kap. 2.2.3.3). At γ -COP konnte nach Zugabe von 1-10 mM Neomycin in der Cytosolfraction (Überstand) nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Im Vergleich dazu blieb AtSec23p unbeeinflusst von dieser Neomycinkonzentration im Cytosol (Überstand). Da vorher gezeigt worden war, dass At γ -COP als ein Bestandteil eines Komplexes

im Cytosol vorkommt (siehe Kap. 3.3.2), kann man davon ausgehen, dass in diesem Fall der Proteinkomplex mit Neomycin präzipitiert wird. Dieser Versuch bestätigt das Ergebnis der Gelfiltration, dass At γ -COP und AtSec23p Bestandteile verschiedener Proteinkomplexe sind.

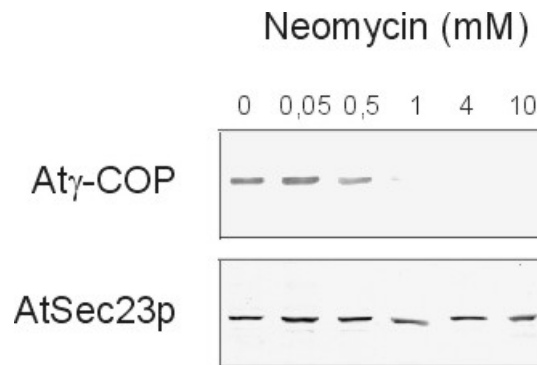


Abb. 3.8: Selektive Fällung von At γ -COP mit Neomycin. AtSec23p wird von Neomycin nicht präzipitiert.

3.4 Membranassoziation von At γ -COP und AtSec23p

Nachdem die löslichen At γ -COP und AtSec23p zum Teil charakterisiert worden waren, sollte nun das Membranbindungsverhalten dieser Proteine untersucht werden. Dabei sollte herausgefunden werden, in welcher Form (peripher oder integral) At γ -COP und AtSec23p mit Membranen assoziiert sind, ob diese Membranbindung spezifisch ist und zu welchen intrazellulären Kompartimenten diese Membranen gehören.

3.4.1 At γ -COP und AtSec23p als periphere Membranproteine

Um festzustellen, in welcher Weise (peripher oder integral) At γ -COP und AtSec23p mit Membranen assoziiert sind, wurden zwei Versuche durchgeführt. Zunächst wurden die mikrosomalen Membranen aus Blumenkohl mit Papain behandelt (siehe Kap. 2.2.4.3). Periphere Membranproteine auf der cytosolischen Seite der Membran sind aufgrund ihrer Lokalisation den Proteasen zugänglich und können nach der Behandlung mit Proteasen abgebaut werden (siehe z. B. Nickel et al., 1994; Conceição et al., 1997). Dagegen sind luminal Proteine vor dem proteolytischen Verdau geschützt. Durch Behandlung der Membranen mit Proteasen wie Papain

und Proteinase K kann geklärt werden, in welcher Form Proteine mit Membranen assoziiert sind. Für den Proteaseverdau wurden mikrosomale Membranfraktionen unterschiedlich lange mit der Protease Papain inkubiert. Wie Abb. 3.9 zeigt wurden membranassoziierte At γ -COP und AtSec23p innerhalb von 30 min vollständig von dem Papain verdaut. Im Gegensatz dazu wurde das luminaire ER-Protein BiP, das als Kontrollprotein diente, nur zu einem geringen Anteil abgebaut. Erst durch Zugabe eines Detergenz (0,1 % Triton X-100) wurde dieses Protein für die Protease zugänglich und verdaut. So konnte gezeigt werden, dass der Abbauschutz von BiP tatsächlich auf seine luminaire Lokalisation zurückzuführen ist. Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten daraufhin, dass At γ -COP und AtSec23p auf der cytosolischen Seite der Membranen liegen.

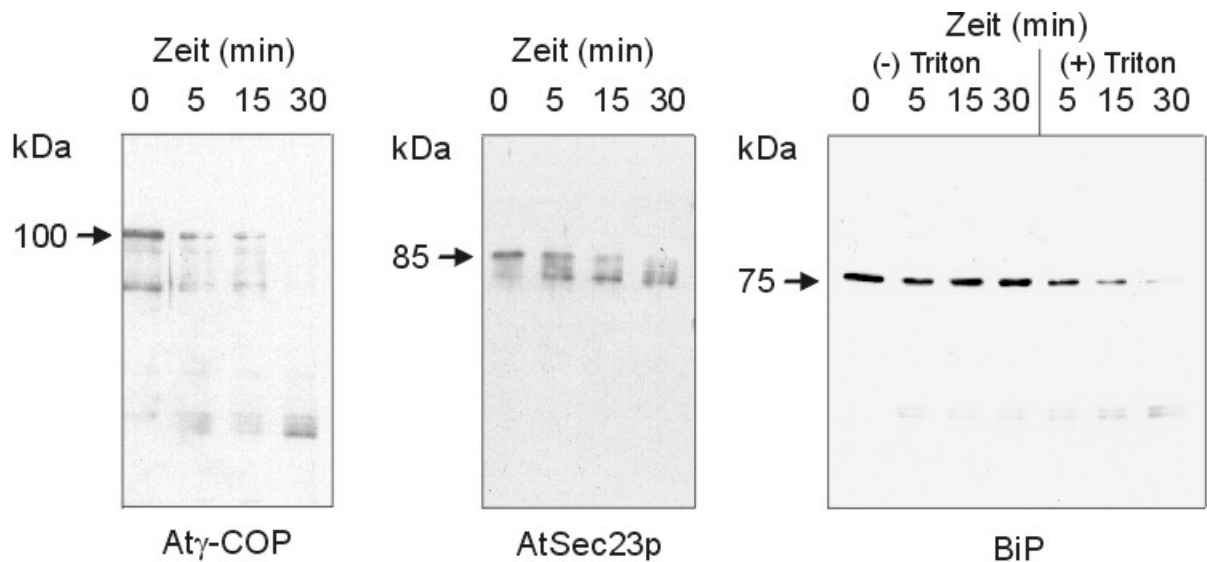


Abb. 3.9: Verdau von At γ -COP und AtSec23p mit Papain. Das luminaire ER-Protein BiP wird nur nach Zugabe von 0,1 % (v/v) Triton X-100 abgebaut.

Eine verbreitete Methode, integrale Membranproteine von peripher an Membranen angelagerten Proteinen zu unterscheiden, ist die Behandlung der Membranen mit verschiedenen Reagenzien. Periphere Membranproteine lassen sich im Gegensatz zu integralen Membranproteinen bereits durch hohe Konzentrationen chaotroper Reagenzien wie Harnstoff, Natriumcarbonat und Kochsalz von der Membran ablösen (Hatefi und Hanstein, 1974). Für die Solubilisierung integraler Membranproteine sind dagegen Detergenzien wie Triton X-100 notwendig (Singer, 1974; Helenius et al., 1979). Durch die Behandlung der Membranen mit diesen Reagenzien wurde versucht, das Ergebnis des proteolytischen Verdaus mit Papain zu vervollständigen. Damit konnte aufgeklärt werden, ob At γ -COP und AtSec23p auf der cytosolischen Seite der Membranen ablösbar sind oder eine integrale Membrandomäne haben. Hierzu wurden mikrosomale Membranfraktionen mit verschiedenen Konzentrationen der oben genannten Reagenzien behandelt und durch eine Zentrifugation von der löslichen Phase getrennt (siehe Kap. 2.2.4.4). Als Kontrolle wurde das Verhalten der PM-ATPase als integrales Membranprotein unter den gleichen Bedingungen untersucht. Dieses Protein konnte nur nach der Behandlung mit Triton X-100 in die lösliche Phase gebracht werden (Abb. 3.10). At γ -COP und AtSec23p waren in Anwesenheit von 0,1 % und 1 % Triton X-100, 2 M Harnstoff und 0,1 M Natriumcarbonat nicht mehr im Sediment, sondern nur noch im Überstand nachweisbar. Diese Hüllproteine wurden also durch diese Behandlung vollständig von den Membranen abgelöst. Die Behandlung der Membranfraktion mit 0,25, 0,5 und 1 M Natriumchlorid konnte zwar die beiden Proteine zum Teil in die lösliche Phase bringen, aber sie waren auch noch an den Membranen nachweisbar. Das kann mit der schwächeren Wirkung von Natriumchlorid im Vergleich zu Natriumcarbonat und Harnstoff erklärt werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei At γ -COP und AtSec23p nicht um integrale Membranproteine, sondern um peripher an den Membranen angelagerte Proteine handelt.

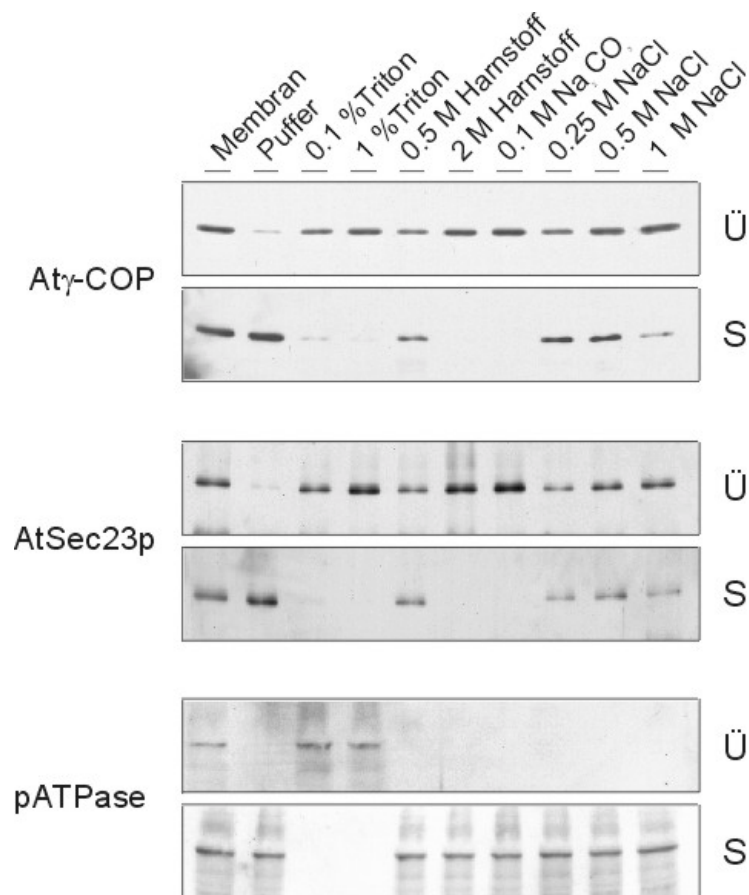


Abb. 3.10: Immunoblots der Sedimente (S) und Überstände (Ü) der Membranfraktionen nach der Behandlung mit verschiedenen Reagenzien und einer anschließenden Zentrifugation. PM-ATPase als ein integrales Protein wird nur mit Triton X-100 solubilisiert. At γ -COP und AtSec23p werden dagegen mit allen Reagenzien von der Membran abgelöst.

3.4.2 Beeinträchtigung der Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p durch niedrige Temperaturen

Niedrige Temperaturen haben einen Einfluss auf den intrazellulären Proteintransport (Tartakoff, 1986, 1987). Wie Sauerstoffmangel (Anoxia) führt eine lange Kälte-Phase zur Ansammlung der Hüllproteine der CCVs im Cytosol der Säugetierzellen (Goud et al., 1985; Merisko et al., 1986a, b). In Pflanzenzellen wurde auch eine Veränderung im Endomembransystem bei niedrigen Temperaturen, möglicherweise als Folge eines verhinderten, vesikelvermittelten Proteintransports, beobachtet (Mollenhauer et al., 1976). Um zu zeigen, dass die Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p durch eine physiologische und nicht durch eine

unspezifische Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen und den Membranen hervorgerufen wird und daher mit einem physiologischen Faktor, wie der Temperatur, beeinflusst werden kann, wurde der Effekt der Kälte auf die Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p untersucht. Dafür wurde eine Blumenkohlpflanze über Nacht für 14 h in einen Kühlraum bei 4 °C gestellt. Am nächsten Tag wurden Cytosol- und Membranfraktionen aus Infloreszenzen der Kälte-behandelten Pflanze und einer Kontroll-Pflanze, die direkt aus dem Gewächshaus genommen wurde, isoliert (siehe Kap. 2.2.2). 20 μ g Protein jeder Fraktion wurden mit TCA gefällt und später der Analyse durch Western-Blotting unterzogen. Die Kreuzreaktion der Antikörper gegen At γ -COP und AtSec23p mit der mikrosomalen Membranfraktion der Kälte-behandelten Pflanzen fiel im Vergleich zur Kontrolle schwächer aus (Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu waren nach der Kältebehandlung beide Proteine in der Cytosolfraction stärker angereichert. Die PM-ATPase, ein integrales Membranprotein, konnte als Kontrolle in den mikrosomalen Membranfraktionen in gleicher Stärke nachgewiesen werden. Die Verteilung dieses Proteins wurde also von der Kälte nicht beeinflusst. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Membranassoziation von At γ -COP und AtSec23p durch Kälte als ein physiologischer Faktor verringert wird und es sich daher nicht um eine unspezifische Bindung an die Membranen handelt.

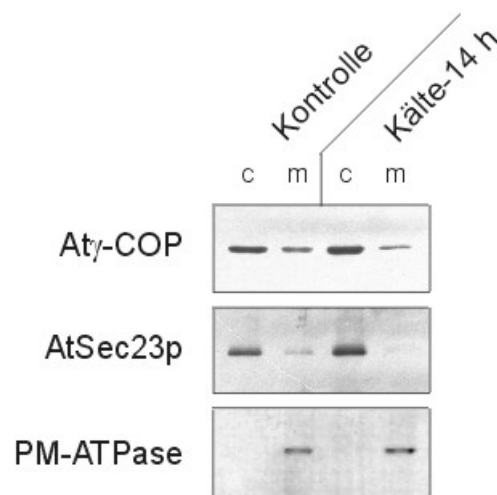


Abb. 3.11: Der Einfluss der Kälte auf die Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p. Kälte verschiebt beide Proteine von der Membranfraktion in die Cytosolfraction. Die Konzentration der PM-ATPase, als integrales Membranprotein, bleibt mit und ohne Kältebehandlung gleich. c: Cytosolfraction; m: mikrosomale Membranfraktion

3.4.3 Einfluss von BFA auf die membrangebundenen At γ -COP und AtArf1p

BFA ist ein Alkaloid aus Pilzen, das in Säugetierzellen die Dissoziation des Coatomers von Membranen verursacht (Donaldson et al., 1992; Scheel et al., 1997). Nach dieser Dissoziation werden die angereicherten v-SNAREs in bestimmten Bereichen des GAPP zugänglich und treten mit t-SNAREs an den ER-Membranen in Wechselwirkung. Das führt zur Fusion von ER und GAPP und zur Mischung ihres Inhalts. In Pflanzenzellen wurde auch ein Transport residenter dictyosomaler Proteine in das ER als ein BFA-Effekt nachgewiesen (Boevink et al., 1998). Mit den Antikörpern gegen At γ -COP und AtArf1p konnte der Einfluss von BFA auf die Bildung der COPI Vesikel am GAPP der Pflanzenzellen erforscht werden. Damit konnte festgestellt werden, ob die Dissoziation des pflanzlichen Coatomers von den Membranen als Ursache für den Transport der Proteine aus dem GAPP in das ER in Frage kommt. Für die BFA-Behandlungen wurden kultivierte BY2-Tabakzellen ausgewählt, weil mit ihnen die Untersuchung des BFA-Effektes in Abhängigkeit von der Zeit durch eine gleichmäßige Aufnahme von BFA in die Zellen möglich war. Außerdem waren die BY2-Tabakzellen für die Beobachtung der intrazellulären, zeitabhängigen Wirkung von BFA mit einem "Confocal Laser Scanning" Mikroskop wegen des niedrig fluoreszierenden Hintergrunds geeignet. Diese wurde parallel zur vorliegenden Arbeit im Labor von Dr. C. Ritzenthaler an der Universität Straßburg (Straßburg, Frankreich) durchgeführt. Für die Behandlung wurden den Tabakzellen pro ml Medium 10 μ g BFA zugegeben (siehe Kap. 2.2.5). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen aus dem Medium entnommen und eingefroren. Cytosol und mikrosomale Membranen wurden aus den Zellen isoliert und durch Western-Blotting wurde der BFA-Effekt auf die membrangebundenen At γ -COP und AtArf1p analysiert. Wie in Abb. 3.12 zu sehen ist, war At γ -COP nach einer 5-minütigen Behandlung mit BFA nicht mehr in der Membranfraktion nachweisbar. Dagegen wurde die Konzentration von AtArf1p in der Membranfraktion erst nach der 30-minütigen Behandlung mit BFA schwächer und konnte nach 5 h Inkubation mit BFA noch in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente das luminale ER-Protein BiP, dessen Membranbindung durch BFA nicht beeinflusst wurde. Das bedeutet, dass BFA in Tabakzellen in sehr kurzer Zeit die Dissoziation des Coatomers von dem membrangebundenen AtArf1p verursacht. Durch Untersuchung der kultivierten BY2-Tabakzellen mit Hilfe der Antikörper gegen At γ -COP und AtArf1p konnte die durch die BFA-Behandlung ausgelöste Dissoziation von At γ -COP von Membranen im "Confocal Laser Scanning" Mikroskop beobachtet werden (Ritzenthaler, persönliche Mitteilung). Dies bestätigte das Ergebnis des oben beschriebenen Experimentes.

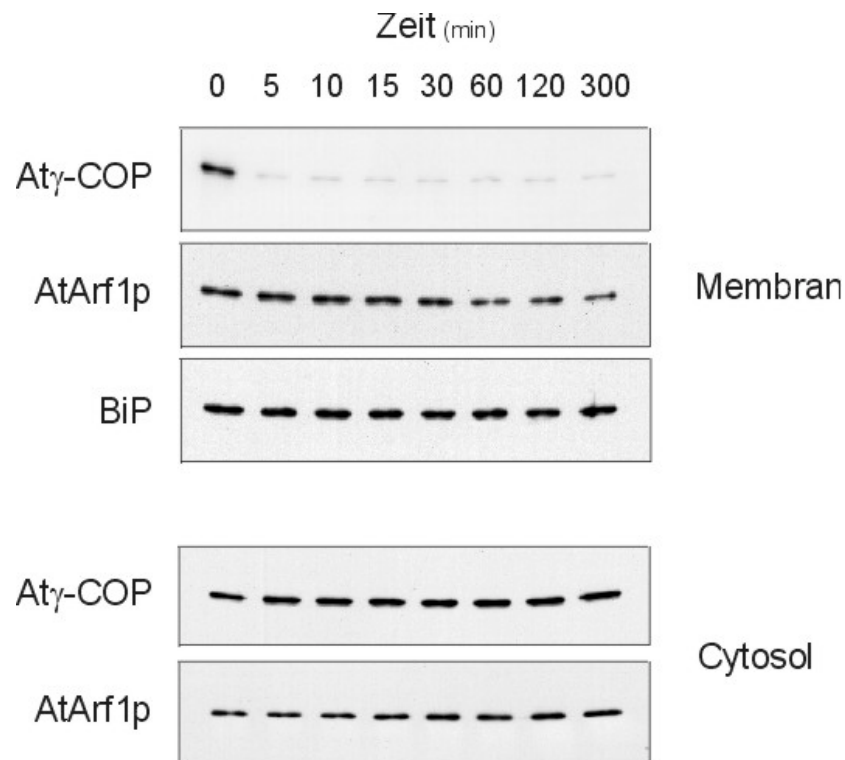


Abb. 3.12: Die Wirkung von BFA auf die membrangebundenen Atγ-COP und AtArf1p. Atγ-COP ist nach einer 5-minütigen Behandlung mit BFA nicht mehr in der Membranfraktion nachweisbar. Die Konzentration des luminalen ER-Proteins BiP wird von BFA nicht beeinflusst.

3.4.4 Gelfiltrationschromatographie der mikrosomalen Membranen

Nachdem gezeigt worden war, dass Atγ-COP und AtSec23p in Pflanzenzellen als periphere Membranproteine (siehe Kap. 3.4.1) spezifisch an Membranen binden (siehe Kap. 3.4.2) und ihre Membranbindung eine physiologische Bedeutung hat (siehe Kap. 3.4.3), wurde in einem weiteren Experiment versucht, die mit Atγ-COP und AtSec23p assoziierten Membranen zu identifizieren. Für die Identifizierung dieser Membranen wurde eine Gelfiltrationschromatographie über eine Sephacryl S-1000-Säule mit einem Trennbereich von 500-100.000 kDa durchgeführt. Durch eine solche Gelfiltration konnten bei Hefe mikrosomale Membranen in PM, Endosomen und Organellen aufgetrennt werden (Huang und Chiang, 1997). Die frisch aus Blumenkohl aufgereinigte mikrosomale Membranfraktion wurde auf eine Sephacryl S-1000-Säule aufgetragen und eluiert (siehe Kap. 2.2.4.1). Die Säule wurde mit L-α-Lecithin vorgewaschen, um die unspezifische Bindung der Membranen zu minimieren. 200 µl Aliquots von 3 ml großen

Fraktionen wurden nach der TCA-Fällung durch Western-Blotting analysiert. Zur Identifizierung der Organellen und Vesikel wurden zusätzlich zu den Antikörpern gegen At γ -COP und AtSec23p, folgende Antikörper verwendet: ein Antikörper gegen BiP als ER-Marker, ein Antikörper gegen RGP für den GApp, ein Antikörper gegen die PM-ATPase für die PM und ein Antikörper gegen β -Adaptin für die CCVs (siehe Kap. 2.8.5.2). Die Elutionsprofile von At γ -COP und AtSec23p waren identisch und zeigten zwei Peaks (Abb. 3.13). Ein Peak lag bei den Fraktionen 14-18 und der andere bei den Fraktionen 26-33. Ähnliche Profile mit zwei Peaks wurden auch mit den ER- (BiP), GApp- (RGP) und CCV- (β -Adaptin) Markern gefunden. Nur die PM-ATPase wurde in einem einzigen Peak in den Fraktionen 15-18 eluiert (Abb. 3.13). Die PM-ATPase kommt als integrales Membranprotein vor und ist daher fest mit der Membran assoziiert. BiP als lösliches, luminales ER-Protein sowie At γ -COP, AtSec23p, RGP und β -Adaptin als extrinsische Membranproteine können dagegen beim Homogenisieren der Zellen zum Teil von den Membranen abgelöst werden. Daher kann man davon ausgehen, dass es sich beim zweiten Peak um von Membranen abdissoziierte Proteine handelt. Eine Bestätigung für diese Aussage ist die Elutionsstelle von Thyroglobulin, das als Molekularmassenmarker eingesetzt wurde. Dieses Protein der Molekularmasse 669 kDa wurde in der Fraktion 29 eluiert (Abb. 3.13).

In den Fraktionen 15-18 waren alle untersuchten Proteine erkennbar. Nur BiP als Markerprotein des ER wurde über mehrere Fraktionen eluiert. Das kann damit geklärt werden, dass ER-Membranen beim Homogenisieren Mikrosomen von sehr variabler Größe bilden. Diese Organellbruchstücke sind auch in Dichtegradienten wegen ihrer unterschiedlichen Schwebedichte in einem weiten Bereich zu finden (Bar-Peled und Raikhel 1997; Hong et al., 1999; Robinson und Hinz, 2000). Um nachzuweisen, dass beim ersten Peak tatsächlich mikrosomale Membranen eluiert wurden, wurde ein Aliquot der Fraktionen 15-18 für 1 h bei 100.000 g_{\max} zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation konnten die sichtbaren Membransedimente von der löslichen Phase getrennt werden. Der Nachweis des nicht dissoziierbaren integralen Membranproteins PM-ATPase kann als Beweis für die Anwesenheit der Membranen in diesen Fraktionen betrachtet werden. Da die Markerproteine der verschiedenen Blumenkohl-Membranen mit dieser Gelfiltration nicht voneinander getrennt werden konnten, gelang es nicht, die mit At γ -COP und AtSec23p assoziierten Membranen zu identifizieren.

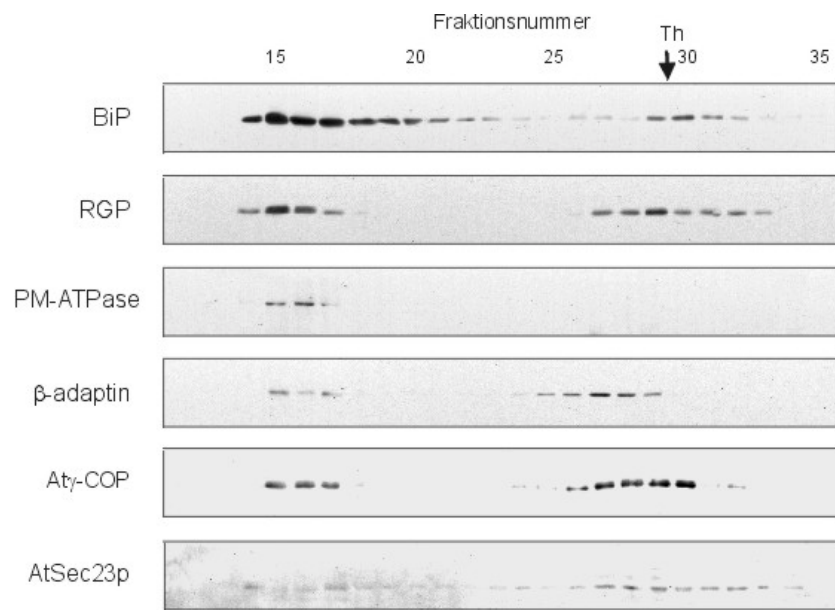


Abb. 3.13: Gelfiltrationschromatographie der mikrosomalen Membranen über die Sephacryl S-1000-Säule. Der Molekularmassenmarker Thyroglobulin (Th: 669 kDa) wurde in der Fraktion 29 eluiert.

3.4.5 Membrangebundene At γ -COP und AtSec23p in Saccharosedichtegradienten

Da die relative Auftrennung der mikrosomalen Membranfraktionen aus Blumenkohl mit der Gelfiltration über die Sephacryl S-1000-Säule nicht möglich war, wurde eine isopyknische Zentrifugation der Membranfraktion im Saccharosedichtegradienten durchgeführt, um sie aufgrund ihrer verschiedenen Dichten aufzutrennen. Die Organellen und ihre Bruchstücke bewegen sich bei der isopyknischen Zentrifugation so lange durch den Gradienten, bis sie einen Punkt erreichen, an dem ihre Dichte mit der des Gradientenmediums übereinstimmt. Dafür muss die Zentrifugation lange genug durchgeführt werden (z. B. 12-16 h bei 100.000 g_{\max} in einem Ausschwingrotor) (Robinson und Hinz, 2000). Durch Verwendung eines vertikalen Rotors kann diese Zeit, wegen der kürzeren Trennstrecke und der höheren g -Zahl, erheblich verkürzt werden. Da membrangebundene Sec21p und Sec23p im Laufe der Zeit durch die GTP-Hydrolyse von Membranen dissoziiert werden, wurde für die Aufarbeitung der mikrosomalen Membranen der vertikale Rotor mit der kürzeren Zentrifugationszeit ausgewählt. Mikrosomale Membranen wurden zuerst durch eine einstündige Zentrifugation auf einem 55%-igen (w/w) Saccharosekissen gesammelt, um ihre Konzentration zu erhöhen (siehe Kap. 2.2.4.2). Diese

Membranfraktion wurde danach auf einem linearen 20-55 % (w/w) Saccharosedichtegradienten unter Plus-Magnesium-Bedingungen aufgetragen und zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen zeigen ER-Membranen eine höhere Schwebedichte, weil die Assoziation der Ribosomen mit ER-Membranen, die magnesiumabhängig ist, erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu werden unter Minus-Magnesium-Bedingung Ribosomen von den ER-Membranen abgelöst. Deshalb haben ER-Membranen in Abwesenheit von Magnesium eine niedrigere Dichte. Dadurch kann das ER von anderen Kompartimenten, wie dem GApp, den CCVs und der Plasmamembran besser getrennt werden. Mit der Beobachtung der Verteilung der verschiedenen Proteine unter Plus- und Minus-Magnesium-Bedingungen, kann festgestellt werden, ob ein Protein im ER vorkommt.

Nach der isopyknischen Zentrifugation wurde die Verteilung der unter Kap. 3.4.4 beschriebenen Markerproteine durch Western-Blotting untersucht. Unter Plus-Magnesium-Bedingungen zeigten BiP und RGP, die Aufschluss über die ER- und Golgi-Membranen geben, eine breite Verteilung mit einem Peak bei einer Saccharosedichte von 37 % (w/w) (Abb. 3.14). Bei der Kreuzreaktion der beiden Antikörper mit den ersten Fraktionen in einem Saccharosedichtebereich von 20-22 % (w/w) handelt es sich möglicherweise um die von den Membranen abdissoziierten Proteine, die nun als lösliche Proteine auf dem Gradienten vorkommen. Die PM war in höheren Saccharosedichten im Bereich von 41-43 % (w/w) nachweisbar. Diese hohe Dichte der PM kann mit der Assoziation von Zellwandbruchstücken erklärt werden. β -Adaptin-enthaltende Fraktionen traten in Saccharosedichten von 38-45 % (w/w) auf. Es wurde nachgewiesen, dass dieses Protein sowohl mit CCVs als auch mit der PM assoziiert ist (Robinson 1987; Drucker et al., 1995). Die β -Adaptin-Verteilung überlappte zum Teil mit der PM-ATPase, war im Vergleich jedoch in einem breiteren Saccharosedichtebereich zu finden. Daher kann man davon ausgehen, dass diese Kreuzreaktion nicht nur die Verteilung der PM, sondern auch die der CCVs widerspiegelt. Es ist auch möglich, dass mit Clathrin assoziierte Golgielemente bei der Homogenisation von anderen Zisternen abgetrennt werden und in diesen Fraktionen neben den CCVs vorkommen (siehe Kap. 1.2) (Robinson, 1985). Die Verteilungsprofile von At γ -COP und AtSec23p zeigten drei Peaks (Abb. 3.14), wobei der Nachweis von AtSec23p in dem Saccharosedichtegradienten sehr schwierig war. Hier hatten sich vermutlich die membrangebundenen COPII-Hüllproteine durch die Aufarbeitung der Membranen unter Verwendung verschiedener Saccharoselösungen (für Saccharosekissen und Saccharosedichtegradienten) von den Membranen abgelöst. Bei dem ersten Peak von At γ -COP und AtSec23p auf dem Gradienten handelte es sich um von Membranen abdissoziierte Proteine, die nun als lösliche Proteine vorkamen. Der zweite Peak war mit den ER/Golgi-Fractionen kolokalisiert und der dritte lag mit einer Saccharosedichte von 43-46 % in einem Bereich, der typisch für Transportvesikel ist (Robinson und Hinz, 2000).

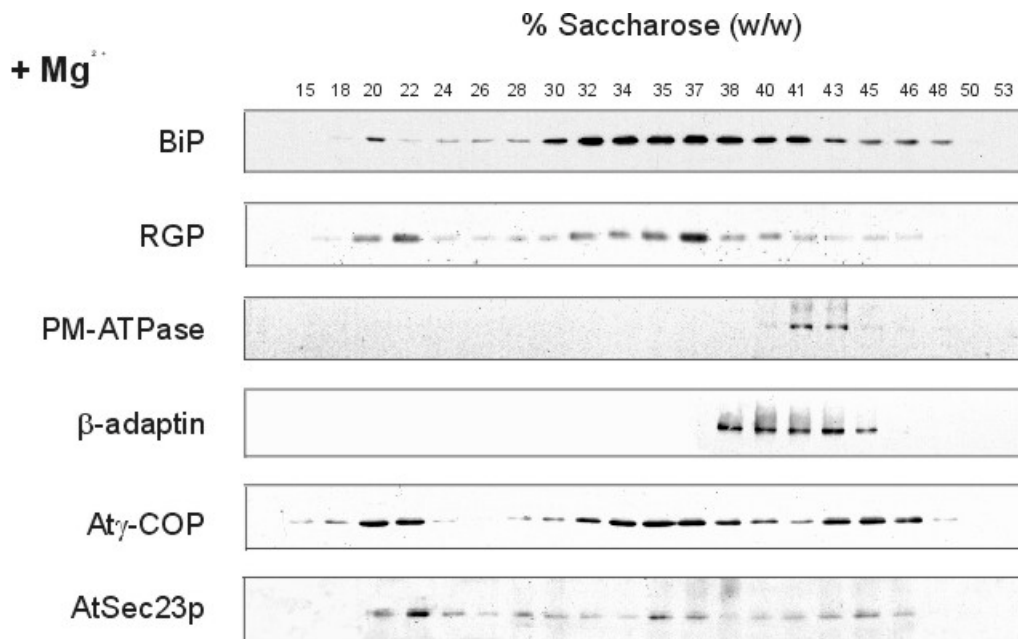


Abb. 3.14: Verteilung der mikrosomalen Membranen in einem Saccharosedichtegradienten unter Plus-Magnesium-Bedingungen.

Um eine Auftrennung von ER und GApp im Saccharosedichtegradienten zu erreichen, wurden die Verteilung der mikrosomalen Membranen von Blumenkohl unter Minus-Magnesium-Bedingungen untersucht (siehe Kap. 2.2.4.2). Dabei sollte festgestellt werden, ob At γ -COP und AtSec23p mit ER oder GApp assoziiert sind. Unter diesen Bedingungen zeigte der ER-Marker BiP eine klassische Verschiebung zu niedrigeren Saccharosedichten mit einem Peak bei 29 % (w/w) Saccharose (Abb. 3.15). Eine kleinere, aber auffällige Verschiebung (von einem Peak bei 37 % zu einem Peak bei 34 % (w/w) Saccharose) wurde auch mit dem GApp-Marker RGP beobachtet. Das wurde durch die in Abb. 3.15 dargestellte Verteilung der Aktivität der latenten IDPase, die ein Markerenzym für den GApp ist, bestätigt. Die Verteilungsprofile der PM-ATPase und von β -Adaptin entsprachen den Plus-Magnesium-Bedingungen und blieben unbeeinflusst von der Magnesiumkonzentration. Die At γ -COP und AtSec23p enthaltenden Fraktionen traten bei diesem Versuch auch in drei distinkten Proteinpeaks auf, wobei bei beiden Proteinen nur der zweite Peak eine Verschiebung zu einer niedrigeren Saccharosedichte zeigte. Während die Verschiebung von AtSec23p vergleichbar mit der von BiP war, überlappte der zweite Proteinpeak von At γ -COP mit BiP und RGP. Der Vergleich der Gradienten unter Plus- und Minus-Magnesium-Bedingungen konnte zeigen, dass Atsec23p mit den ER-Membranen und At γ -

COP mit den Membranen des GApp und/oder des ER assoziiert sind. Darüber hinaus sind diese Proteine auch in den Fraktionen mit hoher Saccharosedichte nachweisbar. Es ist möglich, dass in diesen Fraktionen COP Vesikel vorkommen, deren Proteinhülle noch nicht dissoziiert ist.

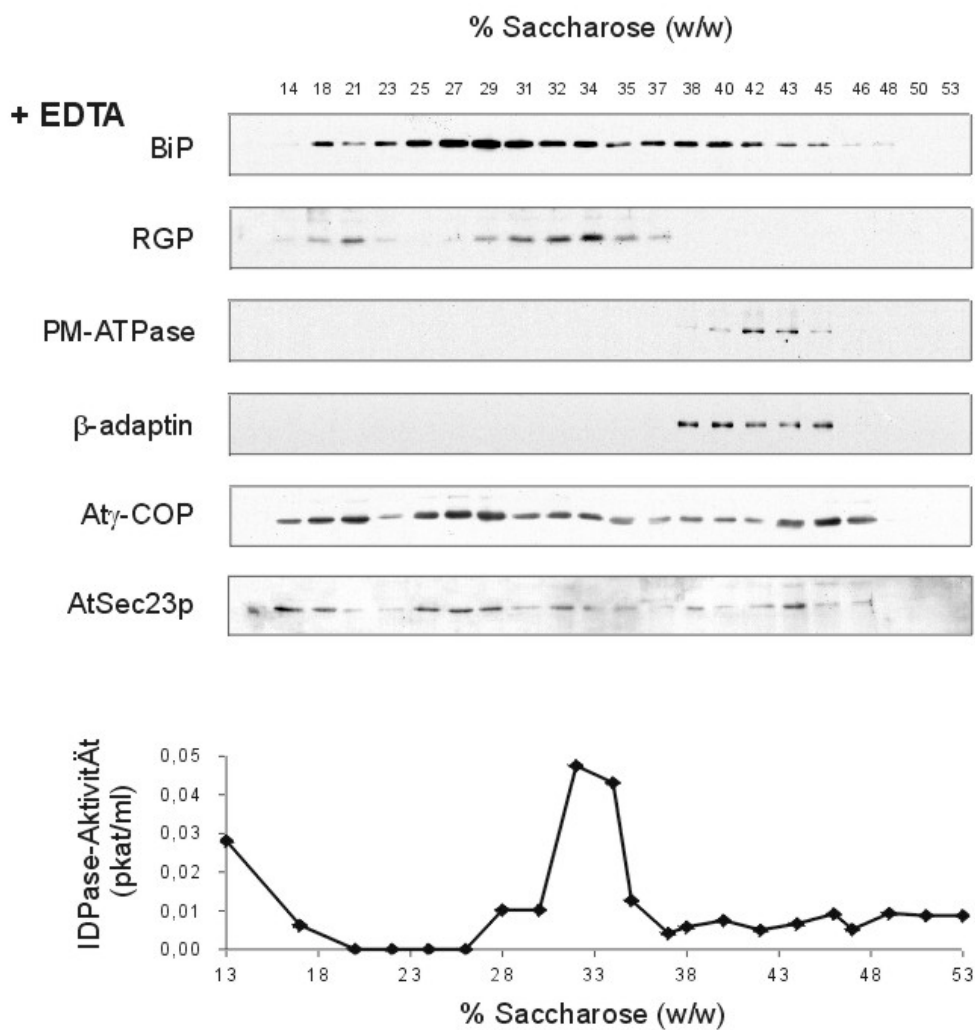


Abb. 3.15: Verteilung der mikrosomalen Membranen in einem Saccharosedichtegradienten unter Minus-Magnesium-Bedingungen. Die Aktivität der latenten IDPase als Markerenzym für den GApp und die Verteilung von RGP sind vergleichbar und bestätigen sich gegenseitig.

3.5 Lokalisierung der COPI-Hüllproteine in Wurzelspitzenzellen

Mit der Saccharosedichtegradientenzentrifugation wurde nachgewiesen, dass die Hüllproteine der pflanzlichen COP Vesikel sowohl in der ER/GApp-Fraktion als auch in einer Membranfraktion von hoher Dichte angereichert werden. Nun sollte mit Hilfe der Immunlokalisierung von COPI-Proteinen geklärt werden, mit welchen intrazellulären Strukturen diese Proteine assoziiert sind. Dafür wurde zunächst versucht, COPI-Hüllproteine in den Zellen von Blumenkohlinfloreszenzen zu lokalisieren. Diese Zellen wurden nach einer Aldehyd-/Osmiumfixierung in Kunststoff (London Resin White) eingebettet und mit einem Ultramikrotom geschnitten. Mit keinem der Antikörper gegen Hüllproteine der pflanzlichen COPI Vesikel konnte eine signifikante Markierung innerhalb der Zellen beobachtet werden. Daher wurde mit Hilfe der Tokuyasu-Technik (Tokuyasu, 1980, 1986) versucht, eine bessere Lokalisierung der relevanten Proteine zu erreichen (siehe Kap. 2.9.2). Die Zellen werden hierbei lediglich nach einer leichten Aldehydfixierung mit einer Saccharoselösung infiltriert und anschließend eingefroren. Sie werden dann bei niedrigen Temperaturen, meist zwischen -95 und -120 °C geschnitten (siehe Kap. 2.9.3). Das heißt, es wird keine Entwässerung, die die Antigenität vieler Proteine schwächen kann, und keine Einbettung in Kunststoff, die die Antigene teilweise maskiert, durchgeführt. Da die Antigene geschont werden, kann mit dieser Methode bei der Immunlokalisierung von Proteinen oft eine größere Markierungsdichte erreicht werden (van Bergen en Henegouwen, 1989). Für die Durchführung der Tokuyasu-Technik bei Pflanzenzellen sind die großen Unterschiede bezüglich der mechanischen Eigenschaften der gefrorenen, zellulären Kompartimente problematisch. Insbesondere Stärkekörner in Amyloplasten, Zellwände und Vakuolen beeinträchtigen die Herstellung von guten Kryoschnitten. Erste Immunmarkierungen der Blumenkohlinfloreszenzen wiesen zudem einen erheblichen unspezifischen Hintergrund auf. Mit dem Ausweichen auf Arabidopsis- bzw. Maiswurzelspitzen wurde das verhindert, da diese Gewebe vermutlich weniger glykolisierte Proteine enthalten. Zudem erwies es sich als Vorteil, die Pflanzen zu bearbeiten, gegen deren Proteine die COPI-Antikörper gerichtet waren.

Zu Beginn der Immunogoldmarkierung der Kryoschnitte wurden die gewonnenen Antiseren gegen Hüllproteine der pflanzlichen COPI Vesikel verwendet. Dabei wurden zwar Dictyosomen markiert, allerdings wiesen auch Zellwände und Stärkekörner in Amyloplasten eine Markierung auf. Daher wurden Immunglobuline aller vorhandenen Antiseren über eine Protein A-Sepharose Säule aufgereinigt (siehe Kap. 2.7). Nach Immunogoldmarkierung der Kryoschnitte von Arabidopsis- und Maiswurzelspitzen mit den so gewonnenen Antikörpern war sowohl an den seitlichen Enden der Zisternen als auch in unmittelbarer Nähe am *cis*-, *median*- und *trans*-Bereich der Dictyosomen eine Markierung zu sehen (siehe Abb. 3.16, 3.17 und 3.18). Im Lumen der

Zisternen und im Cytoplasma konnten jedoch kaum Goldpartikel gefunden werden. Die Markierung in der Nähe der Zisternen fand sich oft an kleinen Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa 60 nm, deren 10-15 nm dicke cytoplasmatische Proteinhülle im Elektronenmikroskop auffiel (siehe Abb. 3.16, 3.17 und 3.18). Die markierten Vesikel hatten eine sehr große Ähnlichkeit mit COP Vesikeln auf Kryoschnitten von Säugetierzellen (siehe z. B. Orci et al., 1997). Diese Vesikel waren eindeutig keine CCVs, die mit ihrer 25-30 nm dicken Proteinhülle im *trans*-Bereich der Dictyosomen zu sehen waren (Abb. 3.17 B). Sowohl CCVs als auch Schleimvesikel, die besonders in den Zellen der Maiswurzelhaube vorkommen (Mollenhauer und Morré, 1994), wurden mit den COP-Antikörpern nicht markiert (Abb. 3.16 B und 3.17 B). Das bestätigt die Vermutung, dass die mit den COP-Antikörpern markierten Vesikel pflanzliche COPI Vesikel sind, die somit in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen werden konnten. Die Lokalisierung von AtArf1p in Zellen der Maiswurzelspitzen führte zu einem vergleichbarem Ergebnis. Mit dem Antikörper gegen AtArf1p wurden Dictyosomen und die 60 nm großen COPI Vesikel markiert (Abb. 3.17 C, D). Damit konnten eindeutig zwei intrazelluläre Strukturen (GApp und COPI Vesikel) identifiziert werden, mit denen Hüllproteine der COPI Vesikel assoziiert sind. Deshalb kann angenommen werden, dass es sich bei dem zweiten Peak von At γ -COP im Saccharosegradienten um die Membranen des GApp und beim dritten Peak um COPI Vesikel handelt.

Um eine genaue Zuordnung der pflanzlichen COPI-Hüllproteine bzw. COPI Vesikel zu den verschiedenen Bereichen des GApp treffen zu können, wurde eine statistische Analyse der Immunogoldmarkierungen durchgeführt. Dafür wurde die Verteilung der Goldpartikel anhand von 25 Dictyosomen für jede Markierung mit dem jeweiligen COPI-Antikörper ausgewertet. Dabei wurden die Goldpartikel an den Zisternen und an den Vesikeln gezählt. Um eine Zuordnung der COPI Vesikel zum GApp zu gewährleisten, wurden ausschließlich Vesikel in die Statistik aufgenommen, die nicht weiter als 250 nm von einem Dictyosom entfernt waren. *Cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel wurden aufgrund der zisternalen und der interzisternalen Breite unterschieden (siehe Kap. 1.2). Die Auszählung, deren Ergebnis in Tabelle 3.1 dargestellt ist, ergab eine ungleichmäßige Verteilung der Goldpartikel an den Zisternen sowie an den Vesikeln. Beim Vergleich der Markierung der Zisternen und Vesikel konnte festgestellt werden, dass durchschnittlich mehr als 80 % der Goldpartikel an COP Vesikeln in der Nähe der Zisternen zu finden waren. Die Markierung der Vesikel fand sich überwiegend in der Nähe des *cis*-Bereichs der Dictyosomen. Alle Zisternen der Dictyosomen zeigten eine Immunogoldmarkierung. In diesem Fall waren auch die *cis*-Zisternen stärker als andere Zisternen und das TGN markiert. Die Hüllproteine der COPI Vesikel waren also in den untersuchten Pflanzenzellen sowie in Säugetierzellen (Oprins et al., 1993) hauptsächlich im *cis*-Bereich der Dictyosomen lokalisiert.

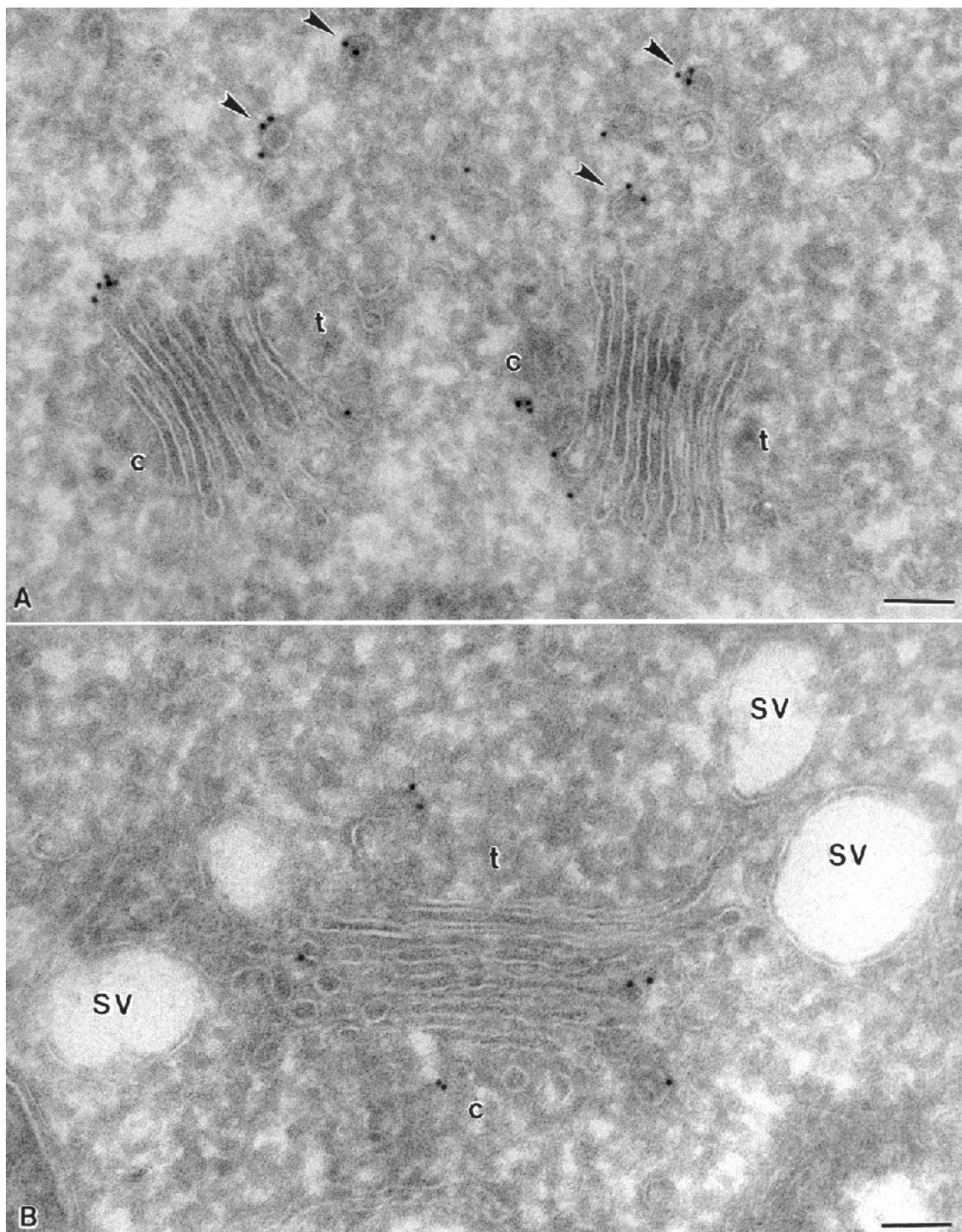


Abb. 3.16: Immunogoldmarkierung auf Kryoschnitten von Maiswurzelspitzen mit dem Antikörper gegen At γ -COP. A) Markierung der Dictyosomen und der COPI Vesikel. Pfeilspitzen deuten auf markierte COPI Vesikel. B) Schleimvesikel (SV) sind im Gegensatz zu den COPI Vesikeln nicht markiert. c, t = *cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel; Strichlänge 100 nm.

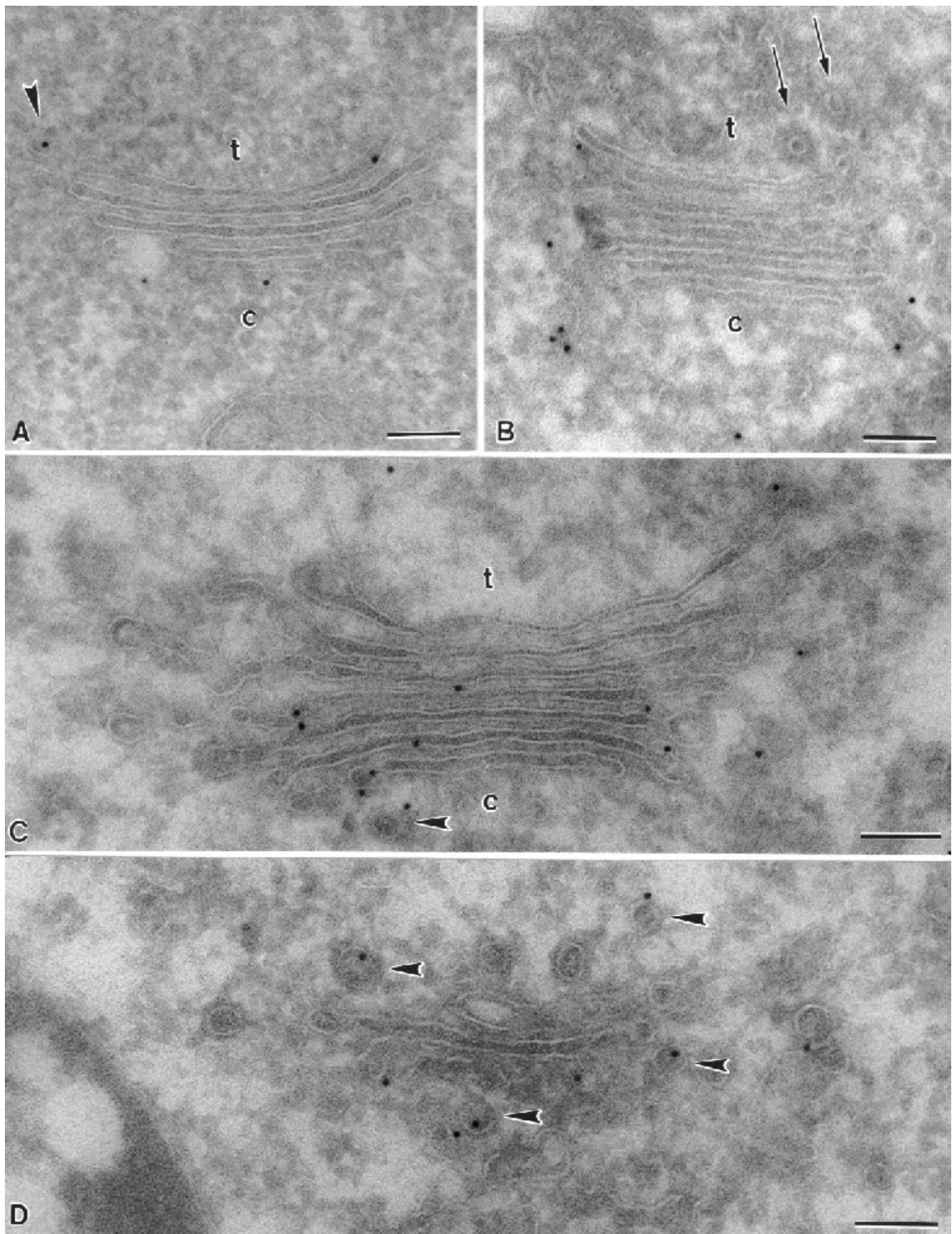


Abb. 3.17: Immunogoldmarkierung auf Kryoschnitten von Maiswurzelspitzen mit den Antikörpern gegen Zm- δ -COP (A), Zm- ϵ -COP (B) und AtArf1p (C und D). Pfeilspitzen deuten auf markierte COPI Vesikel, Pfeile auf CCVs. c, t = *cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel. Strichlänge 100 nm.

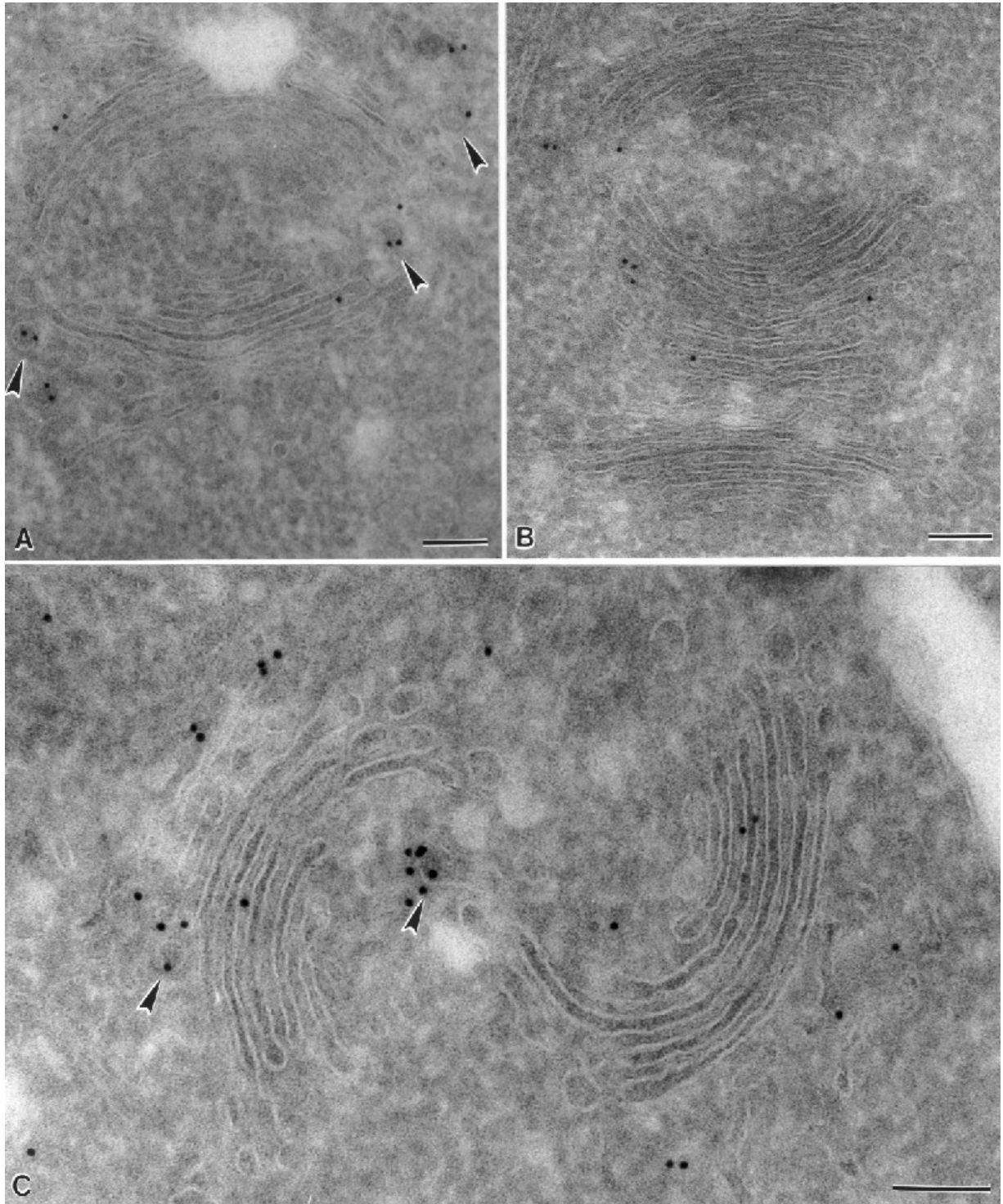


Abb. 3.18: Immunogoldmarkierung auf Kryoschnitten von Arabidopsiswurzelspitzen mit den Antikörpern gegen At γ -COP (A), Zm- δ -COP (B) und Zm- ϵ -COP (C). Pfeilspitzen deuten auf markierte COPI Vesikel. c, t = *cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel. Strichlänge 100 nm.

Tabelle 3.1: Verteilung der Immunogoldmarkierung mit Antikörpern gegen pflanzliche COPI Vesikel an Dictyosomen auf Kryoschnitten von Arabidopsis- und Maiswurzelspitzen. Für jeden Antikörper wurde die Verteilung der Goldpartikel an 25 Dictyosomen ausgezählt.

Pflanze	Antikörper	Goldpartikel an Zisternen					Goldpartikel an Vesikeln		Gesamtzahl der Goldpartikel	Goldpartikel pro Dictyosom
		<i>cis-most</i>	<i>cis</i>	median	<i>trans</i>	TGN	<i>cis-Hälfte</i>	<i>trans-Hälfte</i>		
Mais	Atγ-COP	9 (5,2 %)	8 (4,7 %)	6 (3,5 %)	6 (3,5 %)	3 (1,8 %)	78 (45,3 %)	62 (36,0 %)	172	6,88
	Zmδ-COP	8 (8,2 %)	5 (5,1 %)	4 (4,1 %)	4 (4,1 %)	2 (2,0 %)	42 (42,8 %)	33 (33,7 %)	98	3,92
	Zmε-COP	9 (6,0 %)	4 (2,7 %)	4 (2,7 %)	3 (2,0 %)	3 (2,0 %)	68 (45,3 %)	59 (33,3 %)	150	6,00
Arabi- dopsis	Atγ-COP	6 (3,3 %)	3 (2,2 %)	1 (0,6 %)	2 (1,1 %)	1 (0,6 %)	95 (52,8 %)	71 (39,4 %)	180	7,20
	Zmδ-COP	5 (6,3 %)	3 (3,8 %)	1 (1,2 %)	1 (1,2 %)	0 (0,0 %)	44 (55,0 %)	26 (32,5 %)	80	3,20
	Zmε-COP	10 (5,8 %)	5 (2,9 %)	3 (1,8 %)	3 (1,8 %)	1 (0,6 %)	95 (55,6 %)	54 (31,5 %)	171	6,84

3.6 Lokalisierung von AtSec21p in Zellen von Erbsenkotyledonen

In Kotyledonenzellen von Erbsen gibt es neben lytischen Vakuolen Proteinspeichervakuolen (PSV), in denen Speicherproteine wie Legumin und Vicilin gelagert werden (Hoh et al., 1995; Robinson et al., 1995; Müntz, 1998). Am Transport der Speicherproteine vom GApp zur PSV sind elektronendichte Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 130-150 nm, jedoch keine CCVs, beteiligt (Hohl et al., 1996; Robinson et al., 1997; Robinson und Hinz, 1999). Diese Vesikel, die auch in Samen von anderen Pflanzen nachgewiesen wurden (zur Nieden et al., 1984; Levanony et al., 1992; Hara-Nishimura et al., 1993, 1995; Herman, 1994), werden wegen ihres elektronendichten Inhalts als "Dense Vesicles" (DVs) bezeichnet (Hohl et al., 1996). DVs sind gleichmäßig am *cis*-, median- und *trans*-Bereich des GApp sowie am TGN verteilt und oft ist ihre Verbindung mit Zisternen zu erkennen (Hohl et al., 1996). Sie scheinen an *cis*-Zisternen gebildet, aber erst im *trans*-Bereich freigesetzt zu werden. Speicherproteine werden hauptsächlich im *cis*-Bereich in die DVs sortiert (Hillmer et al., 2001). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass CCVs im *trans*-Bereich des GApp direkt von DVs abknospen können (Hohl et al., 1996; Robinson et al., 1997, 1998). Größere elektronendurchlässige glatte Vesikel, die am Transport von Zellwandpolymeren zum Extrazellulärraum beteiligt sind, wurden auch im *trans*-Bereich des GApp nachgewiesen

(Staehein et al., 1991; Zhang und Staehein, 1992). Bislang wurde die Existenz der COPI Vesikel in Erbsenkotyledonen nicht nachgewiesen und auch ihre mögliche Beziehung zu DVs war nicht bekannt. Daher sollte gezeigt werden, ob es sich bei DVs um einen anderen Vesikeltyp als COPI Vesikel handelt. Für dieses Zweck wurden Erbsenkotyledonen mit der Tokuyasu-Technik aufgearbeitet (siehe Kap. 2.9.2) und mit dem Antikörper gegen At γ -COP markiert. Da Erbsenkotyledonen aus extrem großen und stark vakuolisierten Zellen bestehen und zudem stärkehaltige Plastiden besitzen, war der Strukturerehalt der Zellen in Gefrierschnitten nicht optimal. Trotzdem waren Zellorganellen wie ER und GApp gut erkennbar. Wie Abb. 3.19 zeigt, konnten mit dem Antikörper gegen At γ -COP kleine 60 nm große Vesikel an Dictyosomen markiert werden. DVs, die eindeutig in den Kryoschnitten zu erkennen waren, zeigten dagegen keine Markierung. Auf Kryoschnitten konnten auch von DVs abknospende CCVs im *trans*-Bereich der Dictyosomen gesehen werden (Abb. 3.19). So konnte gezeigt werden, dass COPI Vesikel einen grundlegend anderen Vesikeltyp als DVs darstellen. Daraus folgt, dass am GApp der Erbsenkotyledonen mindestens vier verschiedene Vesikeltypen (COPI Vesikel, DVs, CCVs und glatte Vesikel) vorkommen.

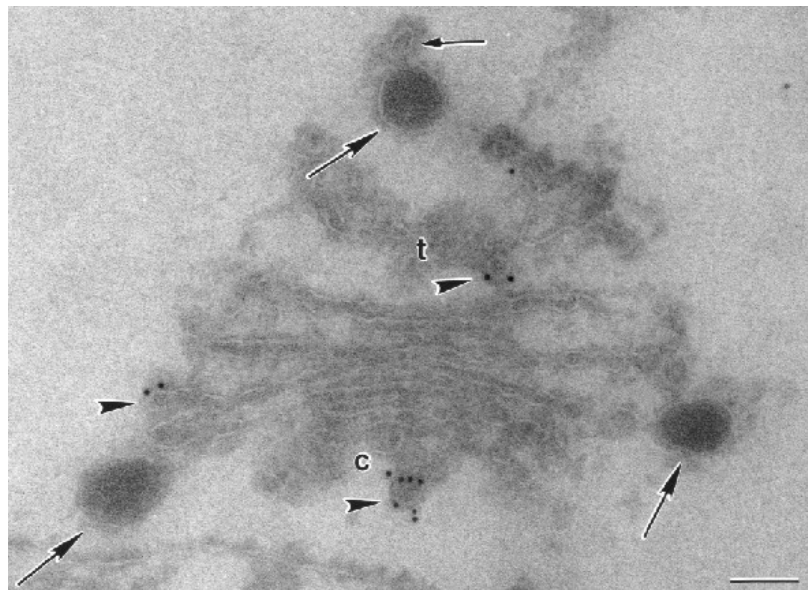


Abb. 3.19: Immunogoldmarkierung des GApp von Erbsenkotyledonen mit dem Antikörper gegen At γ -COP. Im *trans*-Bereich des Dictyosoms ist ein abknospender CCV an einem DV zu sehen. Pfeilspitzen deuten auf markierte COPI Vesikel, kleine Pfeile auf CCV und große Pfeile auf DVs. c, t = *cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel. Strichlänge 100 nm.

3.7 Elektronenmikroskopischer Nachweis für den Rücktransport von Proteinen aus dem *cis*-Bereich des GApp

COPI Vesikel sind in Hefe und Säugetierzellen am Rücktransport von ER-Proteinen, wie z. B. Calreticulin (siehe Kap. 1.1), aus dem GApp beteiligt (Pelham, 1988; siehe auch Kap. 1.2). In Pflanzenzellen wurde ebenfalls ein Rücktransport von Proteinen aus dem GApp postuliert (Crofts et al., 1999; Gomord et al. 1999; Pagny et al., 1999). Nach der Identifizierung und Charakterisierung der Hüllproteine der COPI Vesikel und deren Lokalisierung am *cis*-Bereich des GApp in Pflanzenzellen wurde versucht, die Funktion dieser Vesikel durch Identifizierung ihrer putativen Frachtmoleküle zu untersuchen. Dafür wurde zunächst auf den Kryoschnitten der Maiswurzelspitzen eine Markierung mit dem Antikörper gegen Calreticulin durchgeführt. Dieser Antikörper markierte Kernhüllen und ER-Membranen sehr spezifisch und stark (Abb. 3.20). Im Vergleich dazu konnten keine Goldpartikel an Dictyosomen oder an kleinen Vesikeln gesehen werden. Das bedeutet, dass dieses molekulare Chaperon in Pflanzenzellen entweder nicht vom ER zum GApp transportiert wird, oder die Konzentration der transportierten Moleküle sehr gering und somit nicht nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Versuch die Wurzelspitzen von transformierten Tabakpflanzen untersucht. Diese Pflanzen synthetisieren α -Amylase mit einer am Carboxyterminus angefügten HDEL-Sequenz (Phillipson et al., 2001). Nicht transformierte und mit α -Amylase (ohne HDEL-Sequenz) transformierte Tabakpflanzen dienten dabei als Kontrolle. Die transformierten Pflanzen wurden parallel zur vorliegenden Arbeit zur *in vitro* Induktion der COPI und COPII Vesikel und zur Untersuchung des Frachttransports und der Funktion der HDEL-Sequenz an einem Sekretprotein verwendet (Phillipson et al., 2001). Mit der Messung der α -Amylase-Aktivität im Anzuchtmedium (siehe Kap. 2.6) wurde festgestellt, dass dieses Protein von beiden transformierten Pflanzen ins Medium sekretiert wird. Daher war die Funktion der HDEL-Sequenz dieses sekretorischen Proteins beim möglichen Rücktransport der α -Amylase-HDEL aus dem GApp nicht klar. Wurzelspitzen der Tabakpflanzen wurden genauso wie Wurzelspitzen von Arabidopsis (siehe Kap. 3.5) mit der Tokuyasu-Technik aufgearbeitet (siehe Kap. 2.9.2) und einer Markierung mit einem Antikörper gegen α -Amylase unterzogen. Bei beiden transformierten Pflanzen konnte eine dichte α -Amylase Markierung im ER (inklusive Kernhülle), im GApp und in der Zellwand festgestellt werden (siehe Abb. 3.21 und 3.22). Die Spezifität des Antikörpers wurde an Wildtyppflanzen überprüft. Diese zeigten keine Markierung der jeweiligen Kompartimente (siehe Abb. 3.21 C). Bei der Markierung der Dictyosomen fiel ein wichtiger Unterschied zwischen beiden transformierten Pflanzen auf. Während bei den mit α -Amylase transformierten Pflanzen alle Zisternen markiert waren, war die Markierung im GApp der mit α -Amylase-HDEL transformierten Pflanzen oft nur

in den *cis*-Zisternen zu finden (siehe Abb. 3.22 A). Die statistische Auswertung der Immunogoldmarkierung anhand von jeweils 20 Dictyosomen ergab bei den mit der α -Amylase transformierten Pflanzen eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel in allen Zisternen des GApp (Tabelle 3.2). Die mit der α -Amylase-HDEL transformierten Pflanzen zeigten jedoch eine intensive Markierung des *cis*-Bereiches des GApp (Tabelle 3.2). In mit der α -Amylase-HDEL transformierten Pflanzenzellen waren 72,1 % der Goldpartikel in der *cis*-most-Zisterne und 16,1 % in der *cis*-Zisterne zu finden. Die weiteren Zisternen wiesen lediglich rund 10 % der Markierung auf. Die Markierung der Zellwand und die Tatsache, dass außer *cis*-Zisternen auch andere Zisternen leicht markiert wurden, war ein Hinweis darauf, dass die α -Amylase-HDEL wie α -Amylase ohne HDEL-Sequenz von den transformierten Tabakpflanzen sekretiert wird. Dieses Enzym konnte deshalb im Anzuchtmedium der beiden Pflanzen nachgewiesen werden. Die statistischen Daten zeigten aber eine größere Konzentration der α -Amylase-HDEL im *cis*-Bereich des GApp. Da die α -Amylase ohne HDEL-Sequenz gleichmäßig in allen Zisternen des GApp verteilt war, kann die hohe Konzentration der α -Amylase-HDEL auf die HDEL-Sequenz zurückgeführt werden. Diese Sequenz, die in Hefe sowie in Pflanzenzellen als Retentionssignal für viele ER-Proteine fungiert (Pelham, 1988; Denecke et al., 1992), führt mit großer Wahrscheinlichkeit zum Rücktransport der HDEL- α -Amylasemoleküle in COPI Vesikeln zum ER und verhindert in Tabakzellen den Weitertransport eines großen Anteils der α -Amylasemoleküle zum *trans*-Bereich des GApp. Diese Sequenz kann aber die Sekretion der α -Amylase in transformierten Tabakpflanzen nicht vollständig verhindern.

Tabelle 3.2: Quantifizierung der Immunogoldmarkierung mit dem Antikörper gegen α -Amylase auf Kryoschnitten von Wurzelspitzen der mit α -Amylase und α -Amylase-HDEL transformierten Tabakpflanzen.

Transformierte Pflanzen	Zahl der Dictyosomen	Goldpartikel in Zisternen					Gesamtzahl der Goldpartikel	Goldpartikel pro Dictyosom
		<i>cis</i> -most	<i>cis</i>	median	<i>trans</i>	TGN		
α -Amylase	20	19 (22,1 %)	17 (19,8 %)	16 (18,6 %)	16 (18,6 %)	18 (20,9 %)	86	4,3
α -Amylase-HDEL	20	48 (72,1 %)	11 (16,1 %)	3 (4,4 %)	2 (2,9 %)	3 (4,4 %)	68	3,4

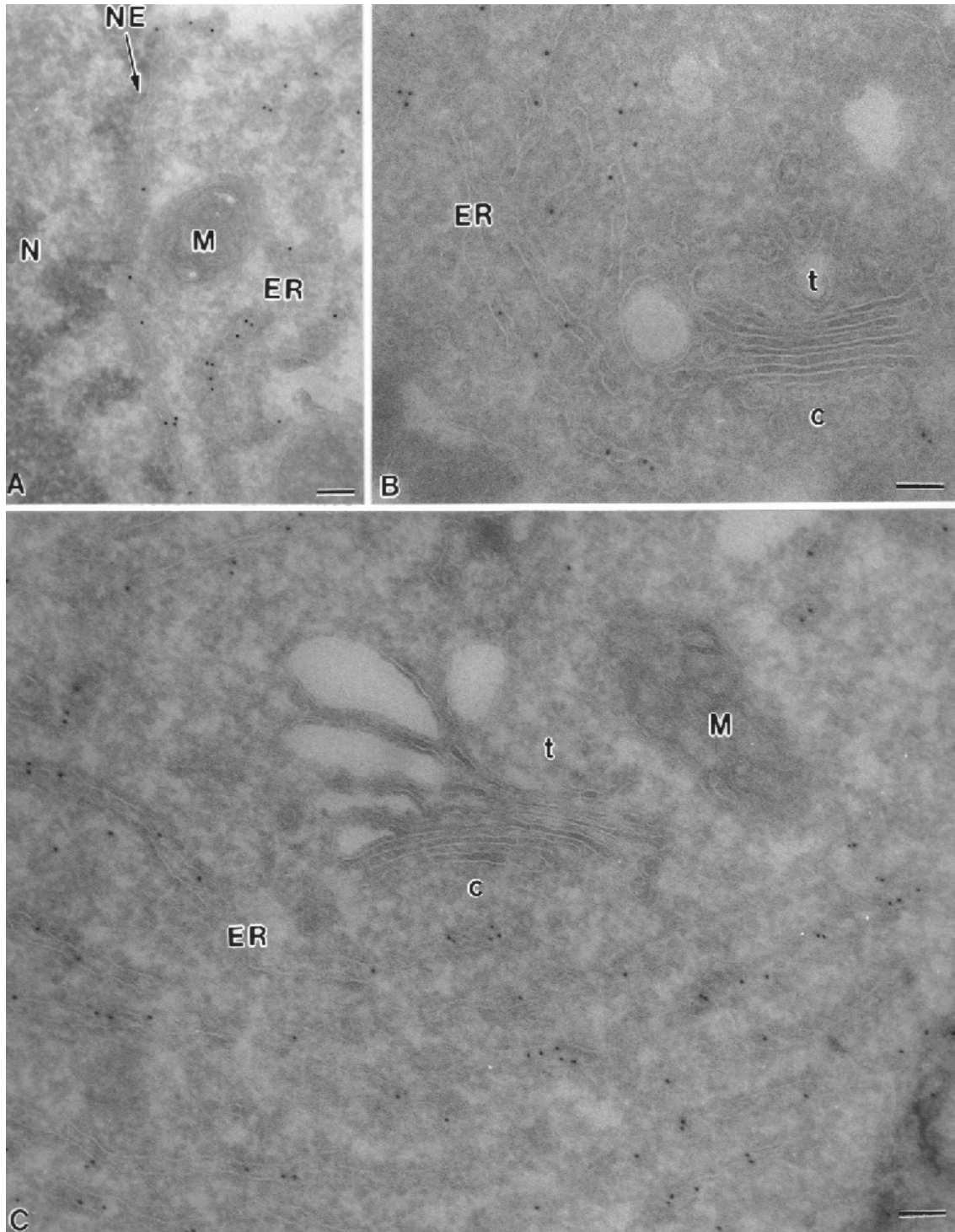


Abb. 3.20: Immunogoldmarkierung auf Kryoschnitten von Maiswurzelspitzen mit dem Antikörper gegen Calreticulin. Das ER und die Kernhülle (A-C) sind im Gegensatz zu den Dictyosomen (B und C) markiert. M = Mitochondrion; N = Zellkern; NE = Kernhülle; c, t = *cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel. Strichlänge 100 nm.

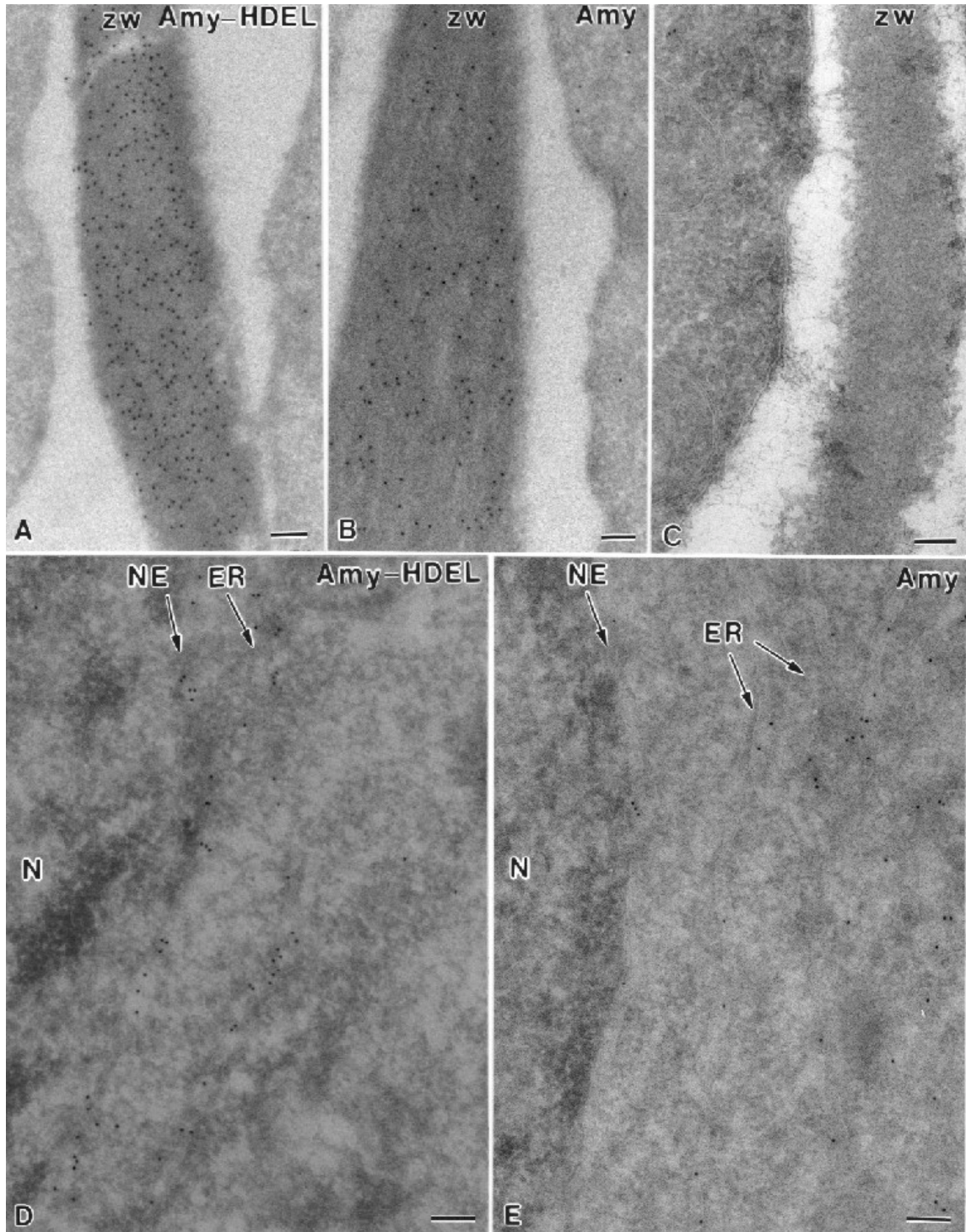


Abb. 3.21: Immunogoldmarkierung auf Kryoschnitten von Tabakwurzelspitzen mit dem Antikörper gegen α -Amylase. Die Zellwand (A und B) sowie das ER und die Kernhülle (D und E) der transformierten Pflanzen sind markiert. Dagegen wurden diese Kompartimente in nicht transformierten Pflanzen (Wildtyp), die als Kontrolle dienten, nicht markiert (C). ZW = Zellwand, N = Zellkern; NE = Kernhülle, Strichlänge 100 nm.

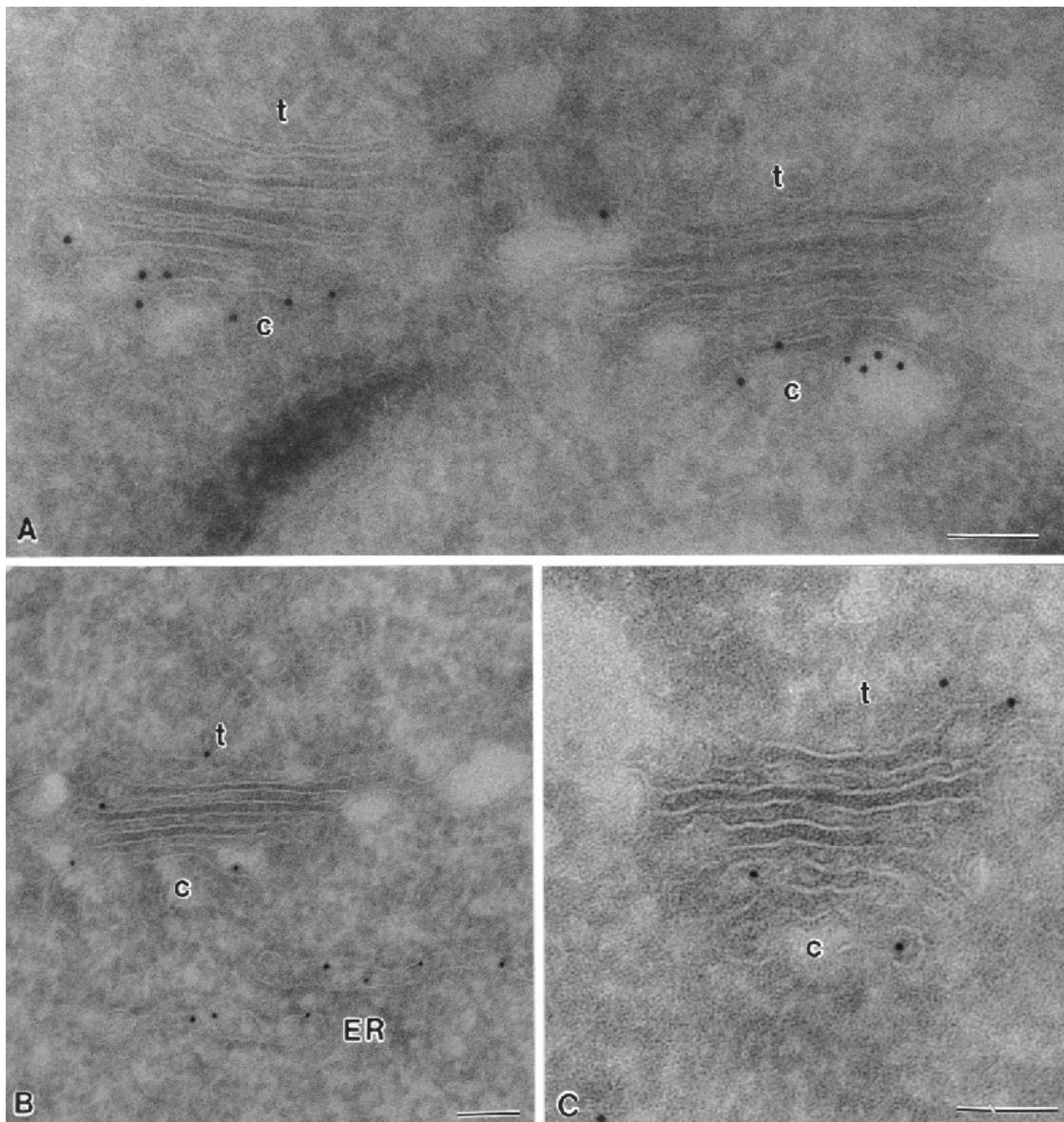


Abb. 3.22: Immunogoldmarkierung des GApp auf Kryoschnitten der transformierten Tabakwurzelspitzen mit dem Antikörper gegen α -Amylase. A) Bei den mit α -Amylase-HDEL transformierten Pflanzen wurden Dictyosomen überwiegend im *cis*-Bereich markiert. B, C) Die Markierung der mit α -Amylase transformierten Pflanzen ist auf allen Zisternen der Dictyosomen gleichmässig verteilt. c, t = *cis*- und *trans*-Bereich der Golgistapel, Strichlänge 100 nm.

4 Diskussion

Der Proteintransport zwischen verschiedenen Organellen der eukaryotischen Zellen ist mit der Sortierung von Proteinen in verschiedene Vesikel verbunden, die meist eine Proteinhülle besitzen. Clathrin ist das erste Hüllprotein von "coated" Vesikeln, das in verschiedenen Organismen als Hüllprotein von CCVs identifiziert und charakterisiert wurde (Pearse und Robinson, 1990). In den letzten fünfzehn Jahren wurden weitere Transportvesikel nachgewiesen, die als COPI und COPII Vesikel bezeichnet werden (Schekman und Orci, 1996). Seit der Entdeckung der COPI (Orci et al., 1986) und COPII Vesikel (Barlowe et al., 1994) haben viele Arbeitsgruppen versucht, ihre strukturellen Bestandteile bzw. ihre Frachtmoleküle in Hefe und Säugetieren zu identifizieren und zu charakterisieren. Hingegen blieb ihre Existenz und Funktion in Pflanzenzellen bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit ungewiss. Da in *Arabidopsis thaliana* Nukleotidsequenzen gefunden wurden (Newman et al., 1994), die denen ähnlich sind, die in Hefe und Säugetieren die Hüllproteine der COP Vesikel kodieren, nahm man an, dass der Proteintransport zwischen ER und GApp und innerhalb des GApp in Pflanzenzellen nach einem analogen Prinzip wie in Hefe und Säugetierzellen verläuft. Mit Antikörpern, die gegen Hüllproteine von COP Vesikeln von Hefe gerichtet waren, konnten keine spezifischen Kreuzreaktionen mit pflanzlichen Cytosolfractionen beobachtet werden. Daher waren spezifische Antikörper gegen ihre Bestandteile notwendig, um die Bedeutung pflanzlicher COP Vesikel für den Proteintransport zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit molekularbiologischen Methoden Antikörper gegen γ -COP und Sec23p aus *Arabidopsis* hergestellt, mit deren Hilfe die Eigenschaften und Funktionen der COP Vesikel in Pflanzenzellen untersucht werden konnten. Mit den Antikörpern gegen At γ -COP und AtSec23p wurden in Pflanzenzellen sowohl lösliche als auch membrangebundene Proteine nachgewiesen (siehe Kap. 3.2), die ähnliche Molekularmassen wie ihre Homologe in Hefe (Hosobuchi et al., 1992; Barlowe et al., 1994) und Säugetieren (Stenbeck et al., 1992; Paccaud et al., 1996) aufweisen.

4.1 Eigenschaften der löslichen At γ -COP und AtSec23p

Mit den gegen At γ -COP und AtSec23p gerichteten Antikörpern und mit den Antikörpern gegen Zm δ -COP, Zm ϵ -COP, AtSar1p und AtArf1p, die erst in der Endphase der vorliegenden Arbeit verfügbar waren, wurde die Verteilung putativer Bestandteile der Proteinhülle der pflanzlichen COP Vesikel zwischen dem Cytosol und den Membranen der verschiedenen Pflanzen untersucht. At γ -COP, AtSec23p, Zm δ -COP und Zm ϵ -COP konnten im Cytosol stärker als in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass diese Proteine in Pflanzenzellen überwiegend in löslicher und weniger in membrangebundener Form vorliegen. Das traf nicht auf

die GTPasen AtSar1p und AtArf1p zu. Während AtArf1p gleichmässig auf Cytosol und Membranen verteilt zu sein scheint, liegt AtSar1p vor allem an Membranen gebunden vor. Diese Verteilung von Sar1p wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen Geweben von Arabidopsis (siehe Abb. 2 in Bar-Peled und Raikhel, 1997) und ebenfalls in Hefezellen (Barlowe et al., 1993) nachgewiesen. In Hefe ist mehr als 80 % von Sar1p membrangebunden. Durch eine Überexpression von AtSar1p in Arabidopsis wurde nur die Konzentration des cytosolischen und nicht die des membrangebundenen Proteins erhöht (Bar-Peled und Raikhel, 1997). Das bedeutet, dass *in vivo* die maximale Membranbindung von AtSar1p in Pflanzenzellen erreicht wird.

Für die proteinbiochemische Charakterisierung von At γ -COP und AtSec23p wurden die Zellen von Blumenkohlinfloreszenzen verwendet. Diese Zellen sind meristematisch und zeichnen sich daher durch einen aktiven Proteintransport aus. Außerdem sind Blumenkohl und Arabidopsis systematisch verwandt und gehören zu der Familie der Cruciferen. Da die gewonnenen COP-Antikörper gegen Proteine aus Arabidopsis gerichtet waren, konnte diese Verwandtschaft vorteilhaft sein. Ein anderer Vorteil von Blumenkohlinfloreszenzen liegt in ihren geringen endogenen proteolytischen Aktivität. Untersuchungen zur Isolation von Hüllproteinen der CCVs hatten gezeigt, dass die Hüllproteine dieser Vesikel in verschiedenen Pflanzen während der Aufarbeitung unterschiedlich stark proteolytisch abgebaut werden (Drucker, 1995). Da die proteolytische Aktivität in der Cytosolfraction aus Blumenkohlinfloreszenzen im Vergleich zu anderen pflanzlichen Geweben wie Erbsenkotyledonen und Zucchinihypokotylen niedriger ist (Drucker, 1995), ist die Isolierung und Charakterisierung der Proteine aus diesem Gewebe im Hinblick auf den proteolytischen Abbau weniger problematisch. Die Ammoniumsulfatfraktionierung des Blumenkohlcytosols wurde dazu benutzt, die Konzentration von At γ -COP und AtSec23p zu erhöhen und einen Teil der endogenen Proteasen abzutrennen (siehe Kap. 3.3.1). Aus dem Blumenkohlcytosol konnte AtSec23p mit 30 % Ammoniumsulfat und At γ -COP mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt werden. Ähnliche Ammoniumsulfatkonzentrationen wurden für die Aufreinigung des Coatomers aus Säugetierzellen (Waters et al., 1991, 1992; Sheff et al., 1996) und des Sec23-Komplexes aus Hefe (Barlowe et al., 1994) beschrieben. Mit 40 % Ammoniumsulfat konnte AtSar1p vollständig und AtArf1p zu einem großen Teil präzipitiert werden. Da die endogenen Proteasen meist erst mit mehr als 50 % Ammoniumsulfat gefällt wurden, konnte mit einer 40%-igen Ammoniumsulfatfällung eine Cytosolfraction gewonnen werden, in der die Hüllproteine von pflanzlichen COP Vesikeln angereichert und die proteolytische Aktivität reduziert war. Diese letzte Eigenschaft dieser Cytosolfraction ist besonders wichtig für die *in vitro* Untersuchungen der Struktur und Funktion von COP Vesikeln. Für die *in vitro* Induktion von COP Vesikeln werden ER- und/oder GApp-Fractionen mit einer Cytosolfraction bei 37 °C (Malhotra et al., 1989) für Säugetierzellen oder bei 20-37 °C für Pflanzenzellen (Pimpl, 1997; Pimpl et al., 2000) inkubiert. Bei diesen Temperaturen ist die Aktivität der endogenen Proteasen erheblich höher als bei 4 °C (Demmer, 1991; Drucker, 1995).

Für die *in vitro* Induktion der pflanzlichen COP Vesikel wurde bisher eine mit 80 % (Pimpl, 1997) oder 65 % (Pimpl et al., 2000) Ammoniumsulfat gewonnene Cytosolfraktion von Blumenkohl verwendet. Das Ergebnis der Ammoniumsulfatfraktionierung spricht jedoch dafür, dass es viel günstiger ist, diese Versuche mit einer mit 40 % Ammoniumsulfat gewonnenen Cytosolfraktion durchzuführen. Damit kann möglicherweise die Ausbeute der induzierten COP Vesikel erhöht und der Abbau der Hüllproteine reduziert werden.

Außer Arf1p und Sar1p kommen andere Hüllproteine von COP Vesikeln in Proteinkomplexen vor (siehe Kap. 1.3.2 und Kap. 1.3.3). Alle diese Komplexe wurden aus Säugetieren und Hefe isoliert und aufgereinigt (Waters et al., 1991, 1992). Mit den aufgereinigten Proteinkomplexen konnten dann *in vitro* COPI oder COPII Vesikel induziert werden. Das ermöglichte die Untersuchung der Struktur dieser Vesikel sowie der Funktion ihrer strukturellen Bestandteile von Vesikeln bei der Sortierung der Frachtmoleküle. Neben der Charakterisierung der löslichen At γ -COP und AtSec23p wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, diese Proteine mit biochemischen Methoden aufzutrennen. Damit wäre auch eine gezielte *in vitro* Induktion von pflanzlichen COPI bzw. COPII Vesikeln ermöglicht. Durch Gelfiltrationschromatographie der mit 40 % Ammoniumsulfat gewonnenen Cytosolfraktion wurden At γ -COP und AtSec23p als Bestandteile der verschiedenen Proteinkomplexe nachgewiesen (siehe Kap. 3.3.2). Das Elutionsprofil von At γ -COP stimmte mit dem des Coatomers der Säugetierzellen überein (Waters et al., 1991, 1992). Damit wurde gezeigt, dass At γ -COP Bestandteil eines ca. 700 kDa großen Proteinkomplexes ist, der als pflanzliches Coatomer betrachtet werden kann. Im Vergleich dazu konnte AtSec23p, wie bei Hefe und Säugetieren (Hicke et al., 1992; Paccaud et al., 1996) in einem kleineren Proteinkomplex mit einer Molekularmasse von ca. 400 kDa nachgewiesen werden. Durch Gelfiltrationschromatographie gelang auch eine partielle Auftrennung der beiden Proteinkomplexen.

Das Ergebnis, dass At γ -COP und AtSec23p Bestandteile verschiedener Proteinkomplexe sind, wurde durch Behandlung des Cytosols mit Neomycin bestätigt. Es ist bekannt, dass das Coatomer von Hefe und Säugetierzellen an die benachbarten, freien Aminogruppen des di-Lysin-Motivs der membrangebundenen Frachtmoleküle von COPI Vesikeln bindet (Cosson und Letourneur, 1994; Tisdale et al., 1997). Aufgrund dieser Bindung des Coatomers wurden Experimente mit aminoglykosidierten Antibiotika durchgeführt, die in ihrer Struktur eine oder mehrere benachbarte Aminogruppen besitzen. Mit diesen Versuchen wurde die Zahl der Bindungsstellen des Coatomers an das di-Lysin-Motiv der Membranproteine untersucht. Dabei konnte das Coatomer durch Behandlung mit Neomycin, Neamin und Sisomycin, die jeweils mindestens zwei benachbarte, freie Aminogruppen besitzen, aus dem Cytosol gefällt werden (Hudson und Draper, 1997). Das war aber nicht der Fall für Antibiotika wie Geneticin und Gentamycin C₁, die nur eine benachbarte Aminogruppe haben. Diese Antibiotika konnten zwar

an das Coatomer binden und seine Bindung an das di-Lysin-Motiv und Neomycin verhindern, sie konnten aber keine großen Aggregate mit dem Coatomer bilden. Damit wurde nachgewiesen, dass beide Klassen von Antibiotika gemeinsame Bindungsstellen am Coatomer haben. Hudson und Draper (1997) sind davon ausgegangen, dass das Coatomer mehr als zwei Bindungsstellen für benachbarte Aminogruppen, wie die des di-Lysin-Motivs, besitzt. An diesen Stellen tritt es in Wechselwirkung mit verschiedenen Neomycinmolekülen, die drei benachbarte Aminogruppen besitzen und ebenfalls an mehr als einen Coatomerkomplex binden können. Das führt zur Vernetzung des Coatomers und zur Bildung großer Aggregate. Diese Aggregate können dann durch Zentrifugation vom Cytosol entfernt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde At γ -COP als Bestandteil des pflanzlichen Coatomers im Gegensatz zum AtSec23-Komplex nach Behandlung mit Neomycin durch Zentrifugation präzipitiert (siehe Kap. 3.3.3). Diese Komplexe lassen sich also aufgrund ihrer verschiedenen Bindungseigenschaften an Neomycin schnell voneinander trennen.

Diese Cytosolfraktion kann nach einer solchen Behandlung für die spezifische *in vitro* Induktion der COPII Vesikel verwendet werden, weil das Coatomer für die Bildung der COPI Vesikel nicht mehr im Cytosol vorhanden ist. Da das Coatomer bei der Fällung mit Neomycin sehr stabile Aggregate bildet, die nicht mehr gelöst werden können, können die gefällten Coatormoleküle nicht für die *in vitro* Versuche verwendet werden. Für diese sind die gewonnenen Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie geeignet. Dafür würde nur noch Arf1p benötigt (Spang et al., 1998), das auch durch Gelfiltration partiell aufgereinigt werden kann.

4.2 Physiologische Bedeutung der Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p

Für die membrangebundenen Proteinkomplexe wurden drei Funktionen beschrieben: 1) Sie erzeugen mit ihrer Polymerisation die mechanische Kraft zur Wölbung der Donormembran, die zur Bildung der Vesikel führt (Harter, 1999; Wieland und Harter, 1999). 2) Sie verhindern die Fusion von Donor- und Zielmembranen und ermöglichen einen regulierten Vesikeltransport (Orci et al. 1991; Scheel et al., 1997; Lowe und Kreis, 1998). 3) Sie sind an der Sortierung der Frachtmoleküle beteiligt (Schekman und Orci, 1996; Barlowe, 1998; Harter, 1999). Nachdem gezeigt worden war, dass At γ -COP und AtSec23p nicht nur in gelöster Form, sondern auch membrangebunden in Pflanzenzellen vorkommen, konnten neue Erkenntnisse bezüglich ihrer möglichen Funktionen gewonnen werden.

4.2.1 At γ -COP und AtSec23p an Membranen des GApp, des ER und der COP Vesikel

Es wird im Allgemeinen angenommen, dass COPII Vesikel am anterograden Proteintransport vom ER zum GApp beteiligt sind (Barlowe et al., 1994; Barlowe 1995, 1998). Die Donormembran dieser Vesikel ist also die ER-Membran. Im Gegensatz dazu werden COPI Vesikel an Membranen des GApp und ERGIC gebildet (Malhotra et al., 1989; Griffiths et al., 1995; Schekman und Orci 1996). Sie nehmen anscheinend hauptsächlich am retrograden Proteintransport aus dem GApp und ERGIC zum ER teil (Lowe und Kreis, 1998). Es wurde auch nachgewiesen, dass sie eine zusätzliche Funktion beim sowohl anterograden als auch retrograden Proteintransport innerhalb des GApp haben (Orci et al., 1997; siehe auch Kap. 1.3.2). In Säugetierzellen wurden Coatomer-reiche Bereiche im ER nachgewiesen (Orci et al., 1994). Die Funktion von diesen einzelnen ER-Bereichen konnte aber nicht aufgeklärt werden. Wie Clathrin und AP-Komplexe kommen die Bestandteile der Proteinhüllen von COP Vesikeln sowohl im Cytosol als auch an Membranen gebunden vor. Die gelösten vorliegenden Hüllkomplexe binden *en bloc* an die Donormembranen und leiten damit die Bildung der Vesikel ein (Barlowe et al., 1994; Hara-Kuge et al., 1994). Nach der Freisetzung der Vesikel dissoziiert die Proteinhülle von der Membran. Um die Funktion von pflanzlichen COP Vesikeln am sekretorischen Transportweg zu untersuchen, musste zuerst aufgeklärt werden, in welcher Form sie an ihre Donormembranen binden und ob diese Bindung eine physiologische Bedeutung hat. Es wurde gezeigt, dass At γ -COP und AtSec23p wie ihre homologen Proteine in Hefe und Säugetierzellen (Malhotra et al., 1989; Waters et al., 1991; Barlowe et al., 1994; Schekman und Orci, 1996) peripher auf der cytosolischen Seite der Membranen gebunden sind (siehe Kap. 3.4.1). Es war dabei notwendig zu zeigen, dass die Membranbindung spezifisch ist und nicht durch eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Membranen und Hüllproteinen hervorgerufen wird. Manche lösliche Proteine binden während der biochemischen Aufarbeitungen durch unspezifische Wechselwirkungen an Membranen. Das ist z. B. für das Coatomer von Hefe (Spang et al., 1998), im Gegensatz zum Coatomer von Säugetierzellen (Bremser et al., 1999), nachgewiesen. In wieweit die Membranassoziation von At γ -COP und AtSec23p spezifisch ist, konnte mit Hilfe der Veränderung eines physiologischen Faktors, der Temperatur, untersucht werden.

Der Proteintransport im sekretorischen Transportweg wird bei Kälte verlangsamt oder sogar verhindert (Saraste und Kuismanen, 1984; Tartakoff, 1986, 1987; Rexach und Schekman, 1991). Das könnte zum Teil daran liegen, dass die Bildung der Transportvesikel unter diesen Bedingungen gehemmt wird (Mollenhauer et al., 1976; Griffiths et al., 1995). Der Einfluss von Kälte auf die Verteilung von AtSar1p zwischen der Cytosol- und der Membranfraktion einer Arabidopsis-Suspensionskultur wurde bereits nachgewiesen (Bar-Peled und Raikhel, 1997). Während die Menge des integralen Membranproteins AtSec12p nach einer 5-tägigen Kälte-

Behandlung der Zellen wie bei der von der Kontrolle war, konnte AtSar1p, das sowohl als lösliches als auch als peripheres Membranprotein vorkommt, nach dieser Zeit nur im Cytosol nachgewiesen werden. Um den Effekt von niedrigen Temperaturen auf die Membranbindung von At γ -COP und AtSec23p zu prüfen, wurden Blumenkohlpflanzen über Nacht in einem Kühlraum gehalten. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen konnte in kältebehandelten Pflanzen eine Verschiebung der beiden Proteine aus der Membranfraktion zur Cytosolfraction gezeigt werden (siehe Abb. 3.11). Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Bar-Peled und Raikhel (1997) beobachteten Kälte-Effekt auf die Membranbindung von Sar1p überein. Damit wurde gezeigt, dass die Bindung von Hüllproteinen der pflanzlichen COP Vesikel von physiologischen Faktoren, wie z. B. Kälte beeinflusst wird. Diese Bindung ist daher spezifisch und spielt möglicherweise bei der Vesikelbildung eine Rolle.

Die verringerte Membranbindung der untersuchten Proteine kann verschiedene Gründe haben. Bei niedrigen Temperaturen wird in Pflanzen das Expressionsmuster von Genen geändert (Guy et al., 1985; Thomashow, 1999). Eine große Klasse von Proteinen, die dabei *de novo* gebildet werden, sind **Hitzeschockproteine** (HSPs), die als molekulare Chaperone viele Proteine vor kälteinduzierter Denaturierung schützen (Neven et. al., 1992; Sabehat et al., 1996; Guy et al., 1998). HSPs kommen in Pflanzenzellen zum großen Teil im Cytosol und ER vor (Lee et al., 1995; Ukaji et al., 1999). Da Frachtmoleküle eine entscheidende Rolle bei der Bildung der COP Vesikel spielen (Aridor et al., 1999), kann eine erhöhte Konzentration solcher Proteine im ER und eine niedrigere Konzentration von Frachtmolekülen als Folge der Änderung der Genexpression den Proteinexport aus dem ER und dadurch die Bildung von COPII und COPI Vesikeln reduzieren. Die Synthese von energiereichen Molekülen wie ATP und GTP, die für den Proteintransport notwendig sind, wird bei niedrigen Temperaturen beeinträchtigt und führt so zusätzlich zu einer Verlangsamung und Hemmung des Proteintransports (Tartakoff, 1987; Gravotta, 1990). Ein Mangel an energiereichen Nucleosidtriphosphaten führt zur Einschränkung der Funktion der GTPasen, wie Arf1p und Sar1p, und verringert dadurch die Membranbindung von Hüllproteinen der "coated" Vesikel. Der direkte Effekt von Kälte auf den Proteintransport durch Verlangsamung vieler enzymatischer Aktivitäten oder Wechselwirkungen zwischen Proteinen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Falls At γ -COP und AtSec23p eine physiologische Funktion am sekretorischen Transportweg haben, wäre zu erwarten, dass diese Proteine mit Membranen der Kompartimente, die am Proteintransport beteiligt sind, assoziiert sind. Um diese Membranen zu identifizieren, wurden mikrosomale Membranen aus Blumenkohl durch Gelfiltration über eine Sephacryl S-1000 Säule aufgearbeitet (siehe Kap. 3.4.4). Dabei gelang es nicht, verschiedene mikrosomale Membranen voneinander zu trennen. Mit der gleichen Methode konnten dagegen PM und Endosomen von Hefe von anderen Membranen getrennt werden (Huang und Chiang, 1997). Der Grund dafür könnte in einer unterschiedlichen strukturellen Organisation der Hefe- und Pflanzenzellen liegen.

Während die relative Auftrennung der mikrosomalen Membranen aus Blumenkohl aufgrund ihrer Größe mit diesem Verfahren nicht möglich war, konnten sie anhand der verschiedenen Schwebedichten durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden (siehe Kap. 3.4.5). Unter Plus-Magnesium-Bedingungen waren Golgi- und ER-Membranen im mittleren Bereich der Gradienten mit einem Peak bei einer Saccharosedichte von 35-37 % (w/w) und PM und CCVs in höheren Dichten (bei 41-43 % (w/w) Saccharose) verteilt. Dies stimmt mit den Dichten, die für ER- und Golgi-Membranen (Robinson und Hinz, 2000) sowie für CCVs (Depta et al., 1991; Demmer et al., 1993) und PM (Sandelius und Morré, 1990) von verschiedenen Pflanzenzellen ermittelt wurden, überein. Sowohl At γ -COP als auch AtSec23p zeigten zwei Peaks im Gradienten. Ein Peak war im ER-/GApp-Bereich der zweite Peak in höheren Saccharosedichten (bei 43-46 % (w/w) Saccharose). In diesen hohen Dichten der Gradienten kommen normalerweise Transportvesikel, wegen ihres kompakten Inhalts, vor. *In vitro* induzierte COP Vesikel aus Säugetierzellen (Malhotra et al., 1989) und Pflanzenzellen (Pimpl et al., 2000) wurden nach der Dichtegradientenzentrifugation in hohen Saccharosedichten nachgewiesen. Daher kann man daraus schließen, dass At γ -COP und AtSec23p mit ER und/oder GApp sowie mit kleinen Vesikeln assoziiert sind, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt werden konnten. In einem weiteren Schritt sollte die Verteilung von At γ -COP und AtSec23p zwischen ER/GApp-Membranen untersucht werden. Dafür wurden mikrosomale Membranen durch Dichtegradientenzentrifugation unter Minus-Magnesium-Bedingungen aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen dissoziieren Ribosomen von ER-Membranen ab, wodurch die Dichte des ER verringert wird. Das ER wird im Gradienten in einem Bereich niedrigerer Saccharosedichte angesammelt. Somit kann die Auftrennung von GApp und ER im Gradienten erreicht werden. Dabei konnte zwar eine klassische Verschiebung des ER in die niedrigeren Saccharosedichten beobachtet werden, aber aufgrund einer schwächeren Verschiebung des GApp war die Auftrennung dieser Organellen nicht optimal (siehe Abb. 3.15). Die Ursache für die leichte Verschiebung des GApp, die bei anderen Pflanzenzellen ebenfalls beobachtet worden ist (Robinson und Hinz, 2000), ist bislang nicht bekannt. Da für die Wechselwirkung zwischen Proteinen, wie den Proteinen der Golgimatrix oder der interzisternalen Filamenten und Membranproteinen der Zisternen Ionen wie Mg⁺⁺ notwendig sind (Cluett und Brown, 1992; Staehelin und Moore, 1995), kann diese Verschiebung möglicherweise mit der Beeinträchtigung dieser Wechselwirkung durch EDTA und einer daraus resultierten Auflösung der Golgimatrix und/oder Auftrennung der einzelnen Zisternen zu tun haben. Der Proteinpeak von PM und CCVs sowie die Peaks von At γ -COP und AtSec23p in höheren Saccharosedichten, bei denen es sich um die COP Vesikel handelte, waren dagegen unbeeinflusst von der Abwesenheit von Mg²⁺. Im Vergleich dazu konnte eine Verschiebung des mittleren Proteinpeaks von At γ -COP und AtSec23p beobachtet werden. Hiernach schienen AtSec23p mit ER und At γ -COP mit Golgi-

und/oder ER-Membranen von Pflanzenzellen assoziiert zu sein. Da die Auftrennung von GApp und ER unter diesen Bedingungen nicht optimal war, konnte nicht genau gezeigt werden, ob At γ -COP mit dem GApp und/oder ER assoziiert ist. Aus diesem Grund wurden die Hüllproteine der pflanzlichen COPI Vesikel mit Hilfe der Tokuyasu-Technik (siehe Kap. 2.9.2) innerhalb der Wurzelspitzenzellen von Mais und Arabidopsis immunlokalisiert (siehe Kap. 3.5). Die Immunogoldmarkierung mit COPI-Antikörpern war sowohl an den Dictyosomen als auch an den kleinen COPI Vesikeln mit einer erkennbaren Proteinhülle zu sehen. Die Markierung des ER war hingegen nicht signifikant. Die pflanzlichen COPI Vesikel weisen zwar in Kryoschnitten eine ähnliche Struktur wie COPI Vesikel aus Säugetieren auf (siehe Abb. 3.16-3.18), sind aber mit einem Durchmesser von 50-60 nm etwa 20 nm kleiner als COPI Vesikel in Säugetieren (Orci et al., 1993, 1997). Die Markierungen an Dictyosomen waren meist an den seitlichen Enden der Zisternen zu beobachten (siehe Abb. 3.16-3.18), wo auch in Säugetierzellen COPI Vesikel gebildet werden (Schekman und Orci, 1996; Orci et al., 1997). Mit diesen Daten konnten die Unklarheiten der Saccharosedichtegradienten aufgeklärt werden. So wurde gezeigt, dass es sich bei dem At γ -COP im mittleren Bereich der Saccharosegradienten um Dictyosomen und im höheren Bereich um COPI Vesikel handelt. Nach diesem Ergebnis binden sowohl At γ -COP als auch AtSec23p an die Donormembranen der COP Vesikel und nehmen an der Bildung der COP Vesikel teil.

4.2.2 Verhinderung der Fusion von ER und GApp durch das Coatomer

In Säugetierzellen fusionieren nach einer BFA-Behandlung Membranen verschiedener Kompartimente miteinander und verlieren ihre typische Struktur (Lippincott-Schwartz et al., 1989, 1991; Wood et al., 1991). Der BFA-Effekt ist besonders bei Golgistapeln auffällig, die mit ER-Membranen fusionieren und aufgelöst werden (Misumi et al., 1986; Lippincott-Schwartz et al., 1989; Ulmer und Palade, 1991). Auf molekularer Ebene verhindert BFA durch seine Wechselwirkung mit GEFs den Austausch von GDP gegen GTP an Arf-Proteinen (Peyroche et al., 1999; Mansour et al., 1999; siehe auch Kap. 1.3.2). Die Anlagerung des Coatomers (sowie der AP-Komplexe) an die Membran des GApp wird dadurch gestört (Donaldson et al., 1992; Helms und Rothman, 1992; Robinson und Kreis, 1992). Eine schnelle Dissoziation des Coatomers von Membranen wurde auch bei der BFA-Behandlung in Säugetierzellen beobachtet (Donaldson et al., 1992; Scheel et al., 1997). Sowohl die Verhinderung der Bindung des Coatomers als auch dessen schnelle Dissoziation von Membranen des GApp führt zur verfrühten Freilegung von v-SNAREs (Orci et al. 1991; Donaldson et al., 1992; Scheel et al., 1997). Diese sind normalerweise in den Golgi-Membranen von dem Coatomer bedeckt (Schekman und Orci, 1996). Das Coatomer blockiert damit eine unregulierte Wechselwirkung zwischen v-SNAREs der Golgi-Membran und t-SNAREs der ER-Membran und eine daraus resultierende Fusion von ER

und GApp (Orci et al., 1991; Söllner et al., 1993; Rothman und Warren, 1994; Lowe und Kreis, 1998). Erst nach dem Abknospen der COPI Vesikel werden die v-SNAREs in der Membran der Vesikel durch die Dissoziation der Proteinhülle frei zugänglich und können spezifisch mit t-SNAREs der ER-Membran in Wechselwirkung treten (Söllner et al., 1993; Weber et al., 1998). Durch die verfrühte v-SNAREs-Freilegung in "coated buds" der Golgi-Membran in Folge der BFA-Behandlung kommt es zur Fusion von ER und GApp (Donaldson et al., 1992; Scheel et al., 1997).

In Pflanzenzellen bewirkt BFA die Vesikulierung des GApp. Diese kann sowohl bei *cis*- und median- (Dairman et al., 1995) als auch bei *trans*-Zisternen beginnen (Satiat-Jeunemaitre und Hawes, 1992; Robinson et al., 1997), wobei letzteres häufiger der Fall zu sein scheint (Satiat-Jeunemaitre et al., 1996). Die Vesikel werden vermutlich von der Golgi-Matrix zusammengehalten und verbleiben dadurch im Bereich der ehemaligen Dictyosomen (Staehelin und Moore, 1995). Eine Akkumulation von Glykoproteinen und komplexen Polysacchariden am *trans*-Bereich des GApp - vermutlich als Folge einer Beeinträchtigung der Transportvorgänge - wurde ebenfalls als BFA-Wirkung in Pflanzenzellen beschrieben (Satiat-Jeunemaitre und Hawes, 1993). BFA kann ebenfalls zur Schwellung (Driouich et al., 1993; Schindler et al., 1994) oder intrazellulären Umverteilung (Henderson et al., 1994) des ER in Pflanzenzellen führen. Kürzlich wurde in Epidermis- und Mesophyll-Zellen von Tabakpflanzen, die mit der GFP-Sialyltransferase als fluoreszierendem GApp-Protein transformiert worden waren, gezeigt, dass nach einer BFA-Behandlung fluoreszierende Golgistapel verschwinden und statt dessen das polygonale Netzwerk des ER fluoresziert (Boevink et al., 1998). Bei diesen Experimenten konnte jedoch keine Veränderung der Morphologie des ER festgestellt werden. Dagegen wurde als BFA-Wirkung in Wurzelzellen von Mais neben einer Kolo-kalisierung von ER- und GApp-Proteinen eine Reorganization des ER beschrieben (Satiat-Jeunemaitre et al., 1996). Daher scheint der Effekt von BFA in verschiedenen Pflanzengewebe unterschiedlich zu sein. Das kann einerseits mit der unterschiedlichen Schnelligkeit der BFA-Aufnahme in die Zellen verschiedener Gewebe und andererseits mit unterschiedlichen Konzentration von BFA, die für Untersuchungen eingesetzt wurden, zu tun haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von BFA auf membrangebundenes AtArf1p und At γ -COP aus kultivierten BY2-Tabakzellen biochemisch untersucht. Zahlreiche Vorteile dieser Zellen wurden unter Kap. 3.4.3 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Konzentration von BFA im Anzuchtmedium (10 μ g/ml) in sehr kurzer Zeit das Ablösen des Coatomers von dem membrangebundenen AtArf1p verursacht (siehe Abb. 3.12). Die Lokalisierungen von At γ -COP und AtArf1p in BY2-Tabak-Suspensionskultur mit Hilfe des "Confocal Laser Scanning" Mikroskops zeigten, dass At γ -COP durch die BFA-Behandlung schnell von den Golgi-Membranen dissoziiert (Ritzenthaler, persönliche Mitteilung). Dies bestätigte das Ergebnis des oben beschriebenen Experimentes. Damit konnte die BFA-induzierte

Dissoziation des Coatomers von Membranen in Säugetierzellen (Donaldson et al., 1992; Scheel et al., 1997) auch für Pflanzenzellen nachgewiesen werden. Außerdem wurde hier gezeigt, dass diese BFA-Wirkung in Pflanzenzellen nicht durch die Dissoziation von Arf1p von Membranen verursacht wird. Da die Freisetzung von AtArf1p von Membranen erst längere Zeit nach der BFA-Behandlung geschieht, wirkt BFA vermutlich auf die Bindung des Coatomers an AtArf1p. Dies steht im Gegenteil zu den Ergebnissen von Donaldson et al. (1992), die in Säugetierzellen durch BFA-Behandlung eine parallele, schnelle Freisetzung des Coatomers und die Dissoziation von Arf1p von Membranen ins Cytosol beobachtet haben. Die Ursache für diesen Unterschied ist nicht klar. Denkbar wäre, dass es zwei unterschiedliche Populationen von Arf1p mit verschiedenen Bindungseigenschaften an Membranen gibt. Tatsächlich wurden in Säugetierzellen schon zwei Populationen von Arf1p identifiziert (Helms et al., 1993). Während eine Klasse sehr leicht von Membranen abgetrennt werden konnte, zeigte die andere Klasse eine starke Bindung an Membranen.

Die Dissoziation des Coatomers von Arf1p kann auch in Pflanzenzellen zur Freilegung von v-SNAREs des GApp führen und dadurch die Fusion von GApp und ER ermöglichen. Dies konnte trotz vieler Arbeiten (z. B. Rutten und Knuimann, 1993; Satiat-Jeunemaitre et al., 1996) bislang nicht eindeutig auf der ultrastrukturellen Ebene belegt werden. Pflanzenzellen eignen sich zur Beobachtung der ER/GApp-Fusion sogar besser als Säugetierzellen, da bei ersteren die Golgistapel im ganzen Cytoplasma verteilt sind und eine eindeutige Struktur zeigen. Für solche Untersuchungen sind Tabak-Suspensionskulturen wegen der schnellen und gleichmäßigen Aufnahme von BFA sehr geeignet.

4.2.3 COPI Vesikel im *cis*-Bereich des GApp von Pflanzenzellen

Zahlreiche morphologische und biochemische Eigenschaften unterscheiden den GApp in Pflanzenzellen von dem in Säugetieren und Hefe (Andreeva et al., 1998; Dupree und Sherrier, 1998; Robinson und Hinz, 1999). Viele dieser Unterschiede können darauf zurückgeführt werden, dass die Hauptfunktion des GApp tierischer Zellen in der Sortierung und Prozessierung von Proteinen besteht, während diese Vorgänge in den Dictyosomen der meisten Pflanzenzellen im Vergleich zu der Synthese komplexer Polysaccharide mengenmäßig in den Hintergrund rücken. Darüber hinaus sind im Gegensatz zu den Säugetierzellen, deren GApp einen festen Platz in der Nähe vom Zellkern hat, die Golgistapel von Pflanzenzellen im ganzen Cytoplasma verteilt und entlang eines verzweigten Actin-Netzwerkes, das am ER anliegt, in Bewegung (Boevink et al., 1998; Nebenführ et al., 1999). Trotz dieser Unterschiede wird im Grunde angenommen, dass der Proteintransport zwischen ER und GApp und innerhalb des GApp in Pflanzen und Säugetieren nach dem gleichen Prinzip funktioniert.

Durch eine statistische Auswertung der Immunogoldmarkierung mit den COPI-Antikörpern konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass COPI Vesikel in den Pflanzenzellen überwiegend im *cis*-Bereich des GApp vorkommen (siehe Tabelle 3.1). Eine vergleichbare Lokalisierung von COPI Vesikeln wurde auch in Säugetierzellen beobachtet (Oprins et al., 1993; Orci et al., 1997). In diesen Zellen wurde jedoch das Coatomer auch am ERGIC (siehe Kap. 1.2) lokalisiert (Oprins et al., 1993; Griffiths et al., 1995; Martinez-Menarguez et al., 1999). Ein Rücktransport der ER-Proteine aus dem ERGIC unter Beteiligung von COPI Vesikeln wird angenommen (Pelham, 1988; Lowe und Kreis, 1998). Morphologisch gesehen enthält dieses post-ER/pre-Golgi Kompartiment vesikuläre und tubuläre Fortsätze (Bannykh und Balch, 1997), die wahrscheinlich durch die Fusion von COPII Vesikeln zustande kommen (Aridor et al., 1995; Scales et al., 1997). Bisher wurde in Pflanzenzellen kein homologes Kompartiment zu ERGIC von Säugetierzellen nachgewiesen. Die *cis*-most-Zisterne des GApp in Pflanzenzellen weist wie ERGIC eine breite, diskontinuierliche Struktur auf (siehe Abb. 3.22 A und 3.22 C). Dies kann möglicherweise eine Folge der Fusion der COPII Vesikel mit dieser Zisterne sein und als strukturelle Homologie zum ERGIC betrachtet werden.

Einen Hinweis auf die besondere Funktion der *cis*-most-Zisterne und eine mögliche Funktion der COPI Vesikel ergab die Immunlokalisierung der α -Amylase-HDEL und α -Amylase in den transgenen Tabakpflanzen (siehe Kap. 3.7). Diese Pflanzen wurden für die Untersuchung der Funktion der carboxyterminalen HDEL-Sequenz bei dem Rücktransport der α -Amylase-HDEL vom GApp zum ER hergestellt (Phillipson et al., 2001). Es ist bekannt, dass die H/KDEL-Sequenz am carboxyterminalen Ende der sekretorischen Proteine die Sekretion dieser Proteine in allen eukaryotischen Zellen beeinträchtigt und ihre Konzentration im ER erheblich erhöht (Denecke et al., 1992; Wandelt et al., 1992; Gomord et al., 1997). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass eine H/KDEL-Sequenz die Golgi-spezifische Modifikation der N-Glykan-Reste bestimmter Glykoproteine in Säugetierzellen nicht verhindert (Pelham, 1988; Dean und Pelham, 1990). Das bedeutet, dass in Hefe und Säugetierzellen Proteine, die aufgrund ihrer H/KDEL-Sequenz ER-resident sind, nicht kontinuierlich im ER verbleiben, sondern das ERGIC durchlaufen und bis zum GApp gelangen, von wo aus sie zum ER zurücktransportiert werden. Der Rücktransport dieser Proteine geschieht überwiegend aus dem *cis*-Bereich des GApp (Connolly et al., 1994), aber im Prinzip kann er aus jeder Zisterne und sogar aus dem TGN erfolgen (Miesenböck und Rothman, 1995). Aufgrund der Entdeckung des H/KDEL-Signals und dessen putativen Rezeptors in Pflanzenzellen (siehe unten) wird ihnen auch hier eine Funktion beim Recycling bestimmter Proteine zwischen GApp und ER zugeschrieben (Gomord und Faye, 1996; Gomord et al., 1997, 1999; Pagny et al., 1999). Kürzlich wurde mit der strukturellen Analyse der N-Glykan-Reste der ER-Glykoproteine gezeigt, dass ein sehr effektiver Rücktransport aus dem *cis*- und median-Bereich des GApp von Pflanzenzellen stattfindet (Pagny et al., 2000). Dieser Rücktransport sorgt angeblich für die Rückhaltung der künstlich mit HDEL

verknüpften Proteine, wie z. B. bei der Zellwandinvertase-HDEL, die normalerweise keine ER-residenten Proteine darstellen. α -Amylase wird wie andere sekretorische Proteine im ER der transformierten Pflanzen gebildet und nach dem Transport durch den GApp sekretiert (Phillipson et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass α -Amylase ohne HDEL-Signal gleichmäßig in allen Zisternen des GApp der transformierten Pflanzen vorkommt, während α -Amylase-HDEL überwiegend im *cis*-Bereich des GApp, wo COPI Vesikel hauptsächlich vorkommen, und besonders in der *cis*-most-Zisterne nachgewiesen wurde (siehe Abb. 3.22 und Tabelle 3.2). Die statistische Analyse ergab, dass nur etwa 10 % der Immunogoldmarkierung im median- und *trans*-Bereich des GApp vorkommen. Daher kann man davon ausgehen, dass durch die HDEL-Sequenz hauptsächlich in der *cis*-Zisterne aber auch in anderen Zisternen der Rücktransport der α -Amylase-HDEL veranlaßt wird. Diese Daten ergänzen die Resultate von Pagny und Mitarbeitern (2000), die einen Rücktransport der Invertase-HDEL aus allen Zisternen des pflanzlichen GApp nachgewiesen haben. Sie deuten zusätzlich auf die wichtige Funktion der *cis*-most-Zisterne des GApp in Pflanzenzellen bei der Sortierung und bei dem vermutlich durch COPI Vesikel vermittelten Rücktransport von Proteinen zum ER hin.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die HDEL-Sequenz die Sekretion der α -Amylase nicht vollständig verhindert (siehe Kap. 3.7). In Hefe wurde mit Hilfe von Mutanten, die einen Defekt beim Protein-Rücktransport vom GApp zum ER aufweisen, ein Rezeptor für die HDEL-Sequenz identifiziert, der Erd2p (von "ER retention defective 2") genannt wird (siehe Kap. 1.1) (Semenza et al., 1990). Zu diesem Rezeptor homologe Proteine wurden in Säugetieren (Lewis und Pelham, 1992; Hsu et al., 1992) und Pflanzen (Lee et al., 1993) entdeckt. Interessanterweise wurde dieses Protein in Säugetierzellen im *cis*-Bereich des GApp lokalisiert (Griffiths et al., 1994). Erd2p bindet im GApp an das H/KDEL-Signal löslicher ER-Proteine, die das ER verlassen, und sorgt für ihren Rücktransport in COPI Vesikeln zum ER (Wilson et al., 1993; Townsley et al., 1993; Orci et al., 1997). Dieser Rezeptor ist möglicherweise auch in den transgenen Tabakpflanzen für den Rücktransport der α -Amylase-HDEL aus dem GApp zum ER zuständig. Die Sekretion der α -Amylase-HDEL kann so erklärt werden, dass die hohe Syntheserate dieses Proteins zur Sättigung der Rezeptormoleküle führt. Dadurch können die α -Amylase-HDEL-Moleküle, die das ER verlassen, nicht mehr vollständig vom GApp zum ER zurückgebracht werden und werden zum Teil sekretiert.

Für Untersuchungen des Proteinrücktransports aus dem GApp werden oft H/KDEL-Fusionsproteine hergestellt, die normalerweise nicht ER-resident sind (Herman et al., 1990; Pueyo et al., 1995; Gomord et al., 1997; Pagny et al., 2000). Diese Proteine werden aufgrund von starken Promotoren, die ihren Genen vorgeschaltet sind, in hohen Konzentrationen in den transformierten Organismen synthetisiert. Die hohe Proteinkonzentration im ER führt

möglicherweise durch Sättigung der ER-Retentions-Maschinerie zu einem nicht kontrollierbaren Export von Proteinen, welche dann zum großen Teil zum ER zurückgebracht werden. Auf Basis der Experimente mit transformierten Organismen können daher zwar Erkenntnisse über den Proteintransport im sekretorischen Weg gewonnen werden, jedoch ist nicht klar, ob diese die natürlichen Mechanismen widerspiegeln. Das gilt auch für die mit der α -Amylase-HDEL oder der Invertase-HDEL transformierten Pflanzen.

Für die Retention der ER-Proteine scheint es außer dem Recycling andere Mechanismen zu geben. Das am Besten untersuchte Chaperon des ER, BiP, konnte in COPII Vesikeln nicht nachgewiesen werden (Barlowe et al., 1994; Kuehn et al., 1998). Wenn das HDEL-Motiv von BiP entfernt wird, wird BiP nur in sehr geringen Mengen sekretiert (Munro und Pelham, 1987; Crofts et al., 1999). Die Retention von Calreticulin ist im Vergleich damit mehr vom HDEL-Signal abhängig, da es ohne HDEL-Peptid stark sekretiert wird (Crofts et al., 1999). Calreticulin von Mais und Tabak besitzt zwei N-Glykan-Reste, die im Gapp prozessiert werden können (Pagny et al., 2000). Da nach der Behandlung mit BFA, die zur Mischung von ER- und Gapp-Enzymen führt (siehe Kap. 4.2.2), die Struktur dieser N-Glykan-Resten anders prozessiert wird als in den Kontrollpflanzen, kann man davon ausgehen, dass dieses Protein in Pflanzenzellen entweder das ER nie verlässt oder nur in sehr kleinen, nicht detektierbaren Mengen den Gapp erreicht (Pagny et al., 2000). Mit dem Antikörper gegen Calreticulin konnte in der vorliegenden Arbeit eine sehr starke Immunogoldmarkierung des ER auf Kryoschnitten von Maiswurzelspitzen festgestellt werden (siehe Abb. 3.20). Im Gegensatz dazu wurde dieses molekulare Chaperon im Gapp nicht detektiert. Dieses Ergebnis bestätigt somit die biochemischen Befunde von Pagny et al. (2000) über die Retention von Calreticulin im ER der Pflanzenzellen.

Der Grund für die sehr effektive Retention von ER-Chaperonen wie BiP und Calreticulin ist noch nicht aufgeklärt. Sie kann aber mit der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Chaperonen untereinander oder zwischen Chaperonen und anderen Proteinen zu tun haben. Die Bildung von stabilen Proteinkomplexen zwischen verschiedenen ER-Chaperonen, z. B. zwischen BiP und Calreticulin, wurde bereits nachgewiesen (Tatu und Helenius, 1997; Crofts et al., 1998). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte ER-Proteine durch die Bildung von großen Proteinkomplexen oder einem Protein-Netzwerk für eine gegenseitige Retention sorgen.

4.3 COPI Vesikel in Erbsenkotyledonen

Leguminosensamen eignen sich besonders gut zur Aufklärung des sekretorischen Proteintransportes bei Pflanzen, weil bei ihnen in einer relativ kurzen Zeit der Samenentwicklung große Mengen von Speicherproteinen synthetisiert und in spezialisierte Vakuolen transportiert werden (siehe Kap. 3.6). In Erbsensamen kommt es nach einer Phase intensiver Zellteilung in der zweiten Phase der Samenreifung zu einer deutlichen Zunahme von Größe und Trockengewicht.

Diese Zunahme beruht neben der Bildung von Stärkekörnern vor allem auf der Speicherung großer Mengen der Speicherproteine Legumin und Vicilin in PSV der Parenchymzellen von Erbsenkotyledonen. Diese Proteine werden am ER als Proproteine synthetisiert (Müntz, 1989) und in den GApp transportiert (Chrispeels et al., 1982), in dem die weitere Sortierung sekretorischer Proteine in verschiedene Vesikel stattfindet (Robinson et al., 1998). Daneben ist der GApp in dieser Wachstumsphase an der Synthese großer Mengen von Zellwandmaterial sowie der Sortierung der Polysaccharide und Exoproteine zur Zelloberfläche beteiligt (Gardiner und Chrispeels, 1975; Ray et al., 1976; Moore und Staehelin, 1988; Staehelin und Moore, 1995). Da in dieser Phase der Samenentwicklung PSV und lytische Vakuole nebeneinander existieren (Hoh et al., 1995), erfolgt am GApp eine Sortierung zu mindestens drei verschiedenen Zielkompartimenten. Speicherproteine und vermutlich auch andere lösliche Proteine der PSV verlassen den GApp in DVs (Hohl et al., 1996). In diesen Vesikeln werden sie zur PSV oder einem möglichen Zwischenkompartiment, dem sogenannten "multivesicular body", transportiert (Robinson und Hinz, 1999). Der Transport anderer löslicher Proteine, wie z. B. sauren Hydrolasen, zur lytischen Vakuole wird dagegen von CCVs vermittelt. Ferner könnten größere glatte elektronendurchlässige Vesikel am Transport von Zellwandpolymeren zum Extrazellulärraum beteiligt sein.

Speicherproteine scheinen, nachdem sie den GApp erreicht haben, sehr schnell im *cis*-Bereich an die Peripherie der Zisternen verlagert zu werden, wo sie anfangen, sich in elektronendichten Aggregaten zusammenzulagern (Hinz et al., 1997; Robinson und Hinz, 1999; Hillmer et al., 2001). So werden im *cis*-Bereich des GApp DVs gebildet, die vermutlich mit den reifenden Zisternen bis zur Freisetzung im *trans*-Bereich der Dictyosomen verbunden bleiben. Daher sind sie an allen Zisternen des GApp zu finden. Es scheint, dass DVs mit den Zisternen verbunden bleiben, gemeinsam mit ihnen zum *trans*-GApp gelangen und einer Reifung unterliegen (Robinson und Hinz, 1999; Hillmer et al., 2001). Während dieser Reifung wird die Sortierung der Speicherproteine in DVs, die hauptsächlich im *cis*-Bereich des GApp stattfindet, fortgesetzt. Deswegen sind die DVs des *cis*-Bereiches kleiner als die des *trans*-Bereiches und ihr Inhalt ist im Vergleich weniger kondensiert (Robinson et al., 1997). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Existenz von COPI Vesikeln am GApp der Parenchymzellen von Erbsenkotyledonen nicht nachgewiesen. Der Nachweis dieser Vesikel in diesen Zellen war aus verschiedenen Gründen wichtig. Erstens war unklar, ob DVs eine spezifische Art von COPI Vesikeln sind, die an der Sortierung und dem Transport der Speicherproteine teilnehmen. Zweitens stellte sich die Frage, wenn es sich bei den DVs um einen anderen Vesikeltyp handelt, ob sie die Rolle von COPI Vesikeln beim Intra-Golgi-Transport ersetzen. Drittens war es wichtig zu wissen, ob neben der sehr wahrscheinlichen zisternalen Reifung im GApp der Zellen von Erbsenkotyledonen ein Proteintransport durch COPI Vesikel stattfindet. Diese Fragen konnten nun mit dem gewonnenen Antikörper gegen Atγ-COP beantwortet werden. Durch Immunogoldmarkierung wurden COPI

Vesikel am GApp der Parenchymzellen von Erbsenkotyledonen als ein weiterer Vesikeltyp identifiziert (siehe Kap. 3.6). Im Gegensatz zu COPI Vesikeln, die mit dem Antikörper gegen At γ -COP eindeutig markiert worden waren, zeigten DVs keine Markierung. Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, unterscheiden sich immunogoldmarkierte COPI Vesikel durch ihren kleineren Durchmesser und ihre sichtbare Proteinhülle in Kryoschnitten von DVs. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach klassischen Aldehyd/Osmium Fixierungen, die keine Proteinhülle an Membranen von DVs sichtbar machen konnten (Hohl et al., 1996; Robinson et al., 1998), wurden mit diesen Daten bestätigt. Da COPI Vesikel an der Sortierung und an dem Transport von Proteinen im GApp und/oder zwischen GApp und ER teilnehmen, kann für den GApp der Parenchymzellen von Erbsenkotyledonen ein paralleler Proteintransport sowohl durch zisternale Reifung als auch durch COPI Vesikel angenommen werden. Dies stimmt mit dem Transportmodell, das für Säugetierzellen vorgeschlagen wird, überein (siehe Kap. 1.2). Mit weiteren Untersuchungen kann nun herausgefunden werden, welche Moleküle als Fracht in COPI Vesikeln von Erbsenkotyledonen transportiert werden.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die partielle Charakterisierung der Hüllproteine von pflanzlichen COP Vesikeln, ihre Lokalisation und den Nachweis ihrer Bedeutung am Proteintransport die Grundlagen für weitergehende Studien des sekretorischen Weges in Pflanzen geschaffen. Die neuesten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigen zahlreiche Unterschiede zwischen pflanzlichen und tierischen Zellen bezogen auf die Retentions- und Exportmechanismen der Proteine im ER und GApp (Pagny et al., 1999, 2000; Hillmer et al., 2001; Phillipson et al., 2001). Darüber hinaus sind wahrscheinlich die Frachtmoleküle der COP Vesikel von Pflanzenzellen andere als die von Hefe und Säugetierzellen. Zunächst kann untersucht werden, welche Frachtmoleküle von COP Vesikeln innerhalb des GApp oder zwischen GApp und ER in Pflanzenzellen transportiert werden. Damit können neue Erkenntnisse über die Retentionsmechanismen von ER-Proteinen und ein eventuelles Recycling dieser Proteine durch COPI Vesikel in Pflanzenzellen gewonnen werden. Des Weiteren kann die Funktion der Proteinhülle von COP Vesikeln bei der Aufnahme der Fracht erforscht werden. Für die Sortierung der Frachtmoleküle ist die Funktion der Proteine der p24-Familie in Hefe und Säugetierzellen zum Teil nachgewiesen worden (siehe Kap. 1.3.2 und 1.3.3). Ihre Rolle beim Proteintransport durch COP Vesikel scheint in Säugetieren mehr als in Hefe notwendig zu sein (Denzel et al., 2000; Springer et al., 2000). Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Proteine in Pflanzenzellen wird es ermöglichen, die Wechselwirkungen zwischen p24-Proteinen und den Untereinheiten von Proteinhüllen der COP Vesikel bzw. ihren löslichen Frachtmolekülen in Pflanzenzellen zu untersuchen. Interessant ist dabei, welche Bedeutung die Funktion der p24-

Proteine für die Proteinsortierung in Pflanzenzellen hat. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Frachtmolekülen in *in vitro* induzierte COP Vesikel durch die Verwendung von GTP γ S zum großen Teil verhindert wird (Nickel et al., 1998). Aussagekräftiger ist jedoch immer eine *in situ* Untersuchung. Wie in dieser Arbeit und auch für Säugetierzellen (Orci et al., 1997) gezeigt wurde, ist die Tokuyasu-Technik für solche Untersuchungen sehr geeignet.

5 Zusammenfassung

- 1) In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Antikörper gegen Proteine aus Pflanzen hergestellt, die homolog zu γ -COP und Sec23p - die Bestandteile der Proteinhülle der COPI bzw. COPII Vesikel von Hefe und Säugetierzellen - sind. Mit diesen Antikörpern wurden in Pflanzenzellen At γ -COP mit einer Molekularmasse von 100 kDa und AtSec23p mit einer Molekularmasse von 85 kDa identifiziert. Beide Proteine kommen sowohl löslich als auch membrangebunden in Pflanzenzellen vor.
- 2) Es ist gelungen, diese Proteine durch Ammoniumsulfatfraktionierung der Cytosolfraction aus Blumenkohlinfloreszenzen aufzukonzentrieren und sie von einem großen Teil der endogenen Proteasen zu trennen.
- 3) Durch Gelfiltrationschromatographie cytosolischer Proteine wurde nachgewiesen, dass At γ -COP und AtSec23p Bestandteile verschiedener Proteinkomplexe sind. At γ -COP kam dabei in einem Komplex mit einer Molekularmasse von 700 kDa und AtSec23p in einem Komplex mit einer Molekularmasse von 400 kDa vor. Durch eine Behandlung mit Neomycin konnten diese Proteinkomplexe aufgrund ihrer verschiedenen Bindungseigenschaften einfach voneinander getrennt werden.
- 4) Es wurde gezeigt, dass At γ -COP und AtSec23p spezifisch als periphere Proteine an die cytoplasmatische Seite von Membranen binden. At γ -COP wurde an Membranen des GApp und AtSec23p an ER-Membranen nachgewiesen. Beide Proteine wurden ebenfalls als Bestandteile der pflanzlichen COP Vesikel nachgewiesen. Die Beeinträchtigung ihrer Membranbindung durch niedrige Temperatur, welche die Vesikelbildung beeinflusst, wies auf die physiologische Bedeutung ihrer Membranassoziation am vesikelvermittelten Proteintransport hin. Durch BFA-Behandlung konnte At γ -COP sehr schnell von Membranen abdissoziiert werden. Die Dissoziation des pflanzlichen Coatomers von Membranen führt möglicherweise zur Freilegung der v-SNAREs des GApp, die so mit t-SNAREs der ER-Membranen in Wechselwirkung treten und dadurch die Fusion von GApp und ER ermöglichen.
- 5) Mit Hilfe der Immunlokalisierung wurden COPI Vesikel erstmals in pflanzlichen Zellen identifiziert. Diese Vesikel weisen eine Größe von 50-60 nm auf und sind kleiner als COPI Vesikel der Säugetierzellen. Die statistische Analyse der Immunmarkierungen mit den COPI-Antikörpern ergab, dass diese Vesikel überwiegend im *cis*-Bereich des GApp vorkommen. Das weist auf eine besondere Funktion der *cis*-Zisternen des GApp in Pflanzenzellen hin. In mit der α -Amylase-HDEL transformierten Tabakpflanzen wurde dieses Enzym als mögliches Frachtmolekül von COPI Vesikeln in der äußersten *cis*-Zisterne des GApp lokalisiert. Die *cis*-

most Zisterne scheint deshalb in Pflanzenzellen eine ähnliche Funktion zu erfüllen wie das ERGIC in Säugetierzellen.

- 6) Durch Immunogoldmarkierung wurden COPI Vesikel am GApp der Parenchymzellen von Erbsenkotyledonen als ein weiterer Vesikeltyp nachgewiesen, der nicht mit DVs identisch ist. Es wurde postuliert, dass neben der angenommenen Zisternenreifung in diesen Zellen ein Proteintransport durch COPI Vesikel am GApp stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

- Ahle S., Mann A., Eichelsbacher U., Ungewickell E. (1988)
Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* **7**, 919-929
- Ahmed S.U., Bar-Peled M., Raikhel N.V. (1997)
Cloning and subcellular location of an Arabidopsis receptor-like protein that shares common features with protein-sorting receptors of eukaryotic cells. *Plant Physiol.* **114**, 325-336
- Andreeva A.V., Kutuzov M.A., Evans D.E., Haws C.R. (1998)
The structure and function of the Golgi apparatus: a hundred years of questions. *J. Exp. Bot.* **49**, 1281-1291
- Andrews D.W., Johnson A.E. (1996)
The translocon: more than a hole in the ER membrane? *Trends Biochem. Sci.* **21**, 365-369
- Aridor M., Bannykh S.I., Rowe T., Balch W.E. (1995)
Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Cell Biol.* **131**, 875-893
- Aridor M., Bannykh S.I., Rowe T., Balch W.E. (1999)
Cargo can modulate COPII vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **274**, 4389-4399
- Aridor M., Weissman J., Bannykh S.I., Nuoffer C., Balch W.E. (1998)
Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J. Cell. Biol.* **141**, 61-70
- Arondel V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H.M., Somerville C.R. (1992)
Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. *Science* **258**, 1353-1335
- Balch W.E., Dunphy W.G., Braell W.A., Rothman J.E. (1984)
Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* **39**, 405-416
- Balch W.E., McCaffery M., Plutner H., Farquhar M.G. (1994)
Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* **76**, 841-852
- Bannykh S.I., Balch W.E. (1997)
Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J. Cell Biol.* **138**, 1-4
- Bannykh S.I., Balch W.E. (1998)
Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 463-475

- Barlowe C., d'Enfert C., Schekman R. (1993)
Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**, 873-879
- Barlowe C. (1995)
COPII: a membrane coat that forms endoplasmic reticulum-derived vesicles. *FEBS Lett.* **369**, 93-96
- Barlowe C. (1998)
COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**, 67-86
- Barlowe C., Orci L., Yeung T., Hosobuchi M., Hamamoto S., Salama N., Rexach M.F., Ravazzola M., Amherdt M., Schekman R. (1994)
COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907
- Barlowe C., Schekman R. (1993)
SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**, 347-349
- Bar-Peled M., Raikhel N.V. (1997)
Characterization of AtSec12 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol.* **114**, 315-324
- Bassham D.C., Gal S., Conceição A.S., Raikhel N.V. (1995)
An Arabidopsis syntaxin homologue isolated by functional complementation of a yeast pep12 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7262-7266
- Baydoun E.A.H., Brett C.T. (1997)
Distribution of xylosyltransferases and glucuronyltransferase within the Golgi apparatus in etiolated pea (*Pisum sativum* L.) epicotyls. *J. Exp. Bot.* **48**, 1209-1214
- Becker B., Bolinger B., Melkonian M. (1995)
Anterograde transport of algal scales through the Golgi complex is not mediated by vesicles. *Trends Cell Biol.* **5**, 305-307
- Becker B., Melkonian M. (1996)
The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution. *Microbiol. Rev.* **60**, 697-721
- Bednarek S.Y., Ravazzola M., Hosobuchi M., Amherdt M., Perrelet A., Schekman R., Orci L. (1995)
COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* **83**, 1183-1196

- Belden W.J., Barlowe C. (1996)
Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol Chem.* **271**, 26939-26946
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987)
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99
- Blum R., Pfeiffer F., Feick P., Nastainczyk W., Kohler B., Schäfer K.H., Schulz I. (1999)
Intracellular localization and *in vivo* trafficking of p24A and p23. *J. Cell Sci.* **112**, 537-548
- Boevink P., Oparka K., Santa Cruz S., Martin B., Betteridge A., Hawes C. (1998)
Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* **15**, 441-447
- Bonfanti L., Mironov A.A. Jr., Martinez-Menarguez J.A., Martella O., Fusella A., Baldassarre M., Buccione R., Geuze H.J., Mironov A.A., Luini A. (1998)
Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* **95**, 993-1003
- Bradford M.M. (1976)
A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Braulke T. (1996)
Origin of lysosomal proteins. In: J.B. Lloyd, R.W. Mason; *Subcellular Biochemistry. Biology of the lysosome*. Plenum Press, New York, USA, **27**, 15-49
- Bremser M., Nickel W., Schweikert M., Ravazzola M., Amherdt M., Hughes C.A., Söllner T.H., Rothman J.E., Wieland F.T. (1999)
Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* **96**, 495-506
- Brown H.A., Gutowski S., Moomaw C.R., Slaughter C., Sternweis P.C. (1993)
ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144
- Bruyant-Vannier M.P., Gaudient-Schaumann A., Boulard T., Morvan C. (1996)
Solubilization and partial characterization of pectin methyltransferase from flax cells. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 489-499

- Campbell I. (1988)
Standard media for cultivation yeast. In: I. Campbell, J.H. Duffus; *Yeast: a practical approach*. IRL Press, Oxford, UK, 277
- Campbell J.L., Schekman R. (1997)
Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum-derived COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 837-842
- Cao X., Rogers S.W., Butler J., Beevers L., Rogers J.C. (2000)
Structural Requirements for Ligand Binding by a Probable Plant Vacuolar Sorting Receptor. *Plant Cell* **12**, 493-506
- Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. (1956)
Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**, 1756-1758
- Chrispeels M.J. (1991)
Sorting of proteins in the secretory system. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 21-53
- Chrispeels M.J., Higgins T.J.V., Spencer H. (1982)
assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. *J. Cell Biol.* **93**, 306-313
- Chu D.S., Pishvae B., Payne G.S. (1996)
The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 33123-33130
- Chu D.S., Pishvae B., Payne G.S. (1999)
A modulatory role for clathrin light chain phosphorylation in Golgi membrane protein localization during vegetative growth and during the mating response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **10**, 713-726
- Ciufo L.F., Boyd A. (2000)
Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 8382-8388
- Cluett E.B., Brown W.J. (1992)
Adhesion of Golgi cisternae by proteinaceous interactions: intercisternal bridges as putative adhesive structures. *J. Cell Sci.* **103**, 773-784
- Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L. (1972)
Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114

- Colley K.J. (1997)
Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13
- Conceição A.S., Marty-Mazars D., Bassham D.C., Sanderfoot A.A., Marty F., Raikhel N.V. (1997)
The syntaxin homologue AtPEP12p resides on a late post-Golgi compartment in plants. *Plant Cell* **9**, 571-582
- Connolly C.N., Futter C.E., Gibson A., Hopkins C.R., Cutler D.F. (1994)
Transport into and out of the Golgi-complex studied by transfecting cells with cDNAs encoding horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.* **127**, 641-652
- Cooper T.G. (1980)
Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin, BRD, 348-352
- Cosson P., Letourneur F. (1994)
Coatomer interaction with dilysin endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-1631
- Coughlan S.J., Hastings C, Winfrey R Jr. (1997)
Cloning and characterization of the calreticulin gene from *Ricinus communis* L. *Plant Mol. Biol.* **34**, 897-911
- Crofts A.J., Leborgne-Castel N., Hillmer S., Robinson D.G., Phillipson B., Carlsson L.E., Ashford D.A., Denecke J. (1999)
Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell* **11**, 2233-2247
- Crofts A.J., Leborgne-Castel N., Pesca M., Vitale A., Denecke J. (1998)
BiP and calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* **10**, 813-823
- Dairman M., Donofrio N., Domozych D.S. (1995)
The effect of brefeldin A upon the Golgi apparatus of green algal flagellate, *Gloemonas kupfferi*. *J. Exp. Bot.* **46**, 181-186
- Dean N., Pelham H.R.B. (1990)
Recycling of proteins from the Golgi compartment to the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* **111**, 369-377
- Dell'Angelica E.C., Klumperman J., Stoorvogel W., Bonifacino J.S. (1998)
Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* **280**, 431-434
- Dell'Angelica E.C., Mullins C., Bonifacino J.S. (1999)
AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* **274**, 7278-7285

- Dell'Angelica E.C., Ohno H., Ooi C.E., Rabinovich E., Roche K.W., Bonifacino J.S. (1997)
AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* **16**, 917-928
- Demmer A. (1991)
Versuche zur Verbesserung von coated Vesikel Isolierung aus Pflanzen. Diplomarbeit,
Abteilung für strukturelle Zellbiologie, Universität Göttingen
- Demmer A., Holstein S.E.H., Hinz G., Schauer mann G., Robinson D.G. (1993)
Improved coated vesicle isolation allows better characterisation of clathrin polypeptides.
J. Exp. Botany **44**, 23-33
- Denecke J., Botterman J., Deblaere R. (1990)
Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell.* **2**, 51-59
- Denecke J., De Rycke R., Botterman J. (1992)
Plant and mammalian sorting for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a
conserved epitope. *EMBO J.* **11**, 2345-2355
- Denecke J., Goldman M.H.S., Demolder J., Seurinck J., Botterman, J. (1991)
The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. *Plant Cell* **3**,
1025-1035
- Denecke J. (1996)
Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis
and transport. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 197-205
- d'Enfert C., Barlowe C., Nishikawa S., Nakano A., Schekman R. (1991)
Structural and functional dissection of a membrane glycoprotein required for vesicle
budding from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5727-5734
- Denzel A., Otto F., Girod A., Pepperkok R., Watson R., Rosewell I., Bergeron J.J., Solari R.C.,
Owen M.J. (2000)
The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr. Biol.* **10**,
55-58
- Depta H., Holstein S.E.H., Robinson D.G., Lützel schwalb M., Michalke, W. (1991)
Membrane markers in highly purified clathrin-coated vesicles from *Cucurbita*
hypocotyles. *Planta* **183**, 434-442
- Dhugga K.S., Tiwari S.C., Ray P.M. (1997)
A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall
synthesis: purification, gene cloning and *trans* Golgi localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA **94**, 7679-7684

- Dominguez M., Dejgaard K., Füllekrug J., Dahan S., Fazel A., Paccaud J.P., Thomas D.Y., Bergeron J.J.M., Nilsson T. (1998)
gp25L/emp24/p24 protein family members of the *cis*-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* **140**, 751-765
- Donaldson J.G., Finazzi, D., Klausner R.D. (1992)
Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-352
- Donaldson J.G., Klausner R.D. (1994)
ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 527-532
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988)
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145
- Driouich A., Staehelin L.A. (1997)
The plant Golgi apparatus: structural organization and functional properties. In: E.G. Berger, J. Roth; *The Golgi apparatus*. Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz, 275-301
- Driouich A., Zhang G.F., Staehelin L.A. (1993)
Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* **101**, 1363-1373
- Drucker M. (1995)
ATP-hydrolysierende Enzyme in pflanzlichen "Clathrin-Coated Vesicles". Dissertation, Universität Göttingen, Cuvillier Verlag, Göttingen
- Drucker M.; Herkt B.; Robinson D.G. (1995)
Demonstration of a beta-type adaptin at the plant plasma membrane. *Cell Biol. Int.* **19**, 191-201
- Duden R., Hosobuchi M., Hamamoto S., Winey M., Byers B., Schekman R. (1994)
Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J. Biol. Chem.* **269**, 24486-24495
- Dupree P., Sherrier D.J. (1998)
The plant Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**, 259-270
- Ellis R.J., Hartl F.U. (1999)
Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 102-110
- Elrod-Erickson M.J., Kaiser C.A. (1996)
Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1043-1058

- Espenshade P., Gimeno R.E., Holzmacher E., Teung P., Kaiser C.A. (1995)
Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J. Cell Biol.* **131**, 311-324
- Evans E.A., Gilmore R., Blobel G. (1986)
Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 581-585
- Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin, C.R. (1978)
Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Biochem.* **15**, 429-436
- Farquhar M.G., Hauri H.P. (1997)
Protein sorting and vesicular traffic in the Golgi apparatus. In: E.G. Berger, J. Roth; *The Golgi apparatus*. Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz, 63-129
- Farquhar M.G., Palade G.E. (1981)
The Golgi apparatus (complex) - (1954-1981) - from artifact to center stage. *J. Cell Biol.* **91**, 77-103
- Farquhar M.G., Palade G.E. (1998)
The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* **8**, 2-10
- Fichman J., Taiz L., Gallagher S., Leonard R.T., Depta H., Robinson D.G. (1989)
Immunological comparison of the coated vesicle H⁺-ATPase of plant and animals. *Protoplasma* **153**, 117-125
- Fiedler K., Veit M., Stamnes M.A., Rothman J.E. (1996)
Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396-1399
- Füllekrug J., Nilsson T. (1998)
Protein sorting in the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 77-84
- Galili G., Sengupta-Gopalan C., Ceriotti A. (1998)
The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1-29
- Gardiner M., Chrispeels M.J. (1975)
Involvement of the Golgi apparatus in the synthesis and secretion of hydroxyproline-rich cell wall glycoproteins. *Plant Physiol.* **5**, 536-514
- Gaynor E.C., Emr S.D. (1997)
COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J. Cell Biol.* **136**, 789-802

Gilmore R. (1993)

Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* **75**, 589-592

Gimeno R.E., Espenshade P., Kaiser C.A. (1995)

SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J. Cell Biol.* **131**, 325-338

Gimeno R.E., Espenshade P., Kaiser C.A. (1996)

COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Mol. Biol. Cell.* **7**, 1815-1823

Glick B.S., Elston T., Oster A. (1997)

A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. *FEBS Lett.* **414**, 177-181

Goda Y., Pfeffer S.R. (1991)

Identification of a novel, N-ethylmaleimide-sensitive cytosolic factor required for vesicular transport from endosomes to the trans-Golgi network *in vitro*. *J. Cell Biol.* **112**, 823-831

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. (1996)

Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567

Goldberg J. (2000)

Decoding of sorting signals by coatomer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell* **100**, 671-679

Gommel D., Orci L., Emig E.M., Hannah M.J., Ravazzola M., Nickel W., Helms J.B., Wieland F.T., Sohn K. (1999)

p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett.* **447**, 179-185

Gomord V., Denmat L.-A., Fitchette-Lainé A.-C., 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

- Gomord V., Faye L. (1996)
Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 165-181
- Gomord V., Wee E., Faye L. (1999)
Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Biochimie.* **81**, 607-618
- Goud B., Huet C., Louvard D. (1985)
Assembled and unassembled pools of clathrin: a quantitative study using an enzyme immunoassay. *J. Cell Biol.* **100**, 521-527
- Gravotta D., Adesnik M., Sabatini D.D. (1990)
Transport of influenza HA from the trans-Golgi network to the apical surface of MDCK cells permeabilized in their basolateral plasma membranes: energy dependence and involvement of GTP-binding proteins. *J. Cell Biol.* **111**, 2893-2908
- Griffiths G., Ericsson M., Krijnse-Locker J., Nilsson T., Goud B., Söling H.D., Tang B.L., Wong S.W., and Hong W. (1994)
Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **127**, 1557-1574
- Griffiths G., Pepperkok R., Locker J.K., Kreis T.E. (1995)
Immunocytochemical localization of beta-COP to the ER-Golgi boundary and the TGN. *J. Cell Sci.* **108**, 2839-2856
- Griffiths G., Simons K. (1986)
The *trans* Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443
- Gröne T. (1986)
Proteolytische Aktivitäten bei *Chorella sorokiniana* unter besonderer Berücksichtigung regulatorischer Effekte. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Guy C.L., Haskell D., Li Q.-B. (1998)
Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. *Cryobiology* **36**, 301-314
- Guy C.L., Niemi K.J., Brambl R. (1985)
Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3673-3677
- Hakes D.J., Dixon J.E. (1992)
New vectors for high level expression of recombinant proteins in bacteria. *Anal. Biochem.* **202**, 293-298

- Hamano T.Y., Oji S., Okamoto Y., Mitsuhashi Y., Matsuki Y. (1983)
A nitrate reductase-inactivating factor in barley (*Hordeum distichum* L.) leaves. *Plant Cell physiol.* **24**, 1337-1341
- Hamman B.D., Chen J.C., Johnson E.E., Johnson A.E. (1997)
The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**, 535-544.
- Hammons C., Helenius A. (1995)
Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523-529
- Hanahan D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanahan D. (1985)
Techniques for transformation of *E. coli*. In: D. M. Glover; DNA cloning. IRL Press, Oxford, UK
- Hanna R., Brummell D.A., Camirand A., Hensel A., Russel E.F., Maclachlan G.A. (1991)
Solubilization and properties of GDP-fucosyltransferases from pea epicotyl membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 7-13
- Happel N., Robinson D.G., Holstein S.E.H. (1997)
An *Arabidopsis thaliana* cDNA clone (Accession No. AF009631) is homologous to the micro-adaptins of clathrin coated vesicle adaptor complexes. *Plant Physiol. PGR* 97-168
- Hara-Kuge S., Kuge O., Orci L., Amherdt M., Ravazzola M., Wieland F.T., Rothman J.E. (1994)
En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **124**, 883-892
- Hara-Nishimura I., Shimada T., Hiraiwa N., Nishimura M. (1995)
Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J. Plant Physiol.* **145**, 632-640
- Hara-Nishimura I., Takenchi Y., Inoue K., Nishimura M. (1993)
Vesicle transport and processing of the precursor to 2S albumin in pumpkin. *Plant J.* **4**, 793-800
- Harley S.M., Beevers L. (1989)
Coated vesicles are involved in the transport of storage proteins during seed development in *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.* **91**, 674-678
- Harlow E., Lane D. (1988)
Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 309-312
- Harter C. (1999)
COPI proteins: a model for their role in vesicle budding. *Protoplasma* **207**, 125-132

- Harter C., Pavel J., Coccia F., Draken E., Wegehangel S., Tschochner H., Wieland F.T. (1996)
Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1902-1906
- Harter C., Wieland F.T. (1998)
A single binding site for di-lysine retrieval motifs and p23 within the γ -subunit of coatomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11649-11654
- Hartl F.U. (1996)
Molecular chaperons in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580
- Hatefi Y., Hanstein W.G. (1974)
Destabilization of membranes with chaotropic ions. *Methods Enzymol.* **31**, 770-790
- Hawes C., Crooks K., Coleman J., Satiat-Jeunemaitre B. (1995)
Endocytosis in plants: fact or artefact? *Plant Cell Environment* **18**, 1245-1252
- Hawes C., Satiat-Jeunemaitre B. (1996)
Stacks of questions: How does the plant Golgi work? *Trends Plant Sci.* **1**, 395-401
- Helenius A., McCaslin D.R., Fries E., Tanford C. (1979)
Properties of Detergents. *Methods Enzymol.* **56**, 734-749
- Helms J.B., Palmer D.J., Rothman J.E. (1993)
Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **121**, 751-760
- Helms J.B., Rothman J.E. (1992)
Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-354
- Henderson J., Satiat-Jeunemaitre B., Napier R., Hawes C.R. (1994)
Brefeldin A-induced disassembly of Golgi apparatus is followed by disruption of the endoplasmic reticulum in plant cells. *J. Exp. Bot.* **45**, 1347-1351
- Herman E.M. (1994)
Multiple origins of intravacuolar protein accumulation of plant cells. *Adv. Struct. Biol.* **3**, 243-283
- Herman E.M., Tague B.W., Hoffman L.M., Kjemtrupp S.E., Chrispeels, M.J. (1990)
Retention of phytohemagglutinin with carboxy terminal tetrapeptide KDEL in the nuclear envelope and the endoplasmic reticulum. *Planta* **182**, 305-312
- Hicke L., Yoshihisa T., Schekman R. (1992)
Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **3**, 667-676

- Hillmer S., Freundt H., Robinson D.G. (1988)
The partially coated reticulum and its relationship to the Golgi apparatus in higher plant cells. *Eur. J. Cell Biol.* **47**, 206-212
- Hillmer S., Movafeghi A., Robinson D.G., Hinz G. (2001)
Vacuolar storage proteins are sorted in the *cis*-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* in Druck
- Hinz G., Hillmer S., Bäumer M., Hohl I. (1999)
Vacuolar storage proteins and the putative sorting receptor BP-80 exit the Golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* **11**, 1509-1524
- Hirst J., Bright N.A., Rous B., Robinson M.S. (1999)
Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2787-2802
- Hirst J., Robinson M.S. (1998)
Clathrin and adaptors. *Biochem. Biophys. Acta* **1404**, 173-193
- Hoh B., Hinz G., Jeong B.-K., Robinson D.G. (1995)
Protein storage vacuoles form *de novo* during pea cotyledon development. *J. Cell Sci.* **108**, 299-310
- Hohl I., Robinson D.G., Chrispeels M.J., Hinz G. (1996)
Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J. Cell Sci.* **109**, 2539-2550
- Hong B., Ichida A., Wang Y., Gens J.S., Pickard B.G., Harper J.F. (1999)
Identification of a calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase in the endoplasmic reticulum. *Plant-Physiol.* **119**, 1165-1176
- Hosobuchi M., Kreis T., Schekman R. (1992)
Sec21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature* **360**, 603-605
- Hsu V.W., Shah N., Klausner R.D. (1992)
A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell* **69**, 625-635
- Huang K.M., Gullberg L., Nelson K.K., Stefan C.J., Blumer K., Lemmon S.K. (1997)
Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *J. Cell Sci.* **110**, 899-910
- Huang P.H., Chiang H.L. (1997)
Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway. *J. Cell Biol.* **136**, 803-810

- Hudson R.T., Draper R.K. (1997)
Interaction of coatomer with aminoglycoside Antibiotics: evidence that coatomer has at least two dilysin binding sites. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1901-1910
- Huguency P., Bouvier F., Badillo A., d'Harlingue A., Kuntz M., Camara B. (1995)
Identification of a plastid protein involved in vesicle fusion and/or membrane protein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5630-5634
- Jackson M.R., Nilsson T., Peterson P.A. (1993)
Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **121**, 317-333
- Jiang L., Rogers J.C. (1999)
The Role of BP-80 and Homologs in Sorting Proteins to Vacuoles. *Plant Cell* **11**, 2069-2071
- Kahn R.A., Gilman A.G. (1986)
The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 7906-7911
- Kahn R.A., Randazzo P., Serafini T., Weiss O., Rulka C., Clark J., Amherdt M., Roller P., Orci L., Rothman J.E. (1992)
The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J. Biol. Chem.* **267**, 13039-13046
- Kahn R.A., Terui T., Randazzo P.A. (1996)
Effects of acid phospholipids on ARF activities: potential roles in membrane traffic. *J. Lipid Mediat. Cell Signal* **14**, 209-214
- Kirsch T., Paris N., Butler J.M., Beevers L., Rogers, J.C. (1994)
Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3403-3407
- Kirsch T., Saalbach G., Raikhel N.V., Beevers, L. (1996)
Interaction of a potential vacuolar targeting receptor with amino- and carboxyl-terminal targeting determinants. *Plant Physiol.* **111**, 469-474
- Klappa P., Zimmermann M., Zimmermann R. (1994)
The membrane proteins TRAMP and sec61 alpha p may be involved in post-translational transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *FEBS Lett.* **341**, 281-287
- Kopito R.R. (1997)
ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-430

- Kornfeld S. (1992)
Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307-330
- Ktistakis N.T., Brown H.A., Waters M.G., Sternweis P.C., Roth M.G. (1996)
Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.* **134**, 295-306
- Kuehn M.J., Hermann J.M., Schekman R. (1998)
COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**, 187-190
- Laemmli U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Le Borgne R., Griffiths G., Hoflack B. (1996)
Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 2162-2170
- Lee G.J., Pokala N., Vierling E. (1995)
Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**, 10432-10438
- Lee H.I., Gal S., Newman T.C., Raikhel N.V. (1993)
The Arabidopsis endoplasmic reticulum retention receptor functions in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11433-11437
- Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fischette-Laine A.C., Gomord V., Faye L. (1998)
N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **38**, 31-48
- Levanony H., Rubin R., Altschuler Y., Galili G. (1992)
Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J. Cell Biol.* **119**, 1117-1128
- Lewis M.J., Pelham, H.R.B. (1992)
Ligand-induced redistribution of the human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* **68**, 353-364
- Lin H.-B., Harley B., Butler J.M., Beevers L. (1992)
Multiplicity of clathrin light-chain-like polypeptides from developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons. *J. Cell Sci.* **103**, 1127-1137
- Liou W., Geuze H.J., Slot J.W. (1996)
Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 41-58

- Lippincott-Schwartz J., Yuan L., Tipper C., Amherdt M., Orci L., Klausner R.D. (1991)
Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**, 601-616
- Lippincott-Schwartz J., Yuan L.C., Bonifacino J.S., Klausner R.D. (1989)
Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813
- Lowe M., Kreis T.E. (1995)
In vitro assembly and disassembly of coatomer. *J. Biol. Chem.* **270**, 31364-31371
- Lowe M., Kreis T.E. (1996)
In vivo assembly of coatomer, the COP-I coat precursor. *J. Biol. Chem.* **271**, 30725-30730
- Lowe M., Kreis T.E. (1998)
Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 53-66
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr L.A., Randell R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Maldonado-Mendoza I.E., Nessler C.L. (1997)
Molecular characterization of the AP19 gene family in *Arabidopsis thaliana*: components of the Golgi AP-1 clathrin assembly protein complex. *Plant Mol. Biol.* **35**, 865-872
- Maldonado-Mendoza I.E., Nessler C.L. (1996)
Cloning and expression of a plant homologue of the small subunit of the Golgi-associated clathrin assembly protein AP19 from *Camptotheca acuminata*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1149-1153
- Malhotra V., Serafini T., Orci L., Shepherd J.C., Rothman J.E. (1989)
Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* **58**, 329-336
- Mansour S.J., Skaug J., Zhao X.H., Giordano J., Scherer S.W., Melancon P. (1999)
p200 ARF-GEP1: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 7968-7973
- Martinez-Menarguez J.A., Geuze H.J., Slot J.W., Klumperman J. (1999)
Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* **98**, 81-90
- Marzioch M., Henthorn D.C., Herrmann J.M., Wilson R., Thomas D.Y., Bergeron J.J., Solari R.C., Rowley A. (1999)
Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1923-1938

- Matsuoka K., Neuhaus J.M. (1999)
Cis-elements of protein transport to plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* **50**, 165-174
- Matveeva E., Whiteheart S.W. (1998)
The effects of SNAP/SNARE complexes on the ATPase of NSF. *FEBS Lett.* **435**, 211-214
- McCleary B.V., Sheehan H. (1987)
Measurement of cereal α -amylase : a new assay procedure. *J. Cereal Sci.* **6**, 237-251
- Melançon P., Glick B.S., Malhotra V., Weidman P.J., Serafini T., Gleason M.L., Orci L., Rothman J.E. (1987)
Involvement of GTP-binding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell* **51**, 1053-1062
- Melkonian M., Becker B., Becker D. (1991)
Scale formation in algae. *J. Electron Microsc. Tech.* **17**, 165-178
- Merisko E.M., Farquhar M.G., Palade G.E. (1986a)
Redistribution of clathrin heavy and light chains in anoxic pancreatic acinar cells. *Pancreas* **1**, 110-123
- Merisko E.M., Fletcher M., Palade G.E. (1986b)
The reorganization of the Golgi complex in anoxic pancreatic acinar cells. *Pancreas* **1**, 95-109
- Miesenböck G., Rothman J.E. (1995)
The capacity to retrieve escaped ER proteins extends to the *trans*-most cisternae of the Golgi stack. *J. Cell Biol.* **129**, 309-319
- Miller E.A., Lee M.C.S., Anderson M.A. (1999)
Identification and characterization of a prevacuolar compartment in stigmas of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* **11**, 1499-1508
- Mironov A.A., Weidman P., Luini A. (1997)
Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J. Cell Biol.* **138**, 481-484
- Misumi Y., Misumi Y., Miki K., Takatsuki A., Tamura G., Ikehara Y. (1986)
Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 11398-11403
- Molinari M., Helenius A. (2000)
Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* **288**, 331-333
- Mollenhauer H.H., Morré D.J. (1991)
Perspectives on Golgi apparatus form and function. *J. Electron. Microsc. Tech.* **17**, 2-14

- Mollenhauer H.H., Morré D.J. (1994)
Structure of Golgi apparatus. *Protoplasma* **180**, 14-28
- Mollenhauer H.H., Morré D.J., Vanderwoude W.J. (1976)
Endoplasmic reticulum-Golgi apparatus associations in maize root tips. *Mikroskopie*. **31**, 257-272
- Moore P.J., Staehelin L.A. (1988)
Immunogold localization of the cell-wall-matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L.; implications for the secretory pathways. *Planta* **174**, 433-445
- Morré D.J. (1987)
The Golgi apparatus. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **17**, 211-253
- Movafeghi A., Happel N., Pimpl P., Tai G.-H., Robinson D.G. (1999)
Arabidopsis Sec21p and Sec23p homologs. Probable coat proteins of plant COP-coated vesicles. *Plant Physiol.* **119**, 1437-1445
- Mueller S.C., Branton D. (1984)
Identification of coated vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **98**, 341-346
- Munro S., Pelham H.R.B. (1987)
A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907
- Müntz K. (1998)
Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* **38**, 77-99
- Müntz K. (1989)
Intracellular protein sorting and the formation of protein reserves in storage tissue cells of plant seeds. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **185**, 315-335
- Nagahashi J., Nagahashi S.L. (1982)
Triton-stimulated nucleoside diphosphatase: Characterization. *Protoplasma* **112**, 174-180
- Nakano A., Brada D., Schekman R. (1988)
A membrane glycoprotein, Sec12p, is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J. Cell Biol.* **107**, 851-863
- Nakano A., Muramatsu M. (1989)
A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **109**, 2677-2691
- Nebenführ A., Gallagher L.A., Dunahay T.G., Frohlick J.A., Mazurkiewicz A.M., Meehl J.B., Staehelin L.A. (1999)
Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* **121**, 1127-1142

- Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., Smith T.F. (1994)
The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300
- Neuhaus J.M. (1996)
Protein targeting to the plant vacuole. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 217-221
- Neuhaus J.M., Rogers J.C. (1998)
Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* **38**, 127-144
- Neuhoff V., Stamm R. und Eibl H. (1985)
Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448
- Neven L.G., Haskell D.W., Guy C.L., Denslow N., Klein P.A., Green L.G., Silverman A. (1992)
Association of 70-kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold. *Plant Physiol.* **99**, 1362-1369
- Newman T., de Bruijn F.J., Green P., Keegstra K., Kende H., McIntosh L., Ohlrogge J., Raikhel N., Somerville S., Thomashow M. (1994)
Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**, 1241-1255
- Nickel W., Brügger B. (1999)
COPI-mediated protein and lipid sorting in the early secretory pathway. *Protoplasma* **207**, 115-124
- Nickel W., Huber L.A., Kahn R.A., Kipper N., Barthel A., Fasshauer D., Söling H.-D. (1994)
ADP Ribosylation factor and a 14-kD polypeptide are associated with heparan sulfate-carrying post-*trans*-Golgi Network secretory vesicles in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **125**, 721-732
- Nickel W., Malsam J., Gorgas K., Ravazzola M., Jenne N., Helms J.B., Wieland F.T. (1998)
Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTP γ S *in vitro*. *J. Cell Sci.* **111**, 3081-3090
- Nickel W., Sohn K., Bunning C., Wieland F.T. (1997)
p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11393-11398
- Nishimura N., Balch W.E. (1997)
A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**, 556-558
- Oka T., Nakano A. (1994)
Inhibition of GTP hydrolysis by Sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the ER-to-Golgi transport in yeast. *J. Cell Biol.* **124**, 425-434
- Oprins A., Duden R., Kreis T.E., Geuze H.J., Slot J.W. (1993)
 β -COP localizes mainly to the *cis*-Golgi side in exocrine pancreas. *J. Cell Biol.* **121**, 49-59

- Orci L., Glick B.S., Rothman J.E. (1986)
A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* **46**, 171-184
- Orci L., Malhotra V., Amherdt M., Serafini T., Rothman J.E. (1989)
Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell* **56**, 357-368
- Orci L., Palmer D.J., Amherdt M., Rothman J.E. (1993)
Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* **364**, 732-734
- Orci L., Perrelet A., Ravazzola M., Amherdt M., Rothman J.E., Schekman R. (1994)
Coatamer-rich endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11924-11928
- Orci L., Perrelet A., Rothman J.E. (1998)
Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2279-2283
- Orci L., Starnes M., Ravazzola M., Amherdt M., Perrelet M., Söllner T.H., Rothman J.E. (1997)
Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-349
- Orci L., Tagaya M., Amherdt M., Perrelet A., Donaldson J.G., Lippincott-Schwartz J., Klausner R.D., Rothman J.E. (1991)
Brefeldin A, a Drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* **22**, 1183-1195
- Ostermann J., Orci L., Tani K., Amherdt M., Ravazzola M., Elazar Z., Rothman J.E. (1993)
Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* **75**, 1015-1025
- Paccaud J.P., Reith W., Carpentier J.L., Ravazzola M., Amherdt M., Schekman R., Orci L. (1996)
Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1535-1546
- Pagano A., Letourneur F., Garcia-Estefania D., Carpentier J.L., Orci L., Paccaud J.P. (1999)
Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **274**, 7833-7840
- Pagny S., Cabanes-Macheteau M., Gillikin J.W., Leborgne-Castel N., Lerouge P., Boston R.S., Faye L., Gomord V. (2000)
Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* **12**, 739-756
- Pagny S., Lerouge P., Faye L., Gomord V. (1999)
Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **50**, 157-164
- Panzner S., Dreier L., Hartmann E., Kostka S., Rapoport T.A. (1995)
Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**, 561-570

- Paris N., Rogers J.C. (1996)
The role of receptors in targeting soluble proteins from the secretory pathway to the vacuole. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 223-227
- Paris N., Rogers S.W., Jiang L., Kirsch T., Beevers L., Phillips T.E., Rogers J.C. (1997)
Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor *Plant Physiol.* **115**, 29-39
- Pavel J., Harter C., Wieland F.T. (1998)
Reversible dissociation of coatamer: functional characterization of a β/δ -COP subcomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2140-2145
- Payne G.S., Baker D., van Tuinen E., Schekman R. (1988)
Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain-deficient yeast. *J. Cell Biol.* **106**, 1453-1461
- Pearse B.M., Robinson M.S. (1990)
Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 151-171
- Pelham H.R.B. (1988)
Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* **4**, 913-918
- Pelham H.R.B. (1989)
Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 1-23
- Pelham H.R.B. (1995)
Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 530-535
- Pesacreta T.C., Lucas W.J. (1984)
Plasma membrane coat and a coated vesicle-associated reticulum of membranes: their structure and possible interrelationship in *Chara corallina*. *J. Cell Biol.* **98**, 1537-1545
- Pesacreta T.C., Lucas W.J. (1985)
Presence of a partially-coated reticulum in angiosperms. *Protoplasma* **25**, 173-185
- Peterson G.L. (1977)
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356
- Peyroche A., Antonny B., Robineau S., Acker J., Cherfils J., Jackson C.L. (1999)
Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell* **3**, 275-285
- Peyroche A., Paris S., Jackson C.L. (1996)
Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**, 479-481

- Pfeffer S.R. (1996)
Transport vesicle docking: SNAREs and associates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 441-461
- Pfeffer S.R. (1999)
Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* **1**, 17-22
- Pfeffer S.R., Rothman J.E. (1987)
Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 829-852
- Phillipson B., Pimpl P., Crofts A.J., Taylor J.P., Movafeghi A., Robinson D.G., Denecke J. (2001)
COPII Vesicles support significant bulk flow of soluble proteins. *Cell* eingereicht
- Pimpl P. (1997)
Untersuchungen zur *in vitro* Induktion von COP-Vesikeln in transgenem Tabak. Diplomarbeit, Abteilung für strukturelle Zellphysiologie, Universität Göttingen
- Pimpl P., Movafeghi A., Coughlan S., Denecke J., Hillmer S., Robinson D.G. (2000)
In situ lokalization and *in vitro* induction of Plant COPI-coated vesicle. *Plant Cell* in Druck
- Pryer N.K., Salama N.R., Schekman R., Kaiser C.A. (1993)
Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum *in vitro*. *J. Cell Biol.* **120**, 865-875
- Pueyo J.J., Chrispeels M.J., Herman E.M. (1995)
Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic-reticulum occurs in the vacuole. *Planta* **3**, 586-596
- Rambourg A., Clermont Y. (1997)
Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in mammalian cells. In: E.G. Berger, J. Roth; *The Golgi apparatus*. Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz, 37-61
- Randazzo P.A. (1997)
Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 7688-7692
- Randazzo P.A., Kahn R.A. (1994)
GTP hydrolysis by ADP-ribosylation factor is dependent on both an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein and acid phospholipids. *J. Biol. Chem.* **269**, 10758-10763

- Rapoport T.A., Jungnickel B., Kutay U. (1996)
Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 271-303
- Ray P.M., Eisinger W.R., Robinson D.G. (1976)
Organelles involved in cell wall polysaccharide formation and transport in pea cells. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **89**, 121-146
- Rayon C., Lerouge P., Faye L. (1998)
The protein N-glycosylation in Plants. *J. Exp. Biol.* **49**, 1463-1472
- Reinhard C., Harter C., Bremser B., Brügger B., Sohn K., Helms J.B., Wieland F.T. (1999)
Receptor induced polymerization of coatomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1224-1228
- Rexach M.F., Latterich M., Schekman R.W. (1994)
Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* **126**, 1133-1148
- Rexach M.F., Schekman R.W. (1991)
Distinct biochemical requirements for the budding, targeting, and fusion of ER-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* **114**, 219-229
- Robinson D.G. (1985)
Plant membranes: endo- and plasmamembranes of plant cells. John Wiley and Sons, New York, USA
- Robinson D.G. (1996)
Clathrin-mediated trafficking. *Trends Plant Sci.* **1**, 349-355
- Robinson D.G., Bäumer M., Hinz G., and Hohl I. (1997)
Ultrastructure of the pea cotyledon Golgi apparatus: origin of dense vesicles and the action of brefeldin A. *Protoplasma* **200**, 198-209
- Robinson D.G., Braulke T., Denecke J., Happel N., Movafeghi A., Pimpl P. (1998)
New developments in plant coated vesicle research. In: I. Tsekos, M. Moustakas; *Progress in botanical research, proceedings of the 1st Balkan botanical congress*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 399-405
- Robinson D.G., Depta H. (1988)
Coated vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 53-99
- Robinson D.G., Hinz G. (1997)
Vacuole biogenesis and protein transport to the plant vacuole: a comparison with the yeast vacuole and the mammalian lysosome. *Protoplasma* **197**, 1-25
- Robinson D.G., Hinz G. (1999)
Golgi-mediated transport of seed storage proteins. *Seed Science Research* **9**, 267-283

- Robinson D.G., Hinz G. (2000)
Organelle isolation. In: B. Satiat-Jeunemaitre, C. Hawes; *Plant cell Biology: A practical approach*. IRL Press, Oxford, in Druck
- Robinson D.G., Hinz G., Holstein S.E.H. (1998)
The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* **38**, 49-76
- Robinson D.G., Hoh B., Hinz G., Jeong B.-K. (1995)
One vacuole or two vacuoles: do protein storage vacuoles arise *de novo* during pea cotyledon development? *J. Plant Physiol.* **145**, 654-664
- Robinson D.G., Kristen U. (1982)
Membrane flow via the Golgi apparatus of higher plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **77**, 89-127
- Robinson M.S. (1987)
100 kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intercellular distribution studied with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **104**, 887-895
- Robinson M.S. (1994)
The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 538-544
- Robinson M.S. (1997)
Coats and vesicle budding. *Trends Cell Biol.* **7**, 99-102
- Robinson M.S., Kreis T.E. (1992)
Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G protein activators. *Cell* **69**, 129-138
- Roca R., Stiefel V., Puigdomenech P. (1998)
Characterization of the sequence coding for the clathrin coat assembly protein AP17 (sigma2) associated with the plasma membrane from *Zea mays* and constitutive expression of its gene. *Gene* **208**, 67-72
- Rothman J.E. (1994)
Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63
- Rothman J.E., Orci L. (1992)
Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**, 409-415
- Rothman J.E., Warren G. (1994)
Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* **4**, 220-233
- Rothman J.E., Wieland F.T. (1996)
Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234
- Rutten T.L., Knuiman B. (1993)
Brefeldin A effects on tobacco pollen tubes. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 247-255
- Sabehat A., Lurie S., Weiss D. (1998)
Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. *Plant Physiol.* **117**, 651-658

- Salama N.R., Chuang J.S., Schekman R.W. (1997)
Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **8**, 205-217
- Salama N.R., Yeung T., Schekman R.W. (1993)
The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J.* **12**, 4073-4082
- Salinovic O., Montelaro R.C. (1986)
Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**, 341-347
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Sandelius A.S., Morr e D.G. (1990)
Plasma membrane isolation. In: C. Larsson, I.M. M ller; *The plant plasma membrane*. Springer Verlag, Berlin, 44-75
- Sanderfoot A.A., Ahmed S.U., Marty-Mazars D., Rapoport I., Kirchhausen T., Marty F., Raikhel N.V. (1998)
A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in Arabidopsis roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9920-9925
- Sanderfoot A.A., Kovaleva V., Zheng H., Raikhel N.V. (1999)
The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in Arabidopsis root cells. *Plant Physiol.* **121**, 929-938
- Sanderfoot A.A., Raikhel N.V. (1999)
The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* **11**, 629-642
- Saraste J., Kuismanen E. (1984)
Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell* **38**, 535-549
- Satiat-Jeunemaitre B., Hawes C. (1992)
Redistribution of a Golgi glycoprotein in plant cells treated with brefeldin A. *J. Cell Sci.* **103**, 1153-1166
- Satiat-Jeunemaitre B., Hawes C. (1993)
The distribution of secretory products in plant cells is affected by brefeldin A. *Cell Biol. Int.* **17**, 183-193

- Satiat-Jeunemaitre B., Cole L., Bourett T., Howard R., Hawes C. (1996)
Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking?
J. Microsc. **181**, 162-177
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Katoh T., Asamizu E., Tabata S. (2000)
Structural analysis of Arabidopsis thaliana chromosome 3. I. Sequence features of the
regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones. *DNA Res.* **7**, 131-135
- Scales S.J., Gomez M., Kreis T.E. (2000)
Coat proteins regulating membrane traffic. *Int. Rev. Cytol.* **195**, 67-144
- Scales S.J., Pepperkok R., Kreis T.E. (1997)
Visualization of ER to Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for
COPII and COPI. *Cell* **90**, 1137-1148
- Scheel J., Pepperkok R., Lowe M., Griffiths G., Kreis T.E. (1997)
Dissociation of coatamer from membranes is required for brefeldin A-induced transfer of
Golgi enzymes to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **137**, 319-333
- Schekman R., Orci L. (1996)
Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533
- Schimmöller F., Simon I., Pfeffer S.R. (1998)
Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* **273**, 22161-22164
- Schimmöller F., Singer-Krüger B., Schröder S., Krüger U., Barlowe C., Riezmann H. (1995)
The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect
in transport selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* **14**, 1329-1339
- Schindler T., Bergfeld R., Hohl M., Schopfer P. (1994)
Inhibition of Golgi apparatus function by brefeldin A in maize coleoptiles and its
consequences on auxin mediated growth, cell wall extensibility and secretion of cell wall
proteins. *Planta* **192**, 404-413
- Schledzewski K., Brinkmann H., Mendel R.R. (1999)
Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a
common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the
coatamer COPI. *J. Mol. Evol.* **48**, 770-778
- Schmid S.L., Braell W.A., Schlossman D.M., Rothman J.E. (1984)
A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages by 'uncoating ATPase'.
Nature **311**, 228-231
- Schmid S.L., Damke H. (1995)
Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J.* **9**, 1445-1453
- Schweizer A., Hauri H.-P. (1992)
The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin Cell Biol.* **4**,
600-608

- Seeger M., Payne G.S. (1992)
A role for clathrin in the sorting of vacuolar proteins in the Golgi complex of yeast. *EMBO J.* **11**, 2811-2818
- Semenza J.C., Hardwick K.G., Dean N., Pelham H.R. (1990)
ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**, 1349-1357
- Serafini T., Orci L., Amherdt M., Brunner M., Kahn R.A., Rothman J.E. (1991)
ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-253
- Shaywitz D.A., Espenshade P.J., Gimeno R.E., Kaiser C.A. (1997)
COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *J. Biol Chem.* **272**, 25413-25416
- Sheff D., Lowe M., Kreis T.E., Mellman I. (1996)
Biochemical heterogeneity and phosphorylation of coatomer subunits. *J. Cell Biol.* **271**, 7230-7236
- Shimada T., Kuroyanagi M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. (1997)
A pumpkin 72-kDa membrane protein of precursor-accumulating vesicles has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1414-20
- Silveira L.A., Wong D.H., Masiart W.R., Schekman R. (1990)
Yeast clathrin has a distinctive light chain that is important for cell growth. *J. Cell Biol.* **111**, 1437-1449
- Simpson F., Peden A.A., Christopoulou L., Robinson M.S. (1997)
Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* **137**, 835-845
- Singer S.J. (1974)
The molecular organization of membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 805-833
- Smith D.B., Johnson K.S. (1988)
Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusion with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40
- Sohn K., Orci L., Ravazzola M., Amherdt M., Bremser M., Lottspeich F., Fiedler K., Helms J.B., Wieland F.T. (1996)
A major membrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J. Cell Biol.* **135**, 1239-1248
- Söllner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J.E. (1993)
SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324

- Spang A., Matsuoka K., Hamamoto S., Schekman R., Orci L. (1998)
Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11199-11204
- Spiess M. (1995)
Heads or tails: what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett.* **369**, 76-79
- Springer S., Chen E., Duden R., Marzioch M., Rowley A., Hamamoto S., Merchant S., Schekman R. (2000)
The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4034-4039
- Springer S., Schekman R. (1998)
Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* **281**, 698-700
- Staehelein L.A. (1997)
The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* **11**, 1151-1165
- Staehelein L.A., Giddings T.H., Levy S., Lynch M.A., Moore P.J., Swords K.M.M. (1991)
Organization of the secretory system of cell wall glycoproteins and complex polysaccharides in plant cells. *Sem. Ser. - Soc. Exp. Biol.* **45**, 183-198
- Staehelein L.A., Moore I. (1995)
The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Ann. Rev. Plant Physiol. Molec. Biol.* **46**, 261-288
- Stamnes M.A., Craighead M.W., Hoe M.H., Lampen N., Geromanos S., Tempst P., Rothman J.E. (1995)
An integral protein component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8011-8015
- Stenbeck G., Schreiner R., Herrmann D., Auerbach S., Lottspeich F., Rothman J.E., Wieland F.T. (1992)
Gamma-COP, a coat subunit of non-clathrin-coated vesicles with homology to Sec21p. *FEBS Lett.* **314**, 195-198
- Studier F.W., Moffatt B.A. (1986)
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Sturm A., van Kuik J.A., Vliegthart J.F., Chrispeels M.J. (1987)
Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex

- oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin. *J. Biol. Chem.* **262**, 13392-13403
- Tanigawa G., Orci L., Amherdt M., Ravazzola M., Helms J.B., Rothman J.E. (1993)
Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **123**, 1365-1371
- Tartakoff A.M. (1986)
Temperature and energy dependence of secretory protein transport in the exocrine pancreas. *EMBO J.* **5**, 1477-1482
- Tartakoff A.M. (1987)
The secretory and endocytic paths: mechanisms and specificity of vesicular traffic in the cell cytoplasm. John Wiley & Sons, New York
- Tatu U., Helenius A. (1997)
Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **136**, 555-565
- Teasdale R.H., Jackson M.R. (1996)
Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Ann. Rev. Cell Biol.* **12**, 27-54
- Thomashow M.F. (1999)
Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 571-599
- Tisdale E.J., Plutner H., Matteson J., Balch W.E. (1997)
P53/58 binds COPI and is required for selective transport through the early secretory pathway. *J. Cell Biol.* **137**, 581-593
- Tokuyasu K.T. (1980)
Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J.* **12**, 381-403
- Tokuyasu K.T. (1986)
Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J. Microsc.* **143**, 139-149
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354
- Townsley F.M., Pelham H.R. (1994)
The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 211-216

- Townsley F.M., Wilson D.W., Pelham H.R.B. (1993)
Mutational analysis of the lumen KDEL receptor: Distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding, and retrograde transport. *EMBO J.* **12**, 2821-2829
- Traub L.M., Bannykh S.I., Rodel J.E., Aridor M., Balch W.E., Kornfeld S. (1996)
AP-2-containing clathrin coats assemble on mature lysosomes. *J. Cell Biol.* **135**, 1801-1814
- Traub L.M., Kornfeld S. (1997)
The *trans*-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 527-533
- Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D., Arakawa K., Yoshida S., Fujikawa S. (1999)
Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation. *Plant Physiol.* **120**, 481-490
- Ulmer J.B., Palade G.E. (1991)
Effects of Brefeldin A on the Golgi complex, endoplasmic reticulum and viral envelope glycoproteins in murine erythroleukemia cells. *Eur. J. Cell Biol.* **54**, 38-54
- Ungewickell E. (1985)
The 70 kD mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. *EMBO J.* **4**, 3385-3391
- Ungewickell E., Ungewickell H. (1991)
Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **266**, 12710-12714
- Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S.E.H., Lindner R., Prasad K., Barouch W., Martin B., Greene L.E., Eisenberg E. (1995)
Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378**, 632-635
- van Bergen en Henegouwen (1989)
Immunogold labeling of ultrathin cryosections. In: M.A. Hayat. *Colloidal gold: principals, methods, and applications; vol. 1*. Academic Press, London, GB, 191-216
- Villalba J.M., Lützelshwalb M., Serrano R. (1991)
Immunolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves. *Planta* **185**, 458-461
- Vitale A., Denecke J. (1999)
The endoplasmic reticulum - Gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**, 615-628
- Vowels J.J., Payne G.S. (1998)
A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole. *EMBO J.* **17**, 2482-2493

- Wahlberg J.M., Spiess M. (1997)
Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain. *J. Cell Biol.* **137**, 555-562
- Walter P., Johnson A.E. (1994)
Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* **10**, 87-119
- Wandelt C.I., Khan M.R.I., Craig S., Schroeder H.E., Spencer, D., Higgins T.J.V. (1992)
Vicilin with carboxyterminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.* **2**, 181-192
- Waters M.G., Beckers C.J.M., Rothman J. (1992)
Purification of coat protomers. *Methods Enzymol.* **219**, 331-337
- Waters M.G., Serafini T., Rothman J.E. (1991)
'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**, 248-251.
- Weber T., Zemelman B.V., McNew J.A., Westermann B., Gmachl M., Parlati F., Söllner T.H., Rothman J.E. (1998)
SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772
- Weidler M., Reinhard C., Friedrich G., Wieland F.T., Rosch P. (2000)
Structure of the cytoplasmic domain of p23 in solution: implications for the formation of COPI vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 401-418
- Wessel D., Flügge U.I. (1984)
A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analyt. Biochem.* **138**, 141-143
- West M.A., Bright N.A., Robinson M.S. (1997)
The role of ADP-ribosylation factor and phospholipase D in adaptor recruitment. *J. Cell Biol.* **138**, 1239-1254
- Whiteheart S.W., Brunner M., Wilson D.W., Wiedmann M., Rothman J.E. (1992)
Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment proteins (SNAPs) bind to a multi-SNAP receptor complex in Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12239-12243
- Whiteheart S.W., Rossnagel K., Buhrow S.A., Brunner M., Jaenicke R., Rothman J.E. (1994)
N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* **126**, 945-954
- Wieland F., Harter C. (1999)
Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 440-446

- Wieland F.T., Gleason M.L., Serafini T.A., Rothman J.E. (1987)
The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**, 289-300
- Wilson D.W., Lewis M.J., Pelham H.R.B. (1993)
pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**, 7465-7468
- Wood S.A., Park J.E., Brown W.J. (1991)
Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* **67**, 591-600
- Ybe J.A., Greene B., Liu S.H., Pley U., Parham P., Brodsky F.M. (1998)
Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *EMBO J.* **17**, 1297-1303
- Yoshihisa T., Barlowe C., Schekman R. (1993)
Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* **259**, 1466-1468
- Zhang G.F., Staehelin L.A. (1992)
Functional compartmentalization of the Golgi apparatus of plant cells. An immunocytochemical analysis of high pressure frozen and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* **99**, 1070-1083
- Zhao L., Helms J.B., Brugger B., Harter C., Martoglio B., Graf R., Brunner J., Wieland F.T. (1997)
Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4418-4423
- zur Nieden U., Manteuffel R., Weber E., Neumann D. (1984)
Dictyosomes participate in the intracellular pathway of storage proteins in developing *Vicia faba* cotyledons. *Eur. J. Cell Biol.* **34**, 9-17

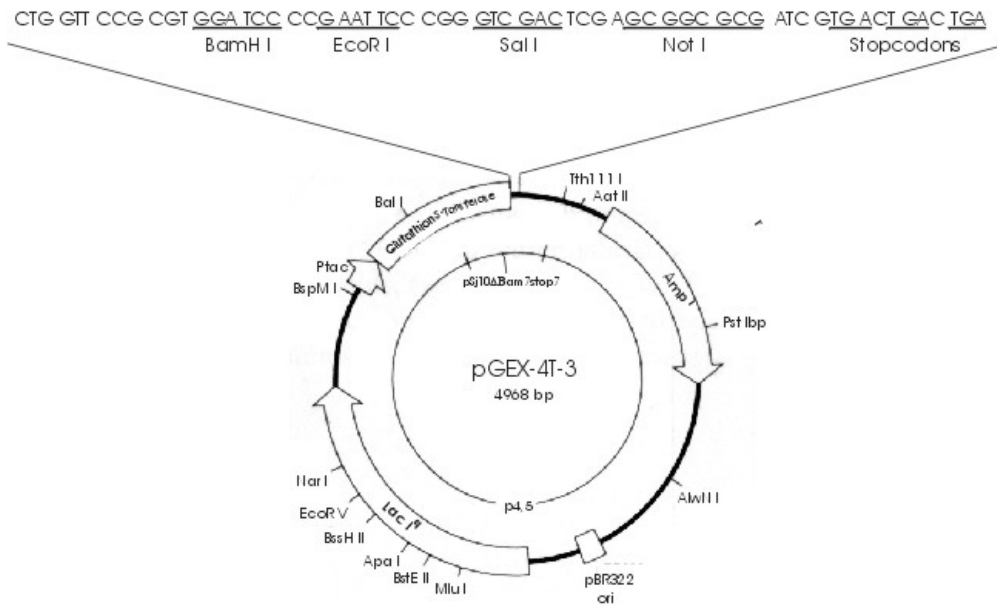
Anhang

At γ -COP	MAQPLVKK-DDDHDDLEYS [*] PFMGIEK [*] GAVLQEA-RVFNDPQVDPRRCSQVITKLLYLLNQGESFTKVEA [*]	68
ScSec21p	MSAHTYK [*] KKFENSTSGDL---P---DKMTIYQDCMNTFNESPVNSKRCRLLISRLLRLLAOGETFPQNEA [*]	63
	M KK + L P K + Q FN V+ +RC +I++LL LL QGE+F EA	
At γ -COP	TEVFFSVTKLFQSKDTGLRRMVYLI [*] IKELSPSSDEVIIVTSSLMKDMNSKIDMYRANAIRVLCRIIDGTL [*]	138
ScSec21p	TALFFSISKLFQHQNDPLRQAVYLA [*] IKELSGISEDVLMATSSIMKDVQNGSDLIKPD [*] DAIRSLTYVLD [*] EST [*]	133
	T +FFS++KLFQ + LR VYL IKELS S V++ TSS+MKD+ D+ + +AIR L ++D +	
At γ -COP	LTQIERYLKQAI [*] VDKNP [*] VSSAALVSGLHLLKTNPEIVKRW [*] SNEVQECI-----QSRSA [*]	192
ScSec21p	AFSAERLLKSAV [*] SRHPSISSAALCTSYHLLPISEVTIRRF [*] TNETQEA [*] VLDLKQFPNQHGNS [*] EYYPNSTY [*]	203
	ER LK A+V + P +SSAAL + HLL ++R++NE QE +	
At γ -COP	LVQFHALALLHQIRONDRLAVSKLVGSLTRG-SVRSPLAQCLLIQ-----RP-----FYEFLESC [*] LR	248
ScSec21p	ISQYHALGLLYQLKKT [*] DKMALLKLV [*] RHFS [*] ENNSMK [*] NQLAKVELVKIVNDLIYRDPQLFSQ [*] FRPLLSDWLS	273
	+ Q+HAL LL Q++ D++A+ KLV + S++ LA L+ P F L L	
At γ -COP	HKAEMVILEAARAITELDGVT [*] SRELTP-----AITVLQ [*] LFLSSPRVLRFAAVRTLNK [*] VAMTHPMAVTNC [*]	313
ScSec21p	NKFE [*] SVQLETAKLIT [*] SFATRNSRLVAP [*] ELYAA [*] ISALQSL [*] LTVP [*] RVS [*] RF [*] AALRI [*] LNRI [*] SMV [*] SPEKI [*] VVC [*]	343
	K E V LE A+ IT SR + P AI+ LQ L+ PR RFAA+R LN++ M P + +	
At γ -COP	NIDMESLISDQ [*] NRSIATLAIT [*] TLLKTCNESSVERLMKQIT [*] NFMSDIADEFKIVV [*] VDAIRSL [*] CVK [*] FPLKYR	383
ScSec21p	NPELES [*] LINNSNRNISTYAIT [*] TLLKTC [*] SKNISS [*] LITIT [*] NFIH [*] DVSDDFKIIII [*] DAVRTLS [*] LNFPQ [*] EWK	413
	N +ESLI + NR I T AIT [*] TLLKTC + L+ ITN [*] F+ D+ D FKI+++DA+R+L + FP ++	
At γ -COP	SLM [*] TFLSNILRE-EGGF [*] EYKRAIVDSIVTIIIRDIPDAKESGLLHLC [*] E [*] FIEDCEFTY [*] LS [*] TQILHFLGIEGP [*]	452
ScSec21p	SILN [*] FLIDVLK [*] NSEGGF [*] KFKNSIVEALIDIVSFV [*] QSKELALE [*] NLCDFIEDCE [*] FNEILVRLILHLLGKEGP [*]	483
	S++ FL ++L+ EGGF +K IV ++ I+ +P KE L LC FIEDCEF + ILH LG EGP	
At γ -COP	NTSD [*] PSKYIRYIYNRVHLENATVRAAAV [*] STLAK [*] EFGFMVE--SLKPRITVLLKRCIY [*] DS [*] DDEVRDRATL [*] YL	520
ScSec21p	SAPN [*] PSLYVRHIYNRVVLENSIIRSAAV [*] VALSKFALTKNDP [*] TLYES [*] ISLLKRIANDK [*] DDEVRDRATIAL	553
	+PS Y+R IYNRV LEN +R AAV L KF +L I LLKR D DDEVRDRAT+ L	
At γ -COP	SE-----PSEE-----AFDINSV [*] PK-----EVKSQPLA [*] EKK [*]	546
ScSec21p	EFIDSARNKDDVIAQNLIESKYFYDIP [*] SESKLSSYISSNTDSFATAFDV [*] NQVRK [*] FTEDEMKA [*] INLKRK [*] Q	623
	PS E AFD+N V K E+K L K	
At γ -COP	AQ---GK [*] KPTGLGAPAA---P---ASGFDG-----YERLLS-----SIPEFAAF [*] GKLFKSSLP [*]	591
ScSec21p	EQIFN [*] QSE [*] TLLDTTPEAESVPEK [*] RADANSFAGPNLDDHQEDLLATKYADELLSIEQIK [*] PFGLV [*] NSSRA	693
	Q K T L P A P A F G E LL SI + FG L SS	

Anhang 1: Sequenzvergleich von dem putativen γ -COP aus *Arabidopsis thaliana* (At) mit dem Sec21p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Das von der γ -COP-cDNA abgeleitete Polypeptid (siehe Kap. 3.1.1) ist zu den letzten 417 Aminosäuren im Aminoterminal von At γ -COP (unterstrichen) homolog.

	*	720	*	740	*	760	*																																																															
Atγ-COP	V	E	L	T	E	A	E	T	E	Y	A	V	N	V	K	H	L	F	D	S	H	V	F	Q	N	C	T	N	T	I	P	E	Q	L	E	R	V	L	N	E	A	E	E	F	S	-	E	V	T	S	K	A	L	N	S	L	P	Y	D	S	--	P	G	O						
ScSec21p	I	S	L	T	E	E	A	E	F	V	R	G	V	K	H	L	F	K	D	N	V	L	Q	E	N	I	T	N	T	L	D	I	A	L	D	N	V	S	V	C	T	P	E	I	S	D	E	A	E	L	E	L	F	T	L	Q	V	D	R	L	L	P	S	E						
	+	L	T	E	E	E	+	V	V	K	H	+	F	V	V	Q	+	N	T	N	T	+	L	V	+	E	S	E	L	+	L	D	P	+																																				
		780	*	800	*	820	*	840																																																														
Atγ-COP	A	--	F	V	V	E	K	P	A	G	V	P	A	V	G	K	F	S	N	T	L	T	F	V	V	K	E	V	H	V	D	P	S	T	G	E	A	E	D	D	G	V	E	Y	Q	L	E	D	L	E	V	V	A	G	D	Y	M	V	K	V	G	V	S	N	F					
ScSec21p	E	A	A	C	Y	V	A	F	K	K	L	D	E	I	V	M	E	C	-	F	L	N	N	L	T	F	T	T	K	E	I	N	P	D	T	N	E	P	F	D	G	D	E	G	F	Q	D	E	Y	E	I	D	S	I	F	L	N	A	G	D	Y	V	K	S	S	F	T	G	N	F
		+	V	F	K	+	G	F	N	L	T	F	K	E	+	D	D	G	+	D	E	Y	+	+	+	A	G	D	Y	+	N	F																																						
		860	*	880	*	900	*																																																															
Atγ-COP	R	N	A	E	S	M	D	E	E	D	E	R	V	D	E	Y	G	L	G	O	R	E	S	L	G	E	A	V	K	A	V	M	D	L	L	G	M	Q	T	C	E	G	T	E	T	I	P	L	N	A	R	S	H	T	C	L	S	G	-	V	Y	I	G	N	V	K	V	L		
ScSec21p	S	A	T	F	D	E	L	P	C	E	--	E	V	A	V	E	N	I	Q	E	D	L	S	I	Q	E	V	V	D	K	I	I	L	N	S	S	C	L	P	V	E	S	T	Q	F	A	P	S	D	S	N	S	H	T	L	K	L	F	G	K	S	A	L	T	G	S	K	V	A	
	+	+	E	V	+	+	+	S	+	E	V	++	E	T	+	P	+	S	H	T	L	G	+	K	V																																													
		920	*	940																																																																		
Atγ-COP	V	R	A	Q	F	G	M	D	S	S	K	D	I	A	M	K	L	T	V	R	A	E	D	-	V	S	V	A	E	A	I	H	E	I	V	A	S	G																																
ScSec21p	L	Q	I	K	M	-	I	K	S	S	K	G	L	A	L	K	V	H	G	K	G	E	D	S	-	L	C	S	D	L	V	N	G	L	M	Q	--																																	
	+	+	S	S	K	+	A	+	K	+	+	E	D	+	+	++																																																						

Anhang 1: Fortsetzung.



Anhang 2: Die schematische Darstellung des Expressionsvektors pGEX-4T-3 mit den in seiner Struktur vorhandenen Schnittstellen. Dieser Vektor besteht aus 4968 bp.

AtSec23p	MAETANTDLEGI [*] DGVRMT ²⁰ TWNVWPHSKA [*] EAASKCVIPLAACISPIRRHADIP ⁴⁰ TL [*] PYAPLR ⁶⁰ CR--TCSAALNA [*]	68
ScSec23p	MDFETN---EDINGVRFTWNVVFPSTRSDANSNVVVPVGC ⁴⁰ LYTPLKEYDELNVAPYNPV ⁶⁰ VC [*] SGPHCKSILNLP	67
	M N E I+GVR TWNV+P ++ A V+P+ +P++ + PY P+ C C LN	
AtSec23p	YAQVDF ⁸⁰ TAKLWICPF [*] YQ ¹⁰⁰ RNHFP ¹⁰⁰ PHVH ¹⁰⁰ VISETNLP [*] GE ¹²⁰ LYPO ¹²⁰ YTTVEY ¹²⁰ TL [*] PP ¹⁴⁰ PVANG ¹⁴⁰ EGLVD [*] PPV ¹⁴⁰ FV ¹⁴⁰ FVLD	138
ScSec23p	YCVLD ⁸⁰ PRNSSW ⁸⁰ SC ⁸⁰ PI ⁸⁰ CNS ⁸⁰ RNHL ⁸⁰ PP ⁸⁰ OY ⁸⁰ TNLS ⁸⁰ QENMP ⁸⁰ EL--Q ¹⁰⁰ STTIEY ¹⁰⁰ IT ¹⁰⁰ NK ¹⁰⁰ PE ¹⁰⁰ TV-----P ¹²⁰ PI ¹²⁰ FF ¹²⁰ VVD	129
	Y +D W CP C RNH PP Y +S+ N+P EL Q TT+EY PV PP+F FV+D	
AtSec23p	TCMIE ¹⁶⁰ EELDFAKSALKQA [*] I ¹⁶⁰ GLLPENALVGFV ¹⁸⁰ SFGTQAHV ¹⁸⁰ HELGFSEMSK ¹⁸⁰ V ¹⁸⁰ FVFKGDKE ²⁰⁰ ISKDQ ²⁰⁰ IL ²⁰⁰ DQLGL	208
ScSec23p	LTSETEN ¹⁶⁰ LD ¹⁶⁰ SLKES ¹⁶⁰ IT ¹⁶⁰ SL ¹⁶⁰ LL ¹⁶⁰ PP ¹⁶⁰ NALIG ¹⁶⁰ LITYG ¹⁶⁰ NVVQL ¹⁶⁰ HDL ¹⁶⁰ SSET ¹⁶⁰ ID ¹⁶⁰ RC ¹⁶⁰ NVFRGDRE ¹⁶⁰ YQLEAL ¹⁶⁰ TEML ¹⁶⁰ TG	199
	E LD K + + LLP NAL+G +++G +H L + + VF+GD+E + L	
AtSec23p	GGSSRR ²²⁰ CGSKG----PQ ²²⁰ NGFPSSG ²⁴⁰ LNR ²⁴⁰ FL ²⁴⁰ LPASE ²⁴⁰ CE ²⁴⁰ FTL ²⁴⁰ NS ²⁴⁰ LL ²⁴⁰ DEL ²⁴⁰ QSD ²⁴⁰ QW ²⁴⁰ PK ²⁴⁰ GH ²⁴⁰ RS ²⁴⁰ QR ²⁴⁰ CTG ²⁴⁰ VALS ²⁴⁰ V ²⁴⁰ A	274
ScSec23p	QK ²²⁰ TPGCGAASHLPNAM ²²⁰ NK ²²⁰ VP ²²⁰ FP ²²⁰ SLNR ²²⁰ FL ²²⁰ PLE ²²⁰ QVE ²²⁰ EKL ²²⁰ N ²²⁰ LL ²²⁰ EN ²²⁰ LS ²²⁰ PD ²²⁰ QW ²²⁰ SV ²²⁰ PAG ²²⁰ HR ²²⁰ PL ²²⁰ RAT ²²⁰ GSAL ²²⁰ NIA	269
	+ GG N LNR ²⁴⁰ FL ²⁴⁰ LP + EF LN LL L DQW V GHR R TG AL +A	
AtSec23p	AGLLGAC ³⁰⁰ LPGTGAR ³⁰⁰ I ³⁰⁰ VALIG ³⁰⁰ GPC ³⁰⁰ TEG ³⁰⁰ P ³⁰⁰ TI ³⁰⁰ VSK ³⁰⁰ DL ³⁰⁰ SD ³⁰⁰ PVR ³⁰⁰ SHK ³⁰⁰ DL ³⁰⁰ DK ³⁰⁰ AA ³⁰⁰ PY ³⁰⁰ YK ³⁰⁰ KAV ³⁰⁰ KFY ³⁰⁰ DS ³⁰⁰ IAK ³⁰⁰ QL ³⁰⁰ V ³⁰⁰ TQ	344
ScSec23p	SL ³⁰⁰ LL ³⁰⁰ QC ³⁰⁰ CY ³⁰⁰ K ³⁰⁰ NIP ³⁰⁰ ARI ³⁰⁰ LL ³⁰⁰ FAS ³⁰⁰ GP ³⁰⁰ GT ³⁰⁰ VAP ³⁰⁰ GL ³⁰⁰ IV ³⁰⁰ NS ³⁰⁰ EL ³⁰⁰ RD ³⁰⁰ PL ³⁰⁰ RS ³⁰⁰ HH ³⁰⁰ DI ³⁰⁰ SD ³⁰⁰ HA ³⁰⁰ QY ³⁰⁰ YK ³⁰⁰ KA ³⁰⁰ CK ³⁰⁰ FYN ³⁰⁰ Q ³⁰⁰ IA ³⁰⁰ QR ³⁰⁰ VA ³⁰⁰ AN	339
	LL C ARI+ GP T PG IV L DP+RSH D+D D A YKKA KFY+ IA +	
AtSec23p	GHVLD ³⁶⁰ LFASALDQ ³⁶⁰ VGAEM ³⁶⁰ KVA ³⁶⁰ VERT ³⁶⁰ TG ³⁶⁰ GLV ³⁶⁰ VL ³⁶⁰ SE ³⁶⁰ SF ³⁶⁰ GHS ³⁶⁰ V ³⁶⁰ FK ³⁶⁰ DS ³⁶⁰ FK ³⁶⁰ RV ³⁶⁰ F-ED ³⁶⁰ GD ³⁶⁰ QAL ³⁶⁰ GL ³⁶⁰ CF ³⁶⁰ NG ³⁶⁰ TLE ³⁶⁰ IC ³⁶⁰ CS	413
ScSec23p	GH ³⁶⁰ VD ³⁶⁰ LF ³⁶⁰ AG ³⁶⁰ CY ³⁶⁰ DQ ³⁶⁰ IG ³⁶⁰ MS ³⁶⁰ EM ³⁶⁰ KQL ³⁶⁰ TDS ³⁶⁰ TG ³⁶⁰ GV ³⁶⁰ LLL ³⁶⁰ TD ³⁶⁰ AF ³⁶⁰ ST ³⁶⁰ AL ³⁶⁰ FK ³⁶⁰ Q ³⁶⁰ SY ³⁶⁰ L ³⁶⁰ RL ³⁶⁰ EAK ³⁶⁰ DE ³⁶⁰ E ³⁶⁰ GY ³⁶⁰ L ³⁶⁰ KMA ³⁶⁰ F ³⁶⁰ NG ³⁶⁰ NMA ³⁶⁰ V ³⁶⁰ K ³⁶⁰ TS	409
	GH +D+FA DQ+G+ EMK TGG+++L+ F +FK S+ R+F D L + FNG + + S	
AtSec23p	QDIKIQGA ⁴⁴⁰ IG ⁴⁴⁰ PC ⁴⁴⁰ SS ⁴⁴⁰ LE ⁴⁴⁰ KK ⁴⁴⁰ KGAS--VAD ⁴⁴⁰ TV ⁴⁴⁰ IG ⁴⁴⁰ EG ⁴⁴⁰ NT ⁴⁴⁰ SA ⁴⁴⁰ WR ⁴⁴⁰ LCGL ⁴⁴⁰ DK ⁴⁴⁰ TT ⁴⁴⁰ CL ⁴⁴⁰ TIF ⁴⁴⁰ FD ⁴⁴⁰ ISS ⁴⁴⁰ SG ⁴⁴⁰ SNT-----P ⁴⁴⁰ GAA	476
ScSec23p	KDLK ⁴⁴⁰ VQGL ⁴⁴⁰ LIGH ⁴⁴⁰ ASAV ⁴⁴⁰ KK ⁴⁴⁰ TD ⁴⁴⁰ ANNI ⁴⁴⁰ SE ⁴⁴⁰ SE ⁴⁴⁰ IG ⁴⁴⁰ IG ⁴⁴⁰ AT ⁴⁴⁰ ST ⁴⁴⁰ WK ⁴⁴⁰ MAS ⁴⁴⁰ LS ⁴⁴⁰ SP ⁴⁴⁰ YHS ⁴⁴⁰ YAI ⁴⁴⁰ FF ⁴⁴⁰ E ⁴⁴⁰ I ⁴⁴⁰ ANT ⁴⁴⁰ AANS ⁴⁴⁰ NP ⁴⁴⁰ MMS ⁴⁴⁰ AP ⁴⁴⁰ GS ⁴⁴⁰ A	479
	D+K+QG IG S + K A + + IG G TS W++ L IFF I + N+ PG A	
AtSec23p	N-PQF- ⁵⁰⁰ YLQ ⁵⁰⁰ FL ⁵⁰⁰ TSY ⁵⁰⁰ Q ⁵⁰⁰ N ⁵⁰⁰ PEG ⁵⁰⁰ Q ⁵⁰⁰ TL ⁵⁰⁰ LR ⁵⁰⁰ VT ⁵⁰⁰ TV ⁵⁰⁰ C ⁵⁰⁰ ROW ⁵⁰⁰ IDS ⁵⁰⁰ AV ⁵⁰⁰ SS ⁵⁰⁰ EEL ⁵⁰⁰ V ⁵⁰⁰ Q ⁵⁰⁰ GF ⁵⁰⁰ DO ⁵⁰⁰ ET ⁵⁰⁰ AA ⁵⁰⁰ V ⁵⁰⁰ MAR ⁵⁰⁰ LA ⁵⁰⁰ SL ⁵⁰⁰ K ⁵⁰⁰ ME ⁵⁰⁰ SEE ⁵⁰⁰ GF ⁵⁰⁰ D	544
ScSec23p	DR ⁵⁰⁰ PH ⁵⁰⁰ LAY ⁵⁰⁰ TQ ⁵⁰⁰ FIT ⁵⁰⁰ TY ⁵⁰⁰ QH ⁵⁰⁰ SS ⁵⁰⁰ GT ⁵⁰⁰ NR ⁵⁰⁰ IR ⁵⁰⁰ VT ⁵⁰⁰ TV ⁵⁰⁰ AN ⁵⁰⁰ QL ⁵⁰⁰ LP ⁵⁰⁰ FG ⁵⁰⁰ TPA--IA ⁵⁰⁰ AS ⁵⁰⁰ FD ⁵⁰⁰ QEA ⁵⁰⁰ AA ⁵⁰⁰ V ⁵⁰⁰ MAR ⁵⁰⁰ IA ⁵⁰⁰ VH ⁵⁰⁰ KA ⁵⁰⁰ ET ⁵⁰⁰ DD ⁵⁰⁰ GAD	547
	+ P Y QF+T+YQ G +RVTTV Q + + FDQE AAV+MAR+A K E+ G D	
AtSec23p	ATRWLDR ⁵⁸⁰ NL ⁵⁸⁰ IR ⁵⁸⁰ LC ⁵⁸⁰ SK ⁵⁸⁰ FG ⁵⁸⁰ DY ⁵⁸⁰ RK ⁵⁸⁰ DD ⁵⁸⁰ PA ⁵⁸⁰ S ⁵⁸⁰ FT ⁵⁸⁰ LN ⁵⁸⁰ PY ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ SL ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ PQ ⁵⁸⁰ FI ⁵⁸⁰ FN ⁵⁸⁰ LRR ⁵⁸⁰ SQ ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ V ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ NN ⁵⁸⁰ SP ⁵⁸⁰ DE ⁵⁸⁰ TAY ⁵⁸⁰ FC ⁵⁸⁰ M ⁵⁸⁰ LL ⁵⁸⁰ N ⁵⁸⁰ REN	614
ScSec23p	VIRWLD ⁵⁸⁰ RL ⁵⁸⁰ IL ⁵⁸⁰ IK ⁵⁸⁰ LC ⁵⁸⁰ OK ⁵⁸⁰ YAD ⁵⁸⁰ YN ⁵⁸⁰ K ⁵⁸⁰ DD ⁵⁸⁰ POS ⁵⁸⁰ ER ⁵⁸⁰ LAP ⁵⁸⁰ N ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ SL ⁵⁸⁰ Y ⁵⁸⁰ PQ ⁵⁸⁰ FI ⁵⁸⁰ TY ⁵⁸⁰ Y ⁵⁸⁰ LRR ⁵⁸⁰ SQ ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ LV ⁵⁸⁰ F ⁵⁸⁰ NN ⁵⁸⁰ SP ⁵⁸⁰ DE ⁵⁸⁰ TAF ⁵⁸⁰ Y ⁵⁸⁰ R ⁵⁸⁰ HI ⁵⁸⁰ FT ⁵⁸⁰ RED	617
	RWLDR LI+LC K+ DY KDDP SF L P FSL+PQF + LRRSQF+ VFNNSPDETA++ + RE+	
AtSec23p	ISNAT ⁶⁴⁰ VMI ⁶⁴⁰ QPS ⁶⁴⁰ LT ⁶⁴⁰ TY ⁶⁴⁰ SFN ⁶⁴⁰ SPA ⁶⁴⁰ E ⁶⁴⁰ PA ⁶⁴⁰ LL ⁶⁴⁰ DVA ⁶⁴⁰ STA ⁶⁴⁰ ADR ⁶⁴⁰ IL ⁶⁴⁰ LL ⁶⁴⁰ L ⁶⁴⁰ DAY ⁶⁴⁰ F ⁶⁴⁰ SV ⁶⁴⁰ V ⁶⁴⁰ F ⁶⁴⁰ H ⁶⁴⁰ GMT ⁶⁴⁰ IA ⁶⁴⁰ QWR ⁶⁴⁰ NM ⁶⁴⁰ GY ⁶⁴⁰ HH ⁶⁴⁰ OPE ⁶⁴⁰ HQA ⁶⁴⁰ F	684
ScSec23p	T ⁶⁴⁰ NS ⁶⁴⁰ LI ⁶⁴⁰ MI ⁶⁴⁰ Q ⁶⁴⁰ PT ⁶⁴⁰ LS ⁶⁴⁰ FS ⁶⁴⁰ MED ⁶⁴⁰ DP ⁶⁴⁰ Q ⁶⁴⁰ V ⁶⁴⁰ LL ⁶⁴⁰ DS ⁶⁴⁰ IS ⁶⁴⁰ V ⁶⁴⁰ K ⁶⁴⁰ PN ⁶⁴⁰ T ⁶⁴⁰ IL ⁶⁴⁰ LL ⁶⁴⁰ DT ⁶⁴⁰ FFF ⁶⁴⁰ IL ⁶⁴⁰ I ⁶⁴⁰ Y ⁶⁴⁰ H ⁶⁴⁰ GE ⁶⁴⁰ QIA ⁶⁴⁰ QWR ⁶⁴⁰ K ⁶⁴⁰ AG ⁶⁴⁰ Y ⁶⁴⁰ QDD ⁶⁴⁰ PQ ⁶⁴⁰ YAD ⁶⁴⁰ F	687
	+N +MIQP+LT++S +P LLD S+ + ILLLD +F ++++HG IAQWR GY P+ F	
AtSec23p	AE ⁷²⁰ LL ⁷²⁰ QAP ⁷²⁰ QED ⁷²⁰ SQ ⁷²⁰ MT ⁷²⁰ VRE ⁷²⁰ RF ⁷²⁰ FP ⁷²⁰ PR ⁷²⁰ LV ⁷²⁰ CD ⁷²⁰ QH ⁷²⁰ GS ⁷²⁰ QAR ⁷²⁰ F ⁷²⁰ LL ⁷²⁰ AK ⁷²⁰ LN ⁷²⁰ PS ⁷²⁰ AT ⁷²⁰ Y ⁷²⁰ NN ⁷²⁰ AN ⁷²⁰ EM ⁷²⁰ ST ⁷²⁰ GS ⁷²⁰ D ⁷²⁰ VI ⁷²⁰ FT ⁷²⁰ DD ⁷²⁰ V ⁷²⁰ SL ⁷²⁰ Q ⁷²⁰ VF	754
ScSec23p	K ⁷²⁰ ALL ⁷²⁰ EP ⁷²⁰ KLE ⁷²⁰ AAE ⁷²⁰ LL ⁷²⁰ VDR ⁷²⁰ FR ⁷²⁰ PL ⁷²⁰ PR ⁷²⁰ FD ⁷²⁰ TE ⁷²⁰ AG ⁷²⁰ GS ⁷²⁰ QAR ⁷²⁰ F ⁷²⁰ LL ⁷²⁰ SK ⁷²⁰ LN ⁷²⁰ PS ⁷²⁰ DN ⁷²⁰ Y ⁷²⁰ QDM--ARG ⁷²⁰ GS ⁷²⁰ T ⁷²⁰ IV ⁷²⁰ LT ⁷²⁰ DD ⁷²⁰ V ⁷²⁰ SL ⁷²⁰ Q ⁷²⁰ VF	755
	LL+ P ++ RFP+PR + GSQARFLL KLNPS Y + GS ++ TDDVSLQ F	
AtSec23p	FEHL ⁷⁸⁰ QK ⁷⁸⁰ LV ⁷⁸⁰ VQS-- 765	
ScSec23p	M ⁷⁸⁰ HL ⁷⁸⁰ Q ⁷⁸⁰ V ⁷⁸⁰ AV ⁷⁸⁰ SGQA 768	
	HLQ + V	

Anhang 3: Sequenzvergleich von Sec23p aus *Arabidopsis thaliana* (At) und *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Das von der Sec23-cDNA abgeleitete Polypeptid (siehe Kap. 3.1.2) ist 94 % homolog zu den letzten 234 Aminosäuren am Aminoterminus (unterstrichen) von AtSec23p.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. D.G. Robinson angefertigt. Ihm möchte ich vor allem für seine umfassende Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. H.-W. Heldt danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Hillmer und Dr. Giselbert Hinz, die mir jeder Zeit mit praktischen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite standen.

Aus der Abteilung für strukturelle Zellphysiologie danke ich besonders Dorothee Dasbach, Nicole Happel, Andrea Olbrich, Christel Rühling und Gabriele Schauermann, für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Jürgen Denecke für die Überlassung der transformierten Tabakpflanzen.

Danken möchte ich nicht zuletzt Dr. Inge Hohl, die durch ihre vielfältige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dem Ministerium für Kultur und Ausbildung des Irans danke ich für die Vergabe des Promotionsstipendiums.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Ali Movafeghi geboren am 25.07.1966 in Täbriz, Iran
Staatsangehörigkeit:	iranisch
Ausbildung:	
1972-1980	Grund- und Realschule in Täbriz
1980-1984	Gymnasium in Täbriz
1984-1989	Biologiestudium und Abschluss des B.Sc.-Grades im Fachbereich Biologie an der Universität Täbriz
1989-1993	Biologiestudium und Abschluss des M.Sc.-Grades im Fachbereich Biologie an der Universität Teheran
1993	Anfertigung der M.Sc.-Arbeit mit dem Thema: "Quantitative und Qualitative Untersuchungen der Schleimpolysaccharide von <i>Plantago</i> "
1993-1995	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Biologie an der Universität Täbriz
Aug. 1995 - Feb. 1996	Deutschkurs am Goethe Institut, Göttingen
seit Feb. 1996	Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Albrecht-von- Haller Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg- August Universität Göttingen
seit 1996	Mehrfach befristete Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Albrecht-von-Haller Institut für Pflanzenwissenschaften