
***In vivo* Lokalisierung von strukturellen und regulatorischen
Komponenten von COPI-coated Vesikeln in
Medicago truncatula cv. Jemalong Wurzelzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Holger Densow

aus Leese an der Weser

April 2005

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach ISO 9706

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Kompartimente tauschen Stoffe über verschiedene Mechanismen aus	2
2.2. Die sekretorische Aktivität von Pflanzenzellen	2
2.3. Aufbau des Endoplasmatischen Reticulums in Pflanzenzellen.....	3
2.4. Import von Proteinen in das Endoplasmatische Reticulum.....	4
2.5. Funktionen des Endoplasmatischen Reticulums.....	5
2.6. Aufbau des Golgi-Apparats in Pflanzenzellen	6
2.7. Funktionen des Golgi-Apparats	9
2.8. Transportprozesse am Golgi-Apparat verlaufen über Vesikel.....	10
2.9. Kleine G-Proteine der Untergruppe Arf	11
2.10. Struktur der kleinen G-Proteine Arf1 und Sar1.....	13
2.11. COPII-coated Vesikel transportieren Material aus dem ER zum Golgi.....	15
2.12. COPI-coated Vesikel organisieren den retrograden Transport vom Golgi zum ER.....	17
2.13. Störungen im Vesikeltransport haben dramatische Auswirkungen auf die Morphologie des Golgi-Apparates.	19
2.14. <i>Medicago truncatula</i> – eine Pflanze mit Modellcharakter für die genetische Forschung	20
2.15. Ziele der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1. Verwendete Bakterien-, Pflanzen- und Pilzspezies	23
3.1.1. Bakterienstämme	23
3.1.2. Pflanzenspezies.....	23
3.1.3. Pilze	23
3.2. Medien	23
3.2.1. Bakterienmedien.....	23
3.2.1. Pflanzenmedien	24
3.2.2. Medienzusätze.....	25
3.3. Verwendete Primer und Plasmide	25
3.3.1. Primer	25
3.3.2. Plasmide	26
3.4. Anzucht von Bakterien und Pflanzen	29
3.4.1. Anzucht von <i>Medicago truncatula</i> cv. Jemalong	29
3.4.2. Färbung von Wurzeln zum Nachweis auf Mykorrhizierung (Gange <i>et al.</i> , 1999).....	30
3.4.3. Anzucht und Konservierung von Bakterien	31
3.5. Proteinbiochemische Methoden	31
3.5.1. Proteinextraktion aus Pflanzengewebe	31
3.5.2. Gesamtproteinbestimmung.....	32
3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli (1970)).....	32
3.5.4. Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie.....	33
3.5.5. Western-Blot	34
3.5.6. Immunologische Detektion geblotteter Proteine.....	34
3.5.7. Antikörper.....	35
3.5.8. Massenspektroskopie nach Trypsin-Verdau	35
3.6. Methoden zur heterologen Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	36

3.6.1. Heterologe Expression von FLAG-Fusionsproteinen	36
3.6.3. Affinitätschromatographische Reinigung von heterolog exprimierten FLAG-Fusionsproteinen	37
3.7. Genetische Methoden	38
3.7.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.7.2. Isolierung von Plasmid-DNA durch schnelle HB-Lyse	39
3.7.3. Isolierung von Plasmid-DNA durch Säulenchromatographie	39
3.7.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengeweben (Glick & Thompson, 1993)	39
3.7.5. Isolierung von PolyA ⁺ -mRNA.....	40
3.7.6. Erstellung von Adaptor-ligierten cDNA-Banken.....	40
3.7.7. PCR	41
3.7.8. Restriktionsspaltung von DNA.....	42
3.7.8. Behandlung mit alkalischer Phosphatase.....	42
3.7.9. Ligation	42
3.7.10. PCR-Mutagenese	43
3.7.11. DNA-Sequenzierung.....	43
3.8. Elektrophorese und Isolierung von Nukleinsäuren	43
3.8.1. Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese	43
3.8.2. Auftrennung von RNA mittels Agarosegelelektrophorese	43
3.8.3. Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen.....	44
3.9. DNA-Transfer-Methoden.....	44
3.9.1. Transformation von <i>E. coli</i>	44
3.9.2. Transformation von <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	45
3.9.3. Transformation von <i>Medicago truncatula</i> cv. Jemalong.....	46
3.10. Physiologische Methoden	47
3.10.1. Präparation von Hefeelicitor (Schuhmacher <i>et al.</i> , 1987).....	47
3.10.2. Inhibitorstudien	47
3.10.3. Organellspezifische Färbungen.....	48
3.11. Mikroskopische Verfahren	48
3.11.1. Selektion von transgenen Wurzeln.....	48
3.11.2. Zwei-Photonen Mikroskopie	49
3.11.3. Confokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	52
3.12. Verwendete Software	52
3.12.1. Dekonvolution von Zwei-Photonen Aufnahmen	52
3.12.2. Komprimierung von avi-Videofiles	52
3.12.3. EST-Datenbankrecherchen	53
3.12.4. 3D-Rendering	53
4. Ergebnisse	54
4.1. EST-Datenbankanalysen zur Suche von Bestandteilen von COPI-coated Vesikeln aus <i>Medicago truncatula</i>	54
4.1.1. Suche nach bekannten Sequenzen für COPI-Coatomer Proteine aus Pflanzen	55
4.1.2. Überprüfung der gefundenen Sequenzen auf korrekte Annotation.....	55
4.1.2. EST-Datenbankanalyse.....	57
4.2. Herstellung von cDNA-Banken aus verschiedenen Geweben von <i>Medicago truncatula</i>	58
4.2.1. Überprüfung der Mykorrhizierung von <i>M. truncatula</i>	59
4.2.2. Synthese Adaptor-ligierter cDNA aus verschiedenen Geweben von <i>M. truncatula</i>	61
4.3. Isolierung einer Sequenz für das Regulatorprotein der COPI-Vesikel Biogenese, der kleinen GTPase Arf1, aus cDNA-Banken von <i>M. truncatula</i>	62
4.3.1. Isolierung eines <i>MtArf1</i> -spezifischen Sequenzabschnitts	64
4.3.2. Amplifizierung des 5` und 3`-Endes von <i>MtArf1</i> durch RACE-PCR.....	65
4.3.3. Amplifizierung und Analyse der Gesamtsequenz von <i>MtArf1</i>	66
4.3.4. Erstellung von „loss of function“ und „gain of function“ Mutanten von <i>MtArf1</i> durch PCR-Mutagenese.....	69

4.4. Die EST-Datenbanksuche bildete die Grundlage zur Isolierung von Sequenzen für MtζCOP1, MtζCOP2 und MtϵCOP aus <i>M. truncatula</i> cDNA-Banken	70
4.5. Analyse der heterolog exprimierten Proteine MtArf1, MtArf1 T31N, MtArf1 Q71L, Mtζ-COP1 und Mtζ-COP2	73
4.5.1. Expression und immunologischer Nachweis der nativen und GFP-fusionierten Proteine ..	73
4.5.2. MALDI-TOF Analyse der heterolog exprimierten Proteine.....	76
4.6. In vivo Lokalisierung der GFP-fusionierten Proteine MtARF1, MtARF1 T31N, MtARF1 Q71L, Mtζ-COP1 und Mtζ-COP2 in „hairy root“ transformierten <i>M. truncatula</i> Wurzeln	77
4.6.1. Erstellung von GFP fusionierten Konstrukten im Transformationsvektor pBIN19.....	77
4.6.2. Selektion von transgenen, „hairy root“ transformierten <i>M. truncatula</i> Wurzeln	78
4.6.3. Mikroskopie von transformierten Wurzeln	79
4.6.4. MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ COP2::GFP sind an Strukturen lokalisiert, deren Anzahl pro Zelle vom Differenzierungsgrad der Wurzelzellen abhängt.	80
4.6.5. Die fluoreszenten Strukturen strömen in einer ganz spezifischen Weise durch das Cytoplasma der Wurzelzellen.....	82
4.6.6. Die Strömungsaktivität unterscheidet sich nicht zwischen MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP	84
4.6.7. Die Strömungsaktivität einzelner fluoreszenter Strukturen folgt keinem regelmäßigen Muster.....	85
4.6.8. Bei den durch MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierten, fluoreszenten Strukturen handelt es sich um membranumhüllte Kompartimente.....	87
4.6.9. Die Bewegung der fluoreszenten Strukturen ist abhängig von Aktin-Filamenten, nicht jedoch von Mikrotubuli.....	88
4.6.10. Bei den fluoreszenten Strukturen handelt es sich nicht um Mitochondrien.....	91
4.6.11. Die durch MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierten Strukturen bewegen sich entlang von ER-Tubuli.....	92
4.6.12. Brefeldin A verändert die Morphologie der fluoreszenten Strukturen und inhibiert größtenteils ihre Bewegungen.....	93
4.6.13. Die Lokalisation der „loss of function“ und „gain of function“ Mutante von MtArf1 unterscheidet sich von der des Wildtyp-Proteins.	94
5. Diskussion	96
5.1. EST-Datenbankanalyse	96
5.1.1. Die Strategie zur Suche in EST-Datenbanken mußte den erzielten Ergebnissen angepaßt werden.....	96
5.1.2. COPI-coated Vesikel kommen vermutlich in allen Pflanzen vor	97
5.1.3. Der Vesikeltransport muß sich in allen Eukaryonten früh entwickelt haben.	97
5.2. MtArf1, Mtζ-COP1 und Mtζ-COP2 sind am Golgi-Apparat lokalisiert	100
5.2.1. Die Verteilung der fluoreszenten Strukturen in transgenen <i>M. truncatula</i> Wurzeln ist typisch für die von Golgi-Stapeln	100
5.2.2. Das Muster der Lokalisierung von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 spricht ebenfalls für eine Assoziation der Proteine mit Golgi-Stapeln.....	102
5.2.3. Die Abhängigkeit der Bewegung fluoreszenter Strukturen von Aktin-Filamenten könnte ein Hinweis für ihre Lokalisierung an Golgi-Strukturen sein	103
5.2.4. Die Färbung von transgenen Wurzeln mit FM4-64 und DiOC ₅ deutet ebenfalls auf eine Golgi-Lokalisierung der Konstrukte hin	104
5.2.5. Der Inhibitor Brefeldin A verändert die Morphologie des Golgi-Apparates	105
5.2.6. Die <i>in vivo</i> Lokalisierung von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 entspricht den Erwartungen	105
5.3. Lokalisierung der „loss of function“ und „gain of function“ Mutante von MtArf1	106
5.3.1. Die dominant aktive Mutante MtArf1 Q71L führt zu einer Akkumulation von kleinen fluoreszenten Strukturen, die als COPI-coated Vesikel interpretiert werden können	106
5.4. Die Beobachtungen zur Lokalisation von MtArf1, Mtζ-COP1 und Mtζ-COP2 unterscheiden sich in einigen Punkten von bekannten Literaturdaten.	107

5.4.1. Die beiden Isoformen Mt ζ -Cop1 und Mt ζ -COP2 unterscheiden sich nicht in ihrer Lokalisation.....	107
5.4.2. Die Golgi-Stapel müssen sich in verschiedenen pflanzlichen Geweben oder zwischen verschiedenen Pflanzen voneinander unterscheiden.	108
5.4.3. Unterschiedliche Beobachtungen der Wirkung von Brefeldin A auf pflanzliche Gewebe sind vermutlich abhängig von der Lokalisierung der Proteine, die zur Markierung der Golgi-Stapel verwendet wurden.	109
5.4.4. Die Retention von MtArf1 und Coatomeruntereinheiten an BFA-Kompartimenten setzt einen spezifischen, bislang unbekanntem Mechanismus voraus	111
5.5. Modell der Funktion von COPI-coated Vesikeln in Pflanzen.....	112
5.6. Ausblick	115
6. Literatur.....	119
7. Anhang.....	140
7.1. Anhang 1	140
7.1.1. Phylogenievergleich zwischen pflanzlichen und tierischen Coatomerproteinen	140
7.2. Anhang 2	142
7.2.1. Multiple Alignments der EST-Sequenzen aus <i>M. truncatula</i> mit Homologien für Coatomer-Untereinheiten auf Basis der Aminosäureabfolge.....	142
7.3. Anhang 3	159
7.3.1. Die EST-Sequenz für Arf1 aus Erbse zeigte Homologien zu pflanzlichen Arf-Proteinen .	159
7.3.2. EST-Sequenzen aus <i>M. truncatula</i> mit Homologien zu MtArf1	159
7.3.4. Ergebnis der Multisequenzierung eines Abschnittes zwischen den G-Boxen 3 und 4 in MtArf1	161
7.3.5. Ein multiples Alignment zeigt die hohe Verwandtschaft von MtArf1 zu Arf-Proteinen aus dem tierischen und pflanzlichen System.	162
7.4. Anhang 4	163
7.4.1. Homologievergleiche der Proteine Mt ϵ -COP, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2.....	163
7.5. Anhang 5	167
7.5.1. Quantifizierung der Bewegung von fluoreszenten Strukturen	167
7.5.1. Quantifizierung der Bewegung von fluoreszenten Strukturen nach Behandlung mit Nocodazol oder DMSO.....	169
8. Abkürzungen.....	171
9. Danksagung	176
10. Erklärung.....	177

1. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der *in vivo* Lokalisierung von regulatorischen und strukturellen Bestandteilen von COPI-coated Vesikeln in der Modelleguminose *Medicago truncatula*, um ein Modell für deren Funktion in Pflanzen entwickeln zu können.

Die Arbeit war in drei aufeinanderfolgende Schritte gegliedert. Der erste Schritt bestand in der Identifizierung von Homologen für Coatomerprotein-Untereinheiten, die bekanntermaßen die Proteinhülle von COPI-coated Vesikeln bilden, durch Recherche in *M. truncatula* EST-Datenbanken. Bis zu Beginn dieser Arbeit war für *M. truncatula* keine einzige Sequenz für ein Coatomerprotein beschrieben worden. Mittels der EST-Datenbanksuche konnten verschiedene homologe EST-Sequenzen für alle sieben der bekannten Untereinheiten identifiziert werden. Diese überdeckten den jeweiligen hypothetischen open reading frame (ORF) zu mindestens 75% und wiesen hohe Homologie zu Coatomer-Untereinheiten aus dem pflanzlichen und tierischen System auf.

Im zweiten Schritt wurden Sequenzen für das kleine G-Protein Arf1, das die Bildung von COPI-coated Vesikeln reguliert, und für die Coatomerproteine ϵ -COP, ζ -COP1 und ζ -COP2 aus *M. truncatula* cDNA-Banken isoliert und heterolog in *E.coli* als native und als GFP-fusionierte Proteine exprimiert. Die Produkte wurden nach Aufreinigung durch Affinitätschromatographie mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF MS untersucht.

Im dritten Schritt wurde die *in vivo* Lokalisierung der GFP-fusionierten Proteine Arf1, ζ -COP1 und ζ -COP2 in „hairy root“ transformierten Wurzeln von *M. truncatula* untersucht. Diese konnten an fluoreszenten Strukturen lokalisiert werden, die sich aktiv durch das Cytoplasma der Wurzelzellen bewegten. Das Bewegungsmuster bestand dabei aus Phasen aktiven Strömens, unterbrochen durch Pausen, in denen sich die Strukturen nicht bewegten. Durch Inkubation transgener Wurzeln mit MitoTracker konnte eine Lokalisierung der Konstrukte an Mitochondrien ausgeschlossen werden. Die Anwendung des Membranfarbstoffs FM4-64 hingegen führte zu einer Kolo-kalisation mit den fluoreszenten Strukturen, was auf eine Lokalisation an membranumhüllten Kompartimenten schließen ließ. Die Applikation von Nocodazol, eines Mikrotubuli-Inhibitors, hatte keinen Einfluß auf die Strömungsaktivität der fluoreszenten Strukturen, während die Zugabe von Latrunculin B, eines Aktin-Inhibitors, die Bewegung komplett inhibierte. Die Strömung wurde daher abhängig von intakten Aktin-Filamenten, nicht aber von Mikrotubuli gefunden. Die Koinkubation transgener Wurzeln mit ER-Tracker führte weiterhin zu dem Ergebnis, daß sich die Strukturen entlang von ER-Tubuli bewegten. Zusammengenommen deuten diese Resultate auf eine Lokalisierung der Konstrukte am Golgi-Apparat hin. Diese Vermutung konnte durch Applikation von Brefeldin A (BFA), einem potenten Inhibitor der regulatorischen GTPase Arf1, bestätigt werden. Brefeldin A induziert drastische Veränderungen der Morphologie des Golgi-Apparates durch Hemmung von Vesikeltransportprozessen. Die Zugabe des Inhibitors zu transgenen Wurzeln führte zu einer Aggregation fluoreszenter Strukturen, deren Akkumulation um den Zellkern herum und inhibierte teilweise deren Bewegungsaktivität. Arf1, ζ -COP1 und ζ -COP2 konnten daher am Golgi-Apparat lokalisiert werden. Die Vesikel selbst konnten allerdings mit keinem der verwendeten Konstrukte detektiert werden. Erst die Transformation einer konstitutiv aktiven Mutante des kleinen G-Proteins Arf1 (Arf1 Q71L) induzierte im Cytosol transgener Wurzelzellen die Akkumulation von kleinen granulären, fluoreszenten Strukturen, die als COPI-coated Vesikel interpretiert werden können.

2. Einleitung

2.1. Kompartimente tauschen Stoffe über verschiedene Mechanismen aus

Im Gegensatz zu Bakterien, die im allgemeinen aus einem einzigen Reaktionsraum bestehen, sind eukaryotische Zellen in mehrere strukturell und funktionell unterscheidbare, membranumhüllte Kompartimente unterteilt. Jedes Kompartiment oder Organell erfüllt spezifische Aufgaben und ist dafür mit charakteristischen Enzymen und anderen spezialisierten Molekülen ausgestattet. Nur durch ein koordiniertes Zusammenwirken aller Organellen kann die Zelle ihre Lebensfähigkeit aufrecht erhalten. Dieses wird durch verschiedene Formen des Stoffaustausches gewährleistet.

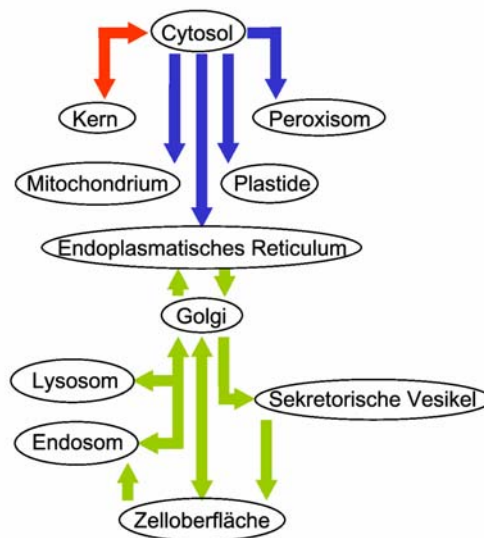


Abb. 2.1.: Vereinfachte Darstellung der Möglichkeiten zum Stoffaustausch zwischen Kompartimenten. Rot = Transport über Kernporen. Blau = Transmembrantransport über Signalpeptide. Grün = Vesikulärer Transport.

Eine Möglichkeit zum Stoffaustausch zwischen Kompartimenten, die von eukaryotischen Zellen entwickelt wurde, ist der genauestens regulierte Austausch von Transportvesikeln (Grüne Pfeile in Abb. 2.1.). Die Vesikel nehmen dabei eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Identität von Organellen durch den Transport von Proteinen, Lipiden und modifizierten Metaboliten ein (Palade, 1975). Auch der Golgi-Apparat als zentrales Element im sekretorischen Weg erhält Material über Vesikel und gibt es über diese an verschiedene andere Organelle weiter. In dieser Arbeit wurden Bestandteile von COPI-coated Vesikeln, die den rückwärtsgerichteten Transport zwischen dem Golgi und dem ER organisieren, *in vivo* in der Modelleguminose *Medicago truncatula* lokalisiert. Die folgende Einleitung soll daher einen Überblick über sekretorische Stoffflüsse in Pflanzenzellen und die verwendete Modellpflanze *M. truncatula* geben.

2.2. Die sekretorische Aktivität von Pflanzenzellen

Pflanzenzellen sekretieren große Mengen an Kohlenhydraten und Proteinen. Einfache Kohlenhydrate werden an der Plasmamembran gebildet, während komplexe Kohlenhydrate im Golgi-Apparat

synthetisiert und über Vesikel aus der Zelle ausgeschleust werden (Richmond, 2000; Doblin *et al.*, 2002; Reiter, 2002). Die Proteinsynthese hingegen erfolgt, mit Ausnahme einiger mitochondrialer und chloroplastidärer Proteine, an freien Ribosomen im Cytosol oder am rauhen ER. Proteine, die im Cytosol gebildet werden, können entweder dort verbleiben oder in die Plastiden, Peroxysomen, Mitochondrien oder den Zellkern importiert werden (Baker *et al.*, 1996; Glaser, 1998; Jackson-Constan *et al.*, 2001; Sparkes & Baker, 2002; Merkle, 2003). Das Einschleusen erfolgt dabei über spezielle Importsysteme, insofern die Proteine die passenden Erkennungssequenzen (Signalpeptide) besitzen. Die Synthese von Proteinen deren Bestimmungsort das ER, der Golgi-Apparat, die Vakuolen, die Plasmamembran oder die extrazelluläre Matrix ist, startet hingegen an dem mit Ribosomen besetzten rauhen ER (Crofts *et al.*, 2004; Herman & Schmidt, 2004). Die Proteine gelangen dabei cotranslational in das Lumen des ER, werden dort modifiziert und über Transportvesikel ausgeschleust. Das Endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat bilden daher zentrale Elemente im sekretorischen Weg von Pflanzenzellen (Abb. 2.1.). Beide sind in ihrer Funktion insbesondere von einem koordinierten Austausch von Transportvesikeln abhängig (Jürgens, 2004; Neumann *et al.*, 2003).

2.3. Aufbau des Endoplasmatischen Reticulums in Pflanzenzellen

Das Endoplasmatische Reticulum ist Bestandteil aller eukaryotischer Zellen. In Pflanzenzellen erscheint es als ein kontinuierliches Netzwerk aus lamellaren und tubulären Zisternen, die das gesamte Cytoplasma durchziehen und direkt mit der Kernhülle in Verbindung stehen. Das ER erfüllt vielfältige Aufgaben und läßt sich in verschiedene funktionelle Domänen unterteilen (Staehelein, 1997). Die Kernhülle bildet ein kontinuierliches System mit dem ER und kann daher als ein Teil dessen aufgefaßt werden. Die physikalische Kontinuität zwischen der Kernhülle und dem ER wird in Pflanzenzellen über schmale Verbindungen hergestellt. Dabei handelt es sich um verengte Membranabschnitte mit einem Durchmesser von nur 25-30 nm (Craig & Staehelein, 1988). Aufgrund des geringen Querschnitts wird angenommen, daß die Verbindungen zwar von Lipiden ungehindert passiert werden können, daß Proteine hingegen in ihrer lateralen Diffusion eingeschränkt sind (Grabski *et al.*, 1993). Dieses verhindert einen unkontrollierten Austausch von Membranproteinen zwischen Kernhülle und ER und dient daher der Aufrechterhaltung der Spezifität beider Domänen. Die innere Kernmembran ist von einer Lamina bedeckt, die als Verankerungspunkt für Chromosomen in der Interphase dient (McNulty & Saunders, 1992; Georgatos *et al.*, 1994). In der Kernhülle befinden sich die Kernporen, die den selektiven Transport von RNAs und Proteinen zwischen dem Kern und dem Cytoplasma dienen (Panté & Aebi, 1994). In Pflanzen sind die Kernporen bisher kaum charakterisiert. Eine weitere Funktion nimmt die Kernhülle in Pflanzen als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) wahr. Im Gegensatz zu tierischen Zellen gibt es in Pflanzenzellen keine Centrosomen oder Spindelpole (Lambert, 1993). Die Mikrotubuli strahlen daher nicht von dem zentral organisierten Centrosom in das Cytosol aus, sondern gehen aus vielen einzelnen Organisationszentren an der Kernhülle hervor und erscheinen daher als eine Ansammlung vieler einzelner Mikrotubuli-Cluster (Chevrier *et al.*, 1992; Lambert, 1993).

Ebenso wie in tierischen Zellen kann das Endoplasmatische Reticulum in pflanzlichen Zellen in rauhes und glattes ER unterschieden werden. Die Membran des rauhen ER ist auf der dem Cytoplasma

zugewandten Seite mit vielen Ribosomen besetzt, während das glatte ER frei von Ribosomen ist. Beide Domänen unterscheiden sich weiterhin durch die Form der ER-Zisternen. Das glatte ER ist tubulär, während das rauhe ER von lamellaren Strukturen repräsentiert wird. Das rauhe ER bildet den Eintrittspunkt von Membranproteinen und löslichen Proteinen in den sekretorischen Weg (Vitale *et al.*, 1993; Bar-Peled *et al.*, 1996; Denecke, 1996; Gormord & Faye, 1996; Pedrazzini & Vitale, 1996). Eine spezielle Ausformung des rauhen ER sind sogenannte „Protein Bodies“, die in Mais (Larkins & Hurkman, 1978), Hirse (Krishnan *et al.*, 1986) und Weizen (Levanony *et al.*, 1992) beschrieben wurden. Dabei handelt es sich um Aggregate aus hydrophoben, Alkohol-löslichen Prolaminen. Das glatte ER hingegen erfüllt seine Funktion in der Synthese von Lipiden. So sind Enzyme zur Biosynthese von Glycerolipiden (Browse & Sommerville, 1991), Isoprenoiden (Chappell, 1995), Phenylpropanoiden und Flavonoiden (Hrazdina & Jensen, 1992) und Wachsen (Post-Beittenmiller, 1996) dort konzentriert. Zudem ist es noch in weitere Subdomänen unterteilt, die spezialisierte Funktionen wahrnehmen. Während der Samenreifung können sich dort z.B. sogenannte „Oil Bodies“ entwickeln. In diesen sorgen spezifische, integrale Membranproteine, die Oleosine (Huang, 1996), für die Akkumulation von Triacylglyceriden (Wanner & Theimer, 1978). Die Oil Bodies können eine Größe von 0,6 bis 2,0 µm erreichen und schnüren sich nach ihrer Reifung vom ER ab (Fernandez & Staehelin, 1987; Craig & Staehelin, 1988). Die enthaltenen Triacylglyceride dienen als Energielieferant und als Basismaterial für die Bildung neuer Membranen während der frühen Phasen der Keimung (Fernandez & Staehelin, 1987; Huang, 1996). Das glatte ER ist weiterhin an der Bildung von Vakuolen beteiligt (Robinson, 1985; Hilling & Amelunxen, 1985; Hörtensteiner *et al.*, 1992; Herman *et al.*, 1994). Bestimmte Abschnitte des glatten ER akkumulieren Speicherproteine und differenzieren sich nach ihrer Abspaltung zu Speichervakuolen weiter (Robinson *et al.*, 1995). Spezifische Domänen im glatten ER stehen in engem Kontakt mit Aktin-Filamenten, Mitochondrien und der Plasmamembran. Durch die Interaktion mit Aktin wird das corticale ER in der Nähe der Plasmamembran fixiert und kann mit Hilfe des Akto-Myosinsystems entlang der Filamente bewegt werden (Hepler *et al.*, 1990; Lichtscheidl *et al.*, 1990). Die Nähe zu Mitochondrien dient vermutlich dem Austausch von Lipiden (Staehelin, 1997). ER und Mitochondrien teilen sich unter anderem die Aufgabe der Steroidbiosynthese, wobei die Zwischenprodukte mehrfach zwischen beiden Kompartimenten ausgetauscht werden müssen (Black *et al.*, 1994). Von der Plasmamembran erhält das glatte ER überschüssiges Membranmaterial aus exozytotischen Prozessen (Staehelin & Chapman, 1987; Craig & Staehelin, 1988). Dieses wird in einem Recyclingprozeß anderen Kompartimenten zugeführt. Modifizierte Proteine werden über spezielle Exportsysteme im glatten ER ausgeschleust. An diesen, auch als transitorisches ER bezeichneten Abschnitten, schnüren sich Transportvesikel ab und liefern das sekretorische Material weiter an den Golgi-Apparat (Domozych, 1991).

Eine Besonderheit des Endoplasmatischen Reticulums in Pflanzenzellen ist, daß es ein kontinuierliches System über Zellgrenzen hinweg ist. Das ER-Netzwerk benachbarter Zellen steht über Plasmodesmata direkt miteinander in Verbindung (Hepler, 1982; Lucas *et al.*, 1993; Lucas & Lee, 2004). Dadurch wird der Austausch von Proteinen und Lipiden über Zellgrenzen hinweg gewährleistet (Lucas & Wolf, 1993; Heinlein & Epel, 2004; Zambryski, 2004; Gallagher & Benfey, 2005).

2.4. Import von Proteinen in das Endoplasmatische Reticulum

Proteine, die für den sekretorischen Transportweg bestimmt sind, gelangen über cotranslationale Translokation in das Lumen des Endoplasmatischen Reticulums. Der entsprechende Mechanismus ist sowohl in Tier- als auch in Pflanzenzellen hoch konserviert (Chittenden *et al.*, 1997).

Die Kennzeichnung als sekretorisches Protein ist in einem 20 bis 50 Aminosäuren langen N-terminalen Signalpeptid codiert (von Heijne, 1988). Das Signalpeptid wird während der Translation an freien Ribosomen im Cytosol als erstes synthetisiert und durch einen Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt. Daraufhin wird die Translation unterbrochen und der Komplex aus mRNA, Präprotein, Ribosom und SRP zu einem SRP-Rezeptor auf dem rauhen Endoplasmatischen Reticulum geleitet (Walter & Blobel, 1981; Shan & Walter, 2005). Der Rezeptor befindet sich in der Nähe eines trimeren Proteinkomplexes (Sec61 α , β , γ), der als Kanal zur Translokation dient (Hartmann *et al.*, 1994; Kalies *et al.*, 1994; Römisch, 1999; Römisch *et al.*, 2003). In einer GTP-abhängigen Reaktion kommt es zur Interaktion zwischen dem SRP-Komplex, dem SRP-Rezeptor und dem Kanal-Komplex, in deren Verlauf das SRP vom Signalpeptid dissoziiert und dieses durch den Kanal in das Lumen des ER transloziert wird (Wanker *et al.*, 1995; Shan *et al.*, 2004). Der Querschnitt des Kanals vergrößert sich dabei während der Reaktion von 9-15 Å im inaktiven Zustand auf 40-60 Å im aktiven Zustand (Hamman *et al.*, 1997). Die Translation wird nun wieder gestartet, wobei die wachsende Polypeptidkette direkt in das Lumen des ER vordringt. Durch eine Signalpeptidase auf der dem Lumen zugewandten Seite der ER-Membran wird das N-terminale Signalpeptid dabei cotranslational entfernt (Evans *et al.*, 1986, Shelness & Blobel, 1990; Vitale *et al.*, 1993). Lösliche Proteine werden nach ihrer Translation in das Lumen des ER entlassen, während Transmembranproteine Stop-Transfer-Sequenzen oder interne Signal-Anker-Sequenzen beinhalten und in die Membran integriert werden (Spiess, 1995).

2.5. Funktionen des Endoplasmatischen Reticulums

Neben der Synthese von Lipiden (Abschnitt 2.3.) erfüllt das ER in Pflanzenzellen seine Funktion hauptsächlich in der Faltung und Modifikation von Proteinen. Dazu finden sich im ER eine Vielzahl von Enzymen und Chaperonen, die unter dem Sammelbegriff Reticuloplasmine vereint werden (Vitale & Denecke, 1999). Chaperone finden sich in allen Kompartimenten, in denen Proteinsynthese erfolgt, und helfen neu synthetisierten Proteinen sich korrekt zu falten (Boston *et al.*, 1996; Hartl, 1996). In Pflanzen unterscheidet man Chaperone der Klassen HSP100/clp, HSP90, HSP70, Chaperonine, smHSP (small molecular heat shock proteins), Calnexin und Calreticulin (Miernyk, 1999). BiP, ein Chaperon aus der Klasse der HSP70-Proteine, bindet im Lumen des ER während der cotranslationalen Translokation (Abschnitt 2.4.) an hydrophobe Abschnitte in der wachsenden Polypeptidkette und hält sie im ungefalteten Zustand. Dadurch wird die Bildung von Proteinaggregaten über hydrophobe Wechselwirkungen verhindert und die korrekte Faltung der Proteine ermöglicht (Hartl, 1996). Erst nach erfolgter Faltung dissoziiert BiP unter ATP-Hydrolyse wieder von der Polypeptidkette ab (Munro & Pelham, 1986; Hendrick & Hartl, 1993).

Im weiteren Sinne gehören noch andere Enzyme zu den Chaperonen, da sie ebenfalls die Faltung von Polypeptidketten unterstützen. Das Lumen des rauhen ER bietet optimale Bedingungen (pH-Wert, Redoxverhältnisse, Ca^{2+} -Konzentration) zur Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken (Møgelsvang & Simpson, 1998). Das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) kann in

Gegenwart von Glutathion die Bildung von Disulfidbrücken katalysieren (Huppa & Ploegh, 1998). Diese werden von dem Enzym solange gebildet, gelöst und alternativ neu verknüpft, bis die thermodynamisch optimalste Lösung erreicht ist (Laboissière *et al.*, 1995). Durch diesen Mechanismus wird die Anzahl von falsch gefalteten, nicht funktionellen Proteinen minimiert (Galili *et al.*, 1998). Das Enzym Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (PPI) ist ebenfalls an der Faltung von Proteinen im Lumen des ER beteiligt (Dolinski & Heitman, 1997, Kurek *et al.*, 1999). PPI beschleunigt die Isomerisierung von Prolyl-Bindungen, einem kritischen Schritt in der Proteinfaltung, um etwa den Faktor 300 (Schmid, 1993). Nach der Isomerisierung wird die korrekte Form der Prolyl-Bindung durch die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Polypeptids stabilisiert.

Die zweite wichtige Aufgabe neben der Faltung von Proteinen erfüllt das ER in deren Modifikation durch N-Glykosylierung. Viele sekretorische Proteine werden an Asparaginresten in der Aminosäureabfolge Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr glykosyliert, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Die N-Glykosylierung startet mit dem Zusammenbau eines komplexen Oligosaccharids aus drei Glukose-, neun Mannose- und zwei N-Acetylglucosamin-Resten ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) an einem Dolicholrest (Vitale *et al.*, 1993). Dolichol ist ein großes Lipid aus 14 bis 24 Isopreneinheiten, das in die Membran des ER integriert ist. Durch eine Oligosaccharyl-Transferase, einem Komplex aus mehreren Untereinheiten, wird das Oligosaccharid dann an ausgewählte Asparaginsäurereste in Proteinen übertragen. Dieser Prozeß erfolgt schon direkt während der cotranslationalen Translokation von Polypeptidketten in das Lumen des ER (Vitale *et al.*, 1993; Silberstein & Gilmore, 1996). Das angeheftete Oligosaccharid wird noch im ER modifiziert und das Protein dabei auf korrekte Faltung überprüft (Helenius *et al.* 1997, Helenius & Aebi, 2001). Die Glucosidase I und Glucosidase II entfernen zunächst nacheinander die Glukosereste aus dem Oligosaccharid (Sturm *et al.*, 1987; Vitale, 2001). Wird ein Protein als nicht korrekt gefaltet erkannt, wird durch eine UDP-Glukose:Glykoprotein Glykosyltransferase wieder ein Glykoserest an das Oligosaccharid angefügt (Trombetta & Parodi, 1992). Die monoglykosylierte Form wird von den Lektinen Calreticulin und Calnexin gebunden und das Protein damit einem neuen Prozeß zur Faltung zugeführt. Insofern die Faltung nun korrekt abgeschlossen werden kann, wird der neu eingefügte Glukoserest durch die Glucosidase II wieder entfernt. Nicht korrekt gefaltete oder aggregierte Proteine hingegen werden im ER zurückgehalten und ihr Transport zu den Zielkompartimenten verhindert.

Sekretorische Proteine werden nach erfolgreicher Faltung und Modifikation mittels Transportvesikel aus dem ER ausgeschleust und zum Golgi-Apparat transportiert (Rexach & Schekman, 1991; Barlowe *et al.*, 1994).

2.6. Aufbau des Golgi-Apparats in Pflanzenzellen

Der Golgi-Apparat erfüllt eine entscheidende Rolle im sekretorischen Weg von tierischen und pflanzlichen Zellen. Er bildet den Ort der Synthese einiger Glykolipide und komplexer Kohlenhydrate und ist entscheidend in die Modifikation von Proteinen mit komplexen Oligosaccharid-Seitenketten eingebunden. Die Oligosaccharide dienen quasi als „Adreßaufkleber“. In ihrer Struktur sind u.a. Informationen über den Zielort eines Proteins codiert. Modifizierte Proteine, Lipide und Kohlenhydrate werden vom Golgi aus über Vesikel zu anderen Kompartimenten transportiert, wo sie ihre spezifischen Funktionen wahrnehmen.

Der Aufbau des Golgi-Apparats soll zunächst am Beispiel tierischer Zellen erläutert werden. Man findet ihn für gewöhnlich um den Zellkern herum angeordnet, oft in der Nähe des Centrosoms. Er besteht aus vier bis sechs einzelnen Zisternen, wobei es sich um flache, membranumhüllte Reaktionsräume handelt. Diese werden je nach ihrer Ausrichtung zum Endoplasmatischen Reticulum (ER) in cis- oder trans-Zisternen unterteilt. Auf der dem ER zugewandten Seite befinden sich die cis-Zisternen und auf der abgewandten Seite die trans-Zisternen. Zu beiden Seiten wird der Golgi-Apparat durch ein System verbundener Röhren und Zisternen, dem cis- und trans-Golgi-Netz begrenzt (Abb. 2.2.).

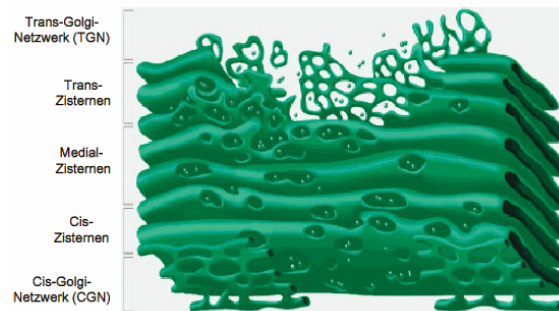


Abb. 2.2: Der Golgi-Apparat besitzt eine Polarität. Zisternen, die dem ER zugewandt sind, werden als cis-Zisternen bezeichnet, vom ER abgewandte Zisternen als trans-Zisternen. Zu beiden Seiten wird der Golgi-Apparat durch ein System untereinander verbundener Zisternen und Röhren begrenzt, dem cis- und trans-Golgi-Netzwerk. Abbildung nach Rambourg A. & Clemont A. (1990).

Der Golgi-Apparat erhält Proteine und Lipide aus dem Endoplasmatischen Reticulum und leitet diese nach Modifikation an andere Organellen weiter. Der Begriff cis-Golgi beschreibt daher das „Eingangstor“ und trans-Golgi das „Ausgangstor“ einer zellulären „chemischen Fabrik“. In den einzelnen Zisternen finden dabei räumlich getrennt voneinander verschiedene Produktionsabläufe statt. Wie in einer Fabrik muß es natürlich einen organisierten Warenein- und ausgang geben. Wie schon in Abbildung 2.1. skizziert, bedient sich die Zelle der Hilfe von Transportvesikeln zur Anlieferung und zum Abtransport von Material. Proteine und Lipide werden mittels Vesikeln vom ER in das cis-Golgi-Netz geliefert und verlassen das trans-Golgi-Netz wiederum in Vesikeln, die den Transport zu anderen Kompartimenten oder zur Zelloberfläche organisieren. Proteine im cis-Golgi-Netz werden entweder zurück zum ER oder zur Modifikation weiter in die cis-Zisternen geleitet; Proteine im trans-Golgi-Netz werden entsprechend ihrer Bestimmung geordnet und zu den Zielkompartimenten gebracht. Beide Netzwerke dienen daher als eine Art Sortierstation.

In der Organisation des Golgi-Apparats in tierischen und pflanzlichen Zellen gibt es zwar viele Gemeinsamkeiten, aber auch einige wesentliche Unterschiede (Abb. 2.3.). Die prinzipielle Organisation in Zisternen, die eine cis-trans Orientierung aufweisen, läßt sich auch für den pflanzlichen Golgi-Apparat finden. Die Anzahl der Zisternen schwankt dabei üblicherweise zwischen drei und acht (Zhang & Staehelin, 1992). Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal besteht allerdings darin, daß es in Pflanzenzellen nicht nur einen einzigen großen Golgi-Komplex gibt, sondern daß sich der Golgi-Apparat in seiner Gesamtheit aus vielen einzelnen, individuell unabhängigen Golgi-Stapeln zusammensetzt (Staehelin & Moore, 1995). Diese sind auch nicht um

den Zellkern herum angeordnet, sondern finden sich im gesamten Cytoplasma verteilt. Zudem zeigen sie ein typisches Bewegungsmuster, verursacht durch aktiven Transport mittels Myosin-Motorproteinen entlang von Aktin-Filamenten (Nebenführ *et al.*, 1999). Sie strömen dabei in einer als „stop-and-go-movement“ bezeichneten Bewegung über das Aktin hinweg. Gleichzeitig werden sie dadurch in enger räumlicher Nähe zum ER gehalten, das ebenfalls am Aktin-Cytoskelett aufgehängt ist.

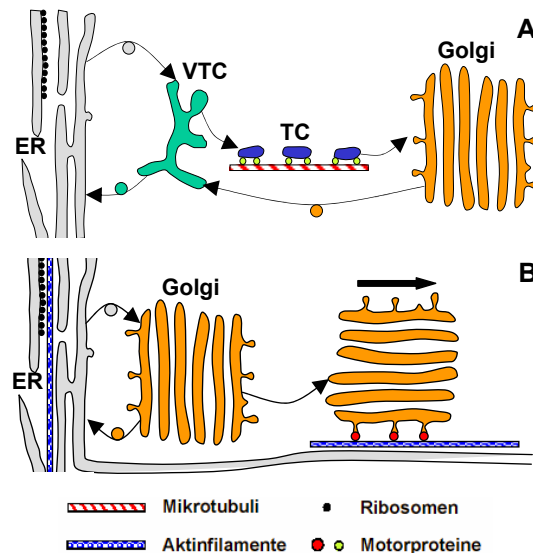


Abb. 2.3.: Unterschiede in der Organisation von tierischem (A) und pflanzlichem Golgi-Apparat (B). In tierischen Zellen befindet sich vor dem cis-Golgi ein vorgeschaltetes Kompartiment (VTC/ERGIC). Dieses erhält ständig Nachschub an Material aus dem ER über Transportvesikel. Der weitere Weg zum cis-Golgi hingegen wird über Transport-Container (TC) überbrückt. Diese werden durch Motorproteine aktiv entlang von Mikrotubuli bewegt. In Pflanzenzellen erfolgt der Transport vom ER zum Golgi hingegen auf direktem Wege. Zudem bewegen sich hier ganze Golgi-Stapel mit Hilfe von Myosin-Motorproteinen aktiv entlang von Aktin-Filamenten.

Im Gegensatz dazu ist die Organisation des Golgi-Komplexes in tierischen Zellen mehr vom Mikrotubuli-Cytoskelett abhängig. Wird die Bildung von Mikrotubuli durch Inhibitoren gehemmt, verliert der Golgi-Komplex seine Integrität, zerfällt in vesikuläre Strukturen und verschmilzt zum Teil mit dem Endoplasmatischen Reticulum (Thyberg & Moskalewski, 1999). Eine weitere entscheidende Abweichung findet sich in der Organisation des Golgi-Apparats während der Zellteilung. Der Golgi-Apparat in tierischen Zellen stoppt seine Sekretion während der Mitose, zerfällt in vesikuläre Strukturen und formt sich nach der Mitose wieder neu. Nicht so in Pflanzenzellen, hier bleiben die Golgi-Stapel während der Mitose intakt. Ihre Anzahl nimmt durch Teilung in der G2-Phase der Mitose sogar noch zu (Garcia-Herdugo *et al.*, 1988) und die Sekretionsaktivität wird forciert. Die Golgi-Stapel finden sich in der Nähe des Phragmoplasten ein und liefern große Mengen an Materialien wie z.B. Lipide und Kohlenhydratverbindungen, die in der Zellwandsynthese gebraucht werden. Ein weiterer, ganz wesentlicher Unterschied betrifft den Transport zum cis-Golgi. Vorgeschaltet vor dem cis-Golgi-Netz findet man in tierischen Zellen ein sogenanntes ER-Golgi-Intermediate-Compartment (ERGIC) (oft auch als Vesicular Tubular Cluster VTC bezeichnet). Transportvesikel aus dem ER liefern hier durch Fusion mit dem Kompartiment ihr Material ab. Vom ERGIC zum cis-Golgi-Netz erfolgt die Weiterleitung dann in sogenannten Transport Containern (TC), die entlang von Mikrotubuli-Filamenten

transportiert werden. In Pflanzenzellen hingegen existiert kein Kompartiment zwischen ER und cis-Golgi. Zudem gibt es kein ausgeprägtes cis-Golgi-Netz (Dupree & Sherrier, 1998). Der Transport erfolgt daher direkt zwischen dem ER und den cis-Golgi-Zisternen.

Der pflanzliche Golgi-Apparat unterscheidet sich in seiner Organisation und seinem Verhalten in vielen Punkten wesentlich von seinem Gegenstück in tierischen Zellen. Wie Prof. Chris Hawes (2005) in seinem neuesten Review über den pflanzlichen Golgi-Apparat angemerkt hat, „ist es daher unerlässlich Daten in Gänze zu analysieren und Experimente zum Transport in Pflanzen vorsichtig zu interpretieren, anstatt vorschnell Strukturen und Genprodukten Funktionen zuzuweisen, nur weil sie in der Literatur zu Hefe- und Mammalierzellen beschrieben wurden“.

2.7. Funktionen des Golgi-Apparats

In Pflanzenzellen ist der Golgi-Apparat in die Synthese von komplexen Polysacchariden der Zellwand, in die Synthese und Prozessierung von O- und N-gekoppelten Oligosaccharid-Seitenketten von Membran-, Zellwand- und Vakuolenproteinen und in die Produktion von Glykolipiden für die Plasmamembran und den Tonoplasten involviert. Als komplexe Polysaccharide werden alle verzweigt-kettigen Kohlenhydrate zusammengefasst. Dazu gehören z.B. Pektine und Hemicellulosen, die zwischen 50 und 80% des Trockengewichts einer Pflanzenzelle ausmachen (Brett & Waldron, 1996). Pektin ist ein Sammelbegriff für verschiedene Polyuronsäuren die je nach ihrem Hauptbestandteil in z.B. Arabinane, Galactane, Arabinogalactane, Polygalacturonsäuren oder Rhamnogalacturane unterteilt werden. Ebenso bilden die Hemicellulosen eine große Gruppe verschiedenster Polymere wie Xylane, Glucane, Mannane, Glucomannane oder Galactomannane. Lineare Polymere wie Cellulose und Kallose hingegen, die nicht zu den komplexen Polysacchariden gehören, werden an der Plasmamembran synthetisiert.

Die N-Glykosylierung von Proteinen startet im ER (Abschnitt 2.5.). Nach dem Transport der Proteine aus dem ER in den Golgi-Apparat wird der Reifungsprozess am Oligosaccharid fortgeführt. Zunächst werden dazu Mannosereste durch die Mannosidase I selektiv entfernt, gefolgt von der Addition eines N-Acetylglucosamin-Rests. Die resultierende Struktur $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ wird anschließend durch Glukosidasen und Glykosyltransferasen weiter modifiziert. Dabei können weitere Zuckerreste entfernt oder angefügt werden. In Pflanzen findet man in N-Glykanen typischerweise Zucker wie Mannose, N-Acetylglucosamin, Fucose, Xylose und Galaktose (Lerouge *et al.*, 1998). Die Enzyme, die diese Reaktionen ausführen, sind dabei nicht wahllos über den Golgi-Apparat verteilt, sondern in verschiedenen Zisternen untergebracht. Während das Protein den Golgi-Apparat von cis nach trans durchläuft, werden die einzelnen Modifikationen nacheinander angebracht. Die Lokalisierung der Enzyme spiegelt dabei die Reihenfolge wieder, mit der einzelne Veränderungen vorgenommen werden. Neben N-glykosylierten Proteinen findet man in Pflanzen auch Proteine mit O-Glykosylierungen. Darunter fallen z.B. Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine (HRGP) und Arabinogalactan-reiche Glykoproteine (AGP), die strukturelle Funktionen in der Zellwand erfüllen. Die Zucker, meist Arabinose und Galaktose, werden über Hydroxylgruppen an Aminosäuren wie Hydroxyprolin, Serin und Threonin angefügt. Während die Konvertierung von Prolin zu Hydroxyprolin noch im ER stattfindet, werden die Zucker über Glykosyltransferasen in den cis-Zisternen des Golgi-Apparats angefügt (Gardiner & Chrispeels, 1975; Owens & Northcote, 1981).

2.8. Transportprozesse am Golgi-Apparat verlaufen über Vesikel

Der Golgi-Apparat ist in seiner Funktion von verschiedenen Typen von Transportvesikeln abhängig. Material aus dem Endoplasmatischen Reticulum wird dem Golgi-Apparat über COP(Coatomer Protein)II-coated Vesikel zugeführt (Salama *et al.*, 1993). Der umgekehrte Weg zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER hingegen wird durch COPI-coated Vesikel überbrückt. Clathrin-coated Vesikel (CCV) schleusen modifiziertes Material aus dem Golgi-Apparat aus und vermitteln den Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den prävakuolären bzw. prälysosomalen Kompartimenten und der Zellmembran. Gleichzeitig sind sie an endocytotischen Prozessen beteiligt (Hirst & Robinson, 1998). Den erwähnten Typen von Vesikeln ist gemeinsam, daß sie über sehr ähnliche Mechanismen reguliert werden (Jürgens, 2004). Die Vesikelbildung wird durch die Aktivierung von kleinen G-Proteinen der Untergruppe Arf eingeleitet (Abschnitt 2.9.). Dieses führt zur Rekrutierung von cytosolischen Hüllproteinen an die Donormembran. Diese induzieren eine sukzessive Verformung der Membran, in deren Verlauf sich ein proteinumhülltes (coated) Vesikel abschnürt. Die Hüllproteine werden nur für die Vesikelbildung benötigt und dissoziieren nach Inaktivierung des kleinen G-Proteins wieder von dem Vesikel ab. Dieses eröffnet die Einleitung des letzten Schrittes, die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran. Die Erkennung von Vesikel und Zielkompartiment wird dabei durch einen spezifischen Mechanismus gewährleistet, der die Interaktion von Proteinen auf der Vesikeloberfläche mit Proteinen auf der Oberfläche der Zielmembran beinhaltet (SNARE-Hypothese, Abbildung 2.4.)

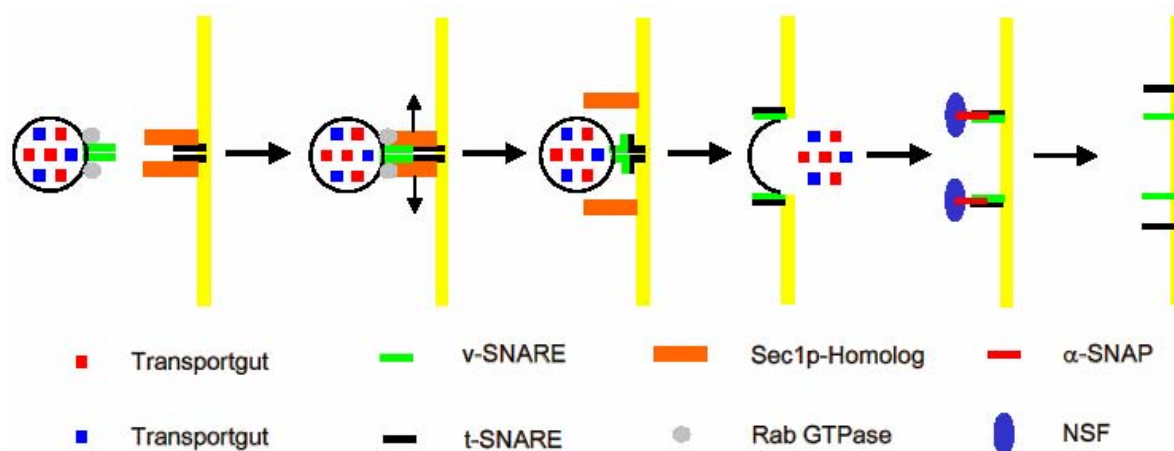


Abb. 2.4.: Der SNARE-Mechanismus zur Fusion von Vesikeln. v-SNAREs und Rab-GTPasen befinden sich in der Vesikelmembran. In der Akzeptormembran befinden sich t-SNAREs, die durch Sec1p-Homologe im inaktiven Zustand gehalten werden. Aktiviertes Rab verdrängt Sec1p und leitet damit die Interaktion zwischen v- und t-SNARE ein, die zur Fusion der Membranen und zur Entleerung des Vesikelinhalts in das Zielkompartiment führt. α-SNAP und NSF binden an den v-SNARE/t-SNARE-Komplex und leiten dessen Dissoziation ein. (Abbildung modifiziert nach Sanderfoot & Reikhel, 1999).

In die Vesikelmembran eingebettet findet man v-SNARE-Proteine (vesicle SNAP-receptor) und entsprechend in der Zielmembran t-SNAREs (target SNAP-receptor). Die Proteine sind über C-terminale, hydrophobe Domänen oder posttranslational angefügte Lipide in den Membranen verankert. Weiterhin befinden sich in der Vesikelmembran kleine G-Proteine der Untergruppe Rab und in der Zielmembran Sec1p-Homologe. Aktiviertes Rab^{GTP} verdrängt Sec1p vom t-SNARE und leitet die

Wechselwirkung zwischen v- und t-SNARE über coiled-coil Domänen ein (Lupashin & Waters, 1997). Dieses führt zur Fusion des Vesikels mit seiner Zielmembran, wobei der Inhalt in das Kompartiment entleert wird. Die Interaktion von v-SNARE und t-SNARE führt zur Rekrutierung von zwei weiteren, cytosolischen Proteinen: Der hexameren ATPase NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) und α -SNAP (Soluble NSF-attachment protein) (Malhotra *et al.*, 1988; Eakle *et al.*, 1988; Sato *et al.*, 1997). Durch die Verbindung von v- und t-SNARE wird zunächst eine Bindungsstelle für α -SNAP geschaffen. α -SNAP rekrutiert nun seinerseits NSF zum SNARE-Komplex, das unter ATP-Hydrolyse die Dissoziation von v- und t-SNARE bewirkt. Die t-SNARE Proteine stehen damit für einen weiteren Zyklus zur Verfügung. Die v-SNARE-Proteine müssen erst zur Donormembran zurück transportiert werden, um erneut eingesetzt werden zu können.

Pflanzenzellen besitzen die gleiche Maschinerie zur Fusion von Vesikeln wie tierische Zellen. Alle Komponenten, die zur Vesikelfusion notwendig sind und zur Formulierung der SNARE-Hypothese geführt haben, sind auch in Pflanzen zu finden (Nebenführ, 2002). Die Bildung von Vesikeln hingegen wird durch kleine G-Proteine aus der Untergruppe Arf reguliert, diese sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

2.9. Kleine G-Proteine der Untergruppe Arf

Monomere G-Proteine der Untergruppe Arf sind Mitglieder der GTPase-Superfamilie (Hall & Zerial, 1995) und stellen damit wichtige molekulare Schalterproteine jeder eukaryotischen Zelle dar. G-Proteine generell hydrolysieren GTP zu GDP und Phosphat. Alle GTPasen können in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen: einer aktiven GTP-gebundenen Form und einer inaktiven GDP-gebundenen Form (Abb. 2.5.).

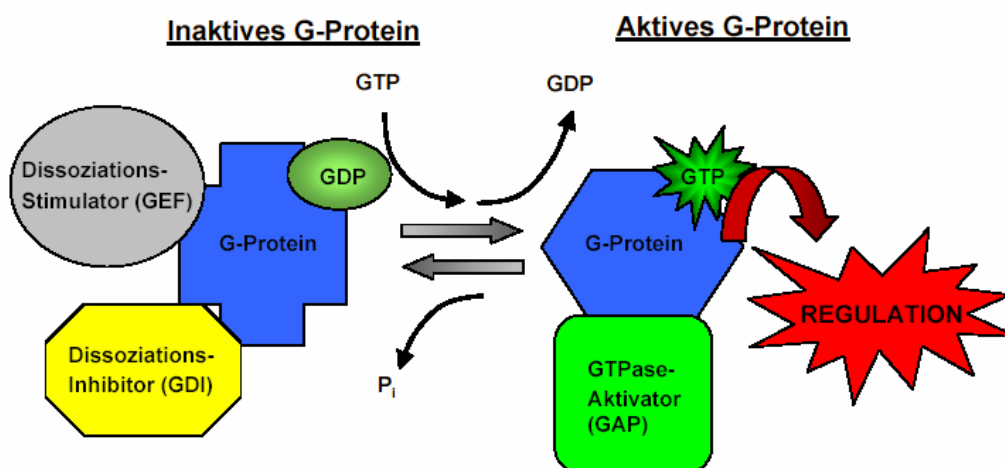


Abb. 2.5.: Regulation kleiner G-Proteine durch den Dissoziations-Stimulator (GEF), Dissoziations-Inhibitor (GDI) und den GTPase-Aktivator (GAP). Im GDP-gebundenen Zustand ist das G-Protein inaktiv. Erst durch die Vermittlung des Dissoziations-Stimulators kann GDP gegen GTP ausgetauscht werden. Im GTP-gebundenen Zustand ist das G-Protein aktiv und aktiviert die verschiedensten Folgereaktionen. Der GTPase-Aktivator stimuliert die intrinsische GTPase-Aktivität, so daß es zur GTP-Hydrolyse kommt und das G-Protein wieder im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vorliegt. Der inaktive Zustand kann durch den Dissoziations-Inhibitor stabilisiert werden.

Monomere G-Proteine sind jedoch „sehr langsame“ GTPasen und stellen damit molekulare Uhren dar. Solange das GTP nicht hydrolysiert ist, ist das G-Protein aktiv und aktiviert seinerseits eine Vielzahl von Folgeprozessen. Die Dauer des aktiven, GTP-gebundenen Zustands wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP, engl. GTPase activating protein) bestimmt. Der Übergang vom inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, in den aktiven GTP-gebundenen Zustand, kann durch Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF, engl. Guanine-nucleotide exchange factor) stimuliert werden. In Konkurrenz mit den aktivierenden GEF-Proteinen stehen die Inhibitoren des GDP-GTP Austausches, die Guanin-Dissoziations Inhibitoren (GDI, engl. guanine-nucleotide dissociation inhibitor) (Abb. 2.5.). Von den einzelnen Regulationsfaktoren existieren häufig verschiedene Isoformen. So sind für das tierische G-Protein Rho bisher 9 verschiedene GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschrieben (Lamarche & Hall, 1994). Die Zelle verfügt damit über ein komplexes System differentieller Regulationsmöglichkeiten.

Kleine G-Proteine der Untergruppe Arf sind wesentlich an der Regulation von intrazellulären Vesikeltransportprozessen beteiligt (Chavrier & Goud, 1999). Sie lassen sich in die Subklassen Arf (ADP ribosylation factors), Arl (Arf-like proteins), Arp (Arf-related proteins) und Sar (Secretion-associated and Ras-related) unterteilen (Pasqualato *et al.*, 2002). Arl1 (Lu *et al.*, 2001) und Sar-Proteine (Nakano & Muramatsu, 1989) erfüllen, wie Arf-Proteine, Aufgaben in der Regulation des Membrantransports. Arl2 ist in die Faltung von nativem Tubulin involviert (Bhamidipati *et al.*, 2000; Steinborn *et al.*, 2002) und Arl4 ist im Zellkern lokalisiert (Lin *et al.*, 2000). Die meisten anderen Mitglieder der Familie der Arf-Proteine hingegen sind bisher kaum charakterisiert, über ihre möglichen Funktionen liegen keine Erkenntnisse vor. Arf-Proteine nehmen eine Sonderstellung innerhalb der Familie der monomeren GTPasen ein, da sie nicht über Dissoziationsinhibitoren (GDIs) reguliert werden (Takai *et al.*, 2001). Zudem werden sie nicht, wie andere kleine G-Proteine, C-terminal isoprenyliert. Sie erhalten entweder überhaupt keinen Isoprenrest (Sar- und Arp-Gruppe) oder werden N-terminal mit einem Myristeinsäurerest (Arf-Gruppe) modifiziert (Franco *et al.*, 1996). Vertreter aller Subklassen von Arf-Proteinen sind auch in Pflanzen vorhanden. Durch die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* konnten zahlreiche Homologe aus den Klassen Arf/Arl/Arp und Sar nachgewiesen werden (Pasqualato *et al.*, 2002; Vernoud *et al.*, 2003). Hingegen fehlen aber kleine („low molecular weight“) GEFs. Allen GEFs für Arf-Proteine ist eine Sec7-Domäne gemeinsam, die den Austausch von GDP gegen GTP katalysiert (Chardin *et al.*, 1996). Im tierischen System konnten viele verschiedene GEFs identifiziert werden, die in die fünf Subklassen Gea/Gnom/GBF, Sec7/BIG, ARNO/Cytohesin/GRP, EFA6 und Arf-GEP100 unterteilt sind (Jackson & Casanova, 2000; Someya *et al.*, 2001). Die großen („high molecular weight“) GEFs der Klassen Gea/Gnom/GBF und Sec7/BIG erfüllen ihre Funktion im ER-Golgi System, während die kleinen GEFs ARNO/Cytohesin/GRP und EFA6 vor allem im Endosomen-Plasmamembran System zu finden sind (Donaldson & Jackson, 2000). In *Arabidopsis thaliana* existieren ausschließlich große GEFs der Familien Gea/Gnom/GBF und Sec7/BIG. Diese allerdings sind nicht ausschließlich im ER-Golgi System lokalisiert; so konnte der Arf-GEF GNOM in *Arabidopsis* an Endosomen nachgewiesen werden (Geldner *et al.*, 2003). Arf-GAPs bilden in Pflanzen ebenfalls eine große, heterogene Familie, die in vier Subklassen unterteilt wird. In *Arabidopsis* konnten insgesamt 15 Proteine mit Arf-GAP Domänen identifiziert werden (Vernoud *et al.*, 2003).

Das kleine G-Protein Sar1 wird von dem GEF Sec12 und dem GAP Sec23/24 reguliert (Nakano *et al.*, 1988; Barlowe *et al.*, 1993; d'Enfert *et al.*, 1991). Diese besitzen eine andere Struktur als Arf-GEFs und -GAPs (Barlowe, 1994). Entsprechende Homologe für Sar1, Sec12 und Sec23/24 konnten auch in Pflanzen nachgewiesen werden (d'Enfert *et al.*, 1992, Davies, 1994; Bar-Peled & Raikhel, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998, Movafeghi *et al.*, 1999, Vernoud *et al.*, 2003).

Die Proteine Sar1 und Arf1 sind von besonderer Bedeutung für den Vesikeltransport am Golgi-Apparat, da sie die Bildung von COPII-coated und COPI-coated Vesikeln regulieren, die den anterograden (vorwärtsgerichteten) und retrograden (rückwärtsgerichteten) Transport zwischen Golgi und ER organisieren (Barlowe C., 1998; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998).

2.10. Struktur der kleinen G-Proteine Arf1 und Sar1

In Arf1 sind die Konsensussequenzen (G-Boxen) GLDXAGKTT, D(x)_nT, WD(V/I/L)GGQ, NKQD und TCAT für GTP-Bindung, Bindung von Mg²⁺ und Stabilisierung der GTP-Bindung verantwortlich (Kahn, 1995; Bourne *et al.*, 1991). Insbesondere das Sequenzmotiv wDvGGqxxxRxxW, das Teile des Interswitches und den größten Bereich von Switch 2 umfaßt, spielt dabei eine wesentliche Rolle (Abb. 2.6. und 2.7.). Im inaktiven Zustand interagiert das Tryptophan mit dem Aspartat und den beiden Glycin-Resten und hält den Interswitch und Switch 2 in einer Konformation, die inkompatibel mit der Bindung von GTP ist. Im GTP-gebundenen Zustand hingegen bilden das Arginin, das Tryptophan und die beiden Glycin-Reste ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, das Switch 2 in einer für die GTP-Bindung optimalen Konformation fixiert (Pasqualato *et al.*, 2002). Weiterhin sind die Threonin-Reste in den Positionen 31 und 48 in die oktaedrische Koordination des Mg²⁺-Ions im gebundenen GTP involviert, und ein Glutamin-Rest in Position 71 richtet ein Molekül Wasser für die hydrolytische GTPase-Reaktion aus (Scheffzek *et al.*, 1997). Interessanterweise ist es auch ein Glutamin-Rest im Arf1-Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) Gea2, der in das aktive Zentrum von Arf1 inseriert wird, dort mit den Mg²⁺- und Phosphat-Bindungsstellen interagiert und das gebundene GDP verdrängt (Goldberg, 1998).

```

1  M G N I F A N L F K G L F G K K E M R I 20
21  L M V G L D A A G K T T I L Y K L K L G 40
41  E I V T T I P T I G F N V E T V E Y K N 60
61  I S F T V W D V G G Q D K I R P L W R H 80
81  Y F Q N T Q G L I F V V D S N D R E R V 100
101 N E A R E E L M R M L A E D E L R D A V 120
121 L L V F A N K Q D L P N A M N A A E I T 140
141 D K L G L H S L R H R N W Y I Q A T C A 160
161 T S G D G L Y E G L D W L S N Q L R N Q 180
181 K *

```

Abb. 2.6.: Primärstruktur von Arf1 aus *Homo sapiens* (Accession number M35340). Fett + unterstrichen: Aminosäuren in den hochkonservierten G-Boxen. Grün + kursiv: Die ersten 17 Aminosäuren am N-Terminus, die eine hydrophobe α -Helix bilden. Blau: Aminosäurereste, die eine hydrophobe Bindungstasche für die N-terminale

α -Helix ausbilden. Rot: Aminosäuren, die eine besondere Rolle bei der Interaktion mit GTP spielen. Lila + Kursiv: Myristoylierter Glycinrest. Rot unterstrichen: Switch-Domänen 1 und 2. Grün unterstrichen: Interswitch.

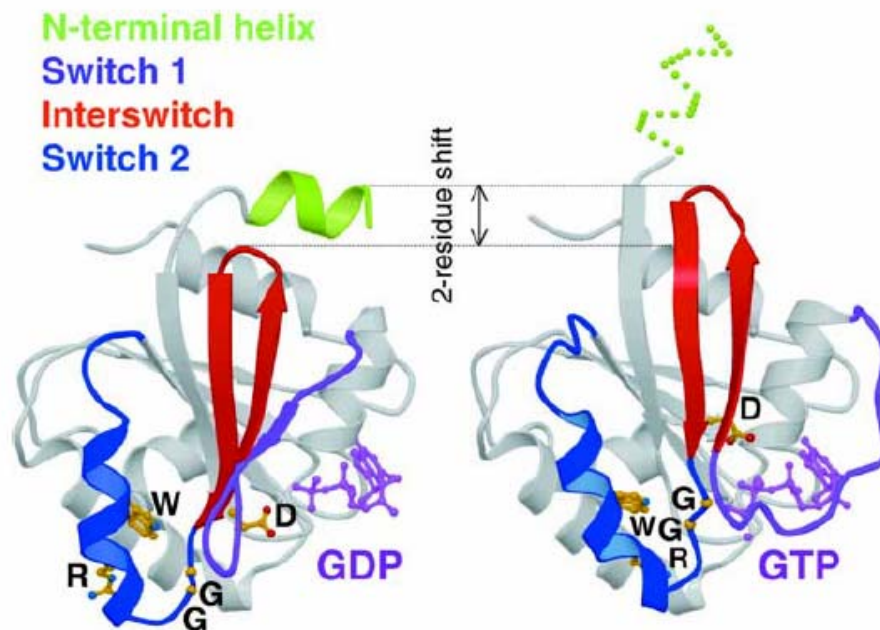


Abb. 2.7.: Konformationsänderung in humanem Arf6. Ein Vergleich der Strukturen von Arf6-GDP (Menetrey *et al.*, 2000) und Arf6-GTP γ S (Pasqualato *et al.*, 2001) offenbart den Mechanismus der Exposition der N-terminalen Helix in Arf-Proteinen nach Bindung von GTP. Abbildung aus Pasqualato *et al.* (2002).

Die ersten 17 Aminosäuren am N-Terminus bilden eine hydrophobe α -Helix, die an einem Glycinrest in Position 2 durch eine Myristoyltransferase (NMT) isoprenyliert wird (Franco *et al.*, 1996). Die myristoylierte α -Helix liegt in inaktivem Arf1 in einer hydrophoben Tasche, die von den Aminosäureresten Tyr58, Asn60, Ile61 und Phe63 gebildet wird. Diese interagieren mit den Resten 6-15 der N-terminalen α -Helix (Goldberg 1998). In der GTP-gebundenen Konformation wird der N-Terminus aus der Tasche entlassen und damit verfügbar für die Interaktion mit Membranen (Antony *et al.* 1997). Zur Freisetzung der N-terminalen Helix kommt es durch eine signifikante Konformationsänderung nach GTP-Bindung (Abb. 2.7). In diesem Mechanismus unterscheiden sich Arf1 und weitere Vertreter der Untergruppe Arf von anderen kleinen G-Proteinen. Bei Bindung von GTP erfolgt in Arf1 eine Verschiebung der Positionen von Switch 1 und Switch 2. Dieses zieht wiederum eine Translokation des mit ihnen verbundenen Interswitches um 7-8 Å nach sich. Dieser besetzt daraufhin die hydrophobe Bindungstasche für die N-terminale α -Helix, so daß diese von dem Protein exponiert und frei für die Interaktion mit Membranen wird (Goldberg, 1998; Pasqualato *et al.*, 2001). Durch die Bewegung des Interswitches findet daher eine intramolekulare Kommunikation statt, wodurch die Bindung von GTP mit der Exposition der N-terminalen Helix verknüpft wird (Pasqualato *et al.*, 2002).

Das Protein Sar1 zeigt einen homologen Mechanismus nach GTP-Aktivierung (Bi *et al.*, 2002; Pasqualato *et al.*, 2002), unterscheidet sich aber vor allem an seinem N-Terminus strukturell von Arf1 (Huang *et al.*, 2001). Sar1 wird im Gegensatz zu Arf1 nicht isoprenyliert. Statt dessen besitzt das Protein einen zusätzlichen Abschnitt aus neuen hydrophoben Aminosäuren am N-Terminus, der als „Sar1-NH2-terminal activation recruitment motif“ (STAR) bezeichnet wird. Der hydrophobe Abschnitt

vermittelt die Interaktion mit Membranen und mit dem Sar1 Guaninnukleotidaustauschfaktor Sec12. Eine weitere amphipatische α -Helix am N-terminus (α_1 Helix, Aminosäurereste 15-19) hingegen zeigt Wechselwirkungen mit dem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) Sec23/24.

2.11. COPII-coated Vesikel transportieren Material aus dem ER zum Golgi

COPII-coated Vesikel werden am transitorischen Endoplasmatischen Reticulum (Abschnitt 2.3.) gebildet und transportieren sekretorisches Material zum cis-Golgi (Antonny & Schekman, 2001, Barlowe, 2002; Barlowe, 2003).

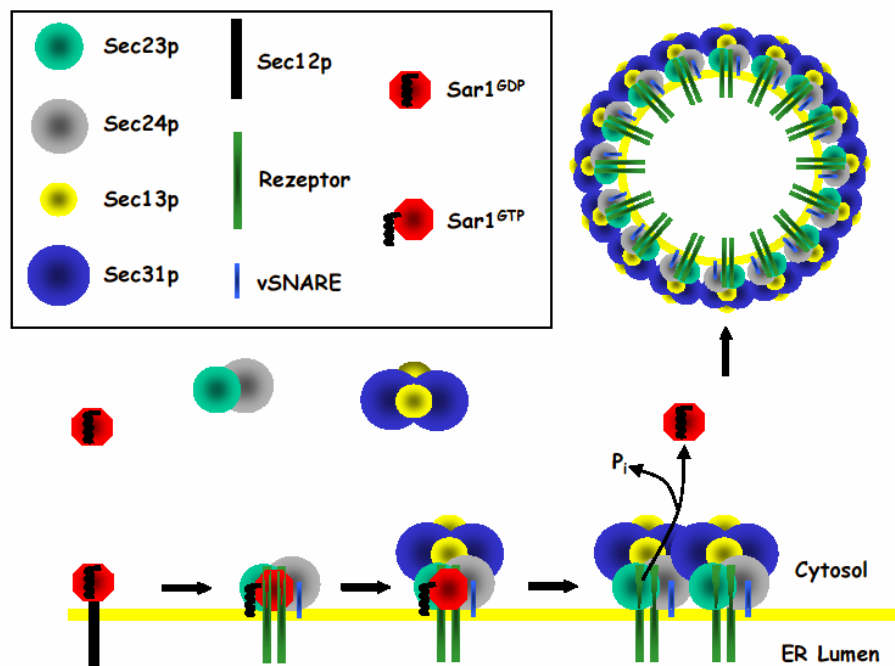


Abb. 2.8.: Modell für die Bildung von COPII-coated Vesikeln am transitorischen ER. Nach Aktivierung durch den GEF Sec12p integriert Sar1^{GTP} über seine N-terminal exponierte α -Helix in die ER-Membran. Sar1^{GTP} induziert die Anlagerung von cytosolischen Sec23p/24p-Komplexen. Sec23p/24p seinerseits rekrutiert Transportgut und SNARE-Proteine. Sec13p/31p-Komplexe binden an die Aggregate aus Sar1^{GTP} und Sec23p/24p, stabilisieren die Bindung von Sec23p/24p an der ER-Membran und stimulieren zusammen mit Sec23p/24p die GTPase-Aktivität in Sar1. Nach GTP-Hydrolyse verläßt Sar1^{GDP} den Proteincoat. Die Sec23p/24p-Komplexe induzieren eine Krümmung der ER-Membran, die zur sukzessiven Abschnürung eines COPII-coated Vesikels führt.

Die Vesikelbildung (Abb. 2.8.) startet mit der Aktivierung der GTPase Sar1 durch das Transmembranprotein Sec12p, das als GEF für Sar1 fungiert (Nakano *et al.*, 1988; Barlowe & Schekman, 1993). Aktiviertes Sar1 integriert daraufhin über seine N-terminale Helix in die Membran des ER. Die Aktivierung von Sar1 zieht wiederum die Anlagerung der beiden Komplexe Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p an die Membran nach sich (Antonny & Schekman, 2001). Der Sec23p/24p-Komplex besteht aus einer 85 kDa großen Sec23p Untereinheit und einer 104 kDa großen Sec24p Untereinheit (Hicke & Schekman, 1989; Hicke *et al.*, 1992; Antonny *et al.*, 2003). In dem Komplex bildet sich eine konkave Oberfläche aus, die mit basischen Aminosäureresten besetzt ist. Diese besitzt eine hohe Affinität zu Membranen und fördert deren Verformung im Zuge der Vesikelabschnürung (Bi *et al.*, 2002). Der Sec13p/31p Komplex wird erst nach der Anlagerung des

Sec23p/24p Komplexes rekrutiert und bildet die äußere Lage der Proteinhülle (Matsuoka *et al.*, 2001; Aridor *et al.*, 2001). Er besteht aus den Proteinuntereinheiten Sec13p (34 kDa) und Sec31p (150 kDa), die *in vivo* zu einem Heterotetramer zusammengelagert sind (Barlowe *et al.*, 1994; Salama *et al.*, 1997, Matsuoka *et al.*, 1998, Antony *et al.*, 2003). Die dafür notwendige Protein-Protein-Interaktion wird über WD40 Motive vermittelt, die in beiden Proteinen enthalten sind (Salama *et al.*, 1993, Pryer *et al.*, 1993). In Hefe interagieren Sec23p, Sec24p und Sec31p außerdem noch mit Sec16p, einem membranassoziierten Coatprotein, das zusätzliche Bindungsstellen für die Organisation der Proteinhülle zur Verfügung stellt (Shaywitz *et al.*, 1997). Nach der sukzessiven Anlagerung aller notwendigen Untereinheiten schnürt sich ein COPII-coated Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 60 nm von der ER-Membran ab (Antony *et al.*, 2003).

Die Reihenfolge der Anlagerung der einzelnen Untereinheiten spiegelt ihre Rollenverteilung bei der Vesikelbildung wieder. Der ternäre Komplex aus Sar1^{GTP} und Sec23p/24p geht an der ER Membran Interaktionen mit zu transportierenden Molekülen oder Rezeptoren für Transportgut ein (Aridor *et al.*, 1998; Kuehn *et al.*, 1998). Zudem sorgt Sec24p für die Integration von spezifischen v-SNAREs und Rab-GTPasen (Rab1) in die Vesikelmembran (Sanderfoot & Raikhel, 1999; Cao & Barlowe, 2000; Mossessova *et al.*, 2003, Miller *et al.*, 2003). Die Bindung von Sec13p/31p stabilisiert die Interaktionen zwischen den Sec23p/24p-Komplexen und ihrer Fracht, leitet aber gleichzeitig einen Prozeß zur Verdrängung der GTPase Sar1 ein. Sec23p bindet an die Switch-Domänen in Sar1 und fungiert für das Protein als GAP. Es stimuliert die geringe intrinsische GTPase-Aktivität von Sar1, indem es einen Argininrest in das aktive Zentrum führt und die Hydrolyse von gebundenem GTP forciert (Bi *et al.*, 2002). Zwar wirkt Sec23p auch ohne Sec24p als GAP, beide Proteine lagern sich allerdings schon im Cytosol zu einem Heterodimer zusammen und werden immer gemeinsam an die ER-Membran rekrutiert (Hicke *et al.*, 1992; Aridor *et al.*, 1998). Der beschriebene Modus der Inaktivierung von Sar1 sorgt dafür, daß sich nur in Anwesenheit von Transportgut COPII-coated Vesikel von der ER-Membran abschnüren. Insofern der Sec23p/24p-Komplex mit Fracht beladen ist, wird die GAP-Aktivität reduziert und es verbleibt ausreichend Zeit für die Anlagerung aller zur Vesikelbildung notwendigen Komponenten. Ist allerdings kein Transportgut vorhanden, wird Sar1 frühzeitig inaktiviert und die Sec-Komplexe fallen wieder von der ER-Membran ab (Antony *et al.*, 2001). Nach erfolgter Abschnürung eines COPII-coated Vesikels wird Sar1^{GTP} durch GTP-Hydrolyse inaktiviert und verläßt die Proteinhülle. Diese wird daraufhin instabil und dissoziiert ebenfalls vom Vesikel ab. Dieser Prozeß des Vesikel „uncoatings“ ist notwendig, um das Verschmelzen mit der Ziellmembran durch v-SNARE/t-SNARE-Interaktionen zu gewährleisten (Cao & Barlowe, 2000).

Die Erkennung von zu transportierenden Proteinen wird durch spezifische Sequenzmotive oder durch zusätzliche Rezeptoren gewährleistet. Eine Klasse von Motiven sind hydrophobe oder aromatische Aminosäuren am C-Terminus. So konnten Motive aus zwei Phenylalaninresten (FF) oder einem Valinrest (V) im C-Terminus als Signal für den ER-Export identifiziert werden (Iodice *et al.*, 2001; Nufer *et al.*, 2002). Eine weitere Klasse von Motiven besteht aus den kurzen, internen Aminosäureabfolgen EXD (Glu-X-Asp) oder DXE (Asp-X-Glu) (Nishimura & Balch, 1997; Ma *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002). Für eine Reihe von Proteinen hingegen existieren noch zusätzliche Rezeptoren wie z.B. RAP, NinaA, Erv29p, Erv14p oder ERGIC53, die die Verpackung von

sekretorischen Proteinen in COPII-coated Vesikel ermöglichen (Baker *et al.*, 1994; Willnow, 1998; Belden & Barlowe, 2001; Danasako *et al.*, 2001; Petaja-Repo *et al.*, 2002; Powers & Barlowe, 2002).

2.12. COPI-coated Vesikel organisieren den retrograden Transport vom Golgi zum ER

COPI-coated Vesikel schnüren sich an den lateralen Enden der Golgi-Zisternen ab und transportieren Material vom Golgi-Apparat zurück zum ER (Orci *et al.*, 1986; Cosson & Letourneur, 1994; Letourneur *et al.*, 1994; Sönnichsen *et al.*, 1996).

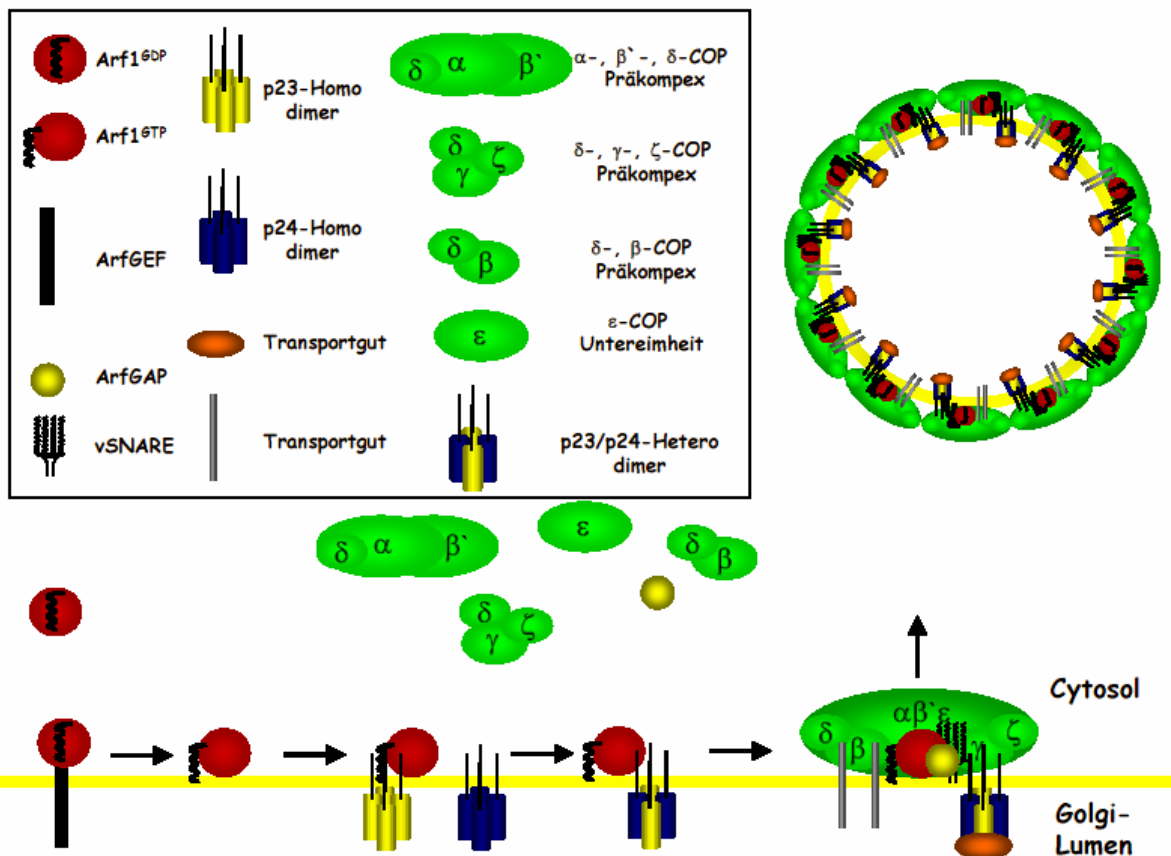


Abb. 2.9.: Modell für die Bildung von COPI-coated Vesikeln am Golgi-Apparat. Nach Aktivierung durch einen GEF integriert Arf1^{GTP} über seinen Myristoylrest und seine N-terminal exponierte α -Helix in die Golgi-Membran. Arf1^{GTP} bindet an p23-Homodimere, die daraufhin mit p24-Homodimeren in Wechselwirkung treten und sich zu p23/p24-Heterodimeren umlagern. Gemeinsam rekrutieren Arf1^{GTP} und p23/p24-Heterodimere cytosolische, präformierte Coatmer-Komplexe. Die Anlagerung der sieben COPI-Coatmer Untereinheiten α -COP, β -COP, β^* -COP, γ -COP, δ -COP, ϵ -COP und ζ -COP induziert die notwendige Krümmung der Membran und führt zur sukzessiven Abschnürung eines COPI-coated Vesikels. Eine wichtige regulatorische Funktion wird in diesem Prozeß von ARFGAP erfüllt. Das Protein vermittelt die Interaktion von Arf1^{GTP} mit Coatmer-Untereinheiten und vSNAREs und aktiviert die intrinsische GTPase-Aktivität von Arf1 in Abhängigkeit von der Membrankrümmung und von der Anwesenheit von Transportgut.

Vorraussetzung für die Bildung von COPI-coated Vesikeln ist die Aktivierung von cytosolischem Arf1^{GDP} durch einen membrangebundenen GEF (Donaldson *et al.*, 1992a; Helms & Rothman, 1992;

Chardin *et al.*, 1996; Peyroche *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 1998; Togawa *et al.*, 1999; Yamaji *et al.*, 2000). Aktiviertes Arf1^{GTP} integriert daraufhin über seinen Myristoylrest und seine N-Terminale amphipatische α -Helix in die Golgi-Membran (Franco *et al.*, 1996) und wechselwirkt mit p23 Transmembranproteinen (Sohn *et al.*, 1996; Bremser *et al.*, 1999). Dafür steht am C-Terminus von Arf1^{GTP} eine Bindungsstelle für p23 zur Verfügung (Sohn *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1998, Gommel *et al.*, 2001). Die Bindung von Arf1^{GTP} initiiert einen Prozeß, der den oligomeren Status von p23/p24-Komplexen verändert. p23 und p24, ein weiteres Mitglied aus der Familie der p24 Proteine (Stamnes *et al.*, 1995), kommen in verschiedenen oligomeren Formen vor (Füllekrug *et al.*, 1999; Gommel *et al.*, 1999; Marzioch *et al.*, 1999). Die Interaktion der Proteine wird dabei über coiled-coil Domänen gewährleistet und ermöglicht Zusammenlagerungen in verschiedenen Kombinationen (Belden & Barlowe, 1996; Gommel *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000). Im inaktiven Zustand liegen p23 und p24 als Homodimere in der Golgi-Membran vor. Nach Bindung von Arf1^{GTP} allerdings lagern sich p23 und p24 Homooligomere zu p23/p24 Heterooligomeren um. Dieser Prozeß aktiviert sie für die Rekrutierung von Coatomer-Untereinheiten (Nickel *et al.*, 2002). Der Komplex aus Arf1^{GTP} und p23/p24 Heterooligomeren induziert daraufhin die Rekrutierung der sieben cytosolischen COPI-Coatomer-Untereinheiten α -COP, β -COP, β' -COP, γ -COP, δ -COP, ϵ -COP und ζ -COP an die Golgi-Membran, die die äußere Proteinhülle des Vesikels bilden (Serafini *et al.*, 1991; Donaldson *et al.*, 1992b; Palmer *et al.*, 1993; Teal *et al.*, 1994; Kreis *et al.*, 1995, Denzel *et al.*, 2000). Die Untereinheiten liegen im Cytosol teilweise als präformierte Strukturen vor. α -COP, β' -COP und δ -COP, β -COP und δ -COP und γ -COP, δ -COP und ζ -COP stehen schon im Cytosol miteinander in Wechselwirkung und werden als Präkomplexe an die Golgi-Membran rekrutiert (Lowe & Kreis, 1996). Dabei interagiert Arf1^{GTP} durch zwei Bindungsstellen mit den Untereinheiten β -COP und γ -COP (Zhao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999), während die p23/p24-Komplexe über ihre cytoplasmatischen Anteile mit der γ -COP-Untereinheit wechselwirken (Harter & Wieland, 1998; Reinhard *et al.*, 1999). Dazu enthalten alle p24-Proteine in ihren cytoplasmatischen Domänen konservierte Sequenzmotive aus zwei Lysin-Resten (KK) oder Arginin-Resten (RR) und zwei Diphenylalanin-Resten (FF), die von γ -COP erkannt und gebunden werden. (Sohn *et al.*, 1996; Emery *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2004). Die Anlagerung von Coatomer-Proteinen wird ferner noch durch die Aktivierung der Phospholipase D durch Arf1^{GTP} erleichtert (Brown *et al.*, 1993). Aktivierte PLD katalysiert die Bildung von Phosphatidinsäure und Cholin aus Phosphatidylcholin und führt zur negativen Ladung bestimmter Regionen der Membran. An diese Regionen binden sich Coatomerproteine bevorzugt (Ktistakis *et al.*, 1996). Eine weitere wichtige Rolle im Prozeß der COPI-Vesikel Bildung spielen ArfGAP Proteine (Watson *et al.*, 2004). Sie interagieren mit vSNAREs, den Coatomer Untereinheiten β' -COP und γ -COP und Arf1^{GTP} (Goldberg, 1999; Rein *et al.*, 2002, McMahon & Mills, 2004). Sie leiten die Interaktion von Arf1 mit vSNAREs ein und stimulieren die Hydrolyse von GTP durch Arf1. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse unterliegt dabei einem komplexen Regulationsmechanismus. Ein wichtiger Parameter ist der Interaktionszustand von Arf1. Arf1^{GTP} alleine besitzt so gut wie keine GTPase Aktivität. Im Komplex mit ArfGAP erhöht sich die GTPase Aktivität um den Faktor 1000 und sie ist am größten, wenn Arf1^{GTP} mit ArfGAP und Coatomer interagiert (Goldberg, 1999). Zweiter wichtiger Faktor ist die Krümmung der Membran, verursacht durch die Anlagerung von Coatomer-Untereinheiten. Je stärker die Krümmung, desto schneller wird Arf1^{GTP} durch ArfGAP inaktiviert (Bigay

et al., 2003; Lippincott-Schwartz & Liu, 2003). Drittes Kriterium ist das Transportgut. Die Anwesenheit des passenden Transportguts führt zu einer negativen Rückkoppelung über die Coatomer-Untereinheiten auf die Aktivität von ArfGAP (Goldberg, 2000). Durch diese fein regulierten Mechanismen wird ein optimales Zeitfenster für die Abschnürung eines mit Transportgut beladenen COPI-coated Vesikels erreicht. Nach erfolgter GTP-Hydrolyse in Arf1 verläßt Arf-GAP die Coatomer-Hülle wieder, und am Ende aller Prozesse schnürt sich ein COPI-coated Vesikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 70 nm von der Golgi-Membran ab. Die Proteinhülle dissoziiert nach der GTP-Hydrolyse in Arf1 von dem Vesikel ab (Tanigawa *et al.*, 1993; Goldberg, 1999) und eröffnet die Möglichkeit des Verschmelzens des Vesikels mit der Zielmembran durch v-SNARE/t-SNARE-Interaktionen (Sanderfoot & Raikhel, 1999).

Genau wie für COPII-coated Vesikel wird die Verpackung von Transportgut in COPI-coated Vesikel über spezifische Sequenzmotive ausgelöst. Zum Beispiel spielen Motive aus zwei Lysinresten im C-Terminus von Transmembranproteinen eine wichtige Rolle. Die Motive KKXX und KXXXX werden von dem trimeren Subkomplex aus den Untereinheiten α -, β - und ϵ -COP (Cosson & Letourneur, 1994; Lowe & Kreis, 1995), bzw. von der γ -COP Untereinheit erkannt und gebunden. (Harter *et al.*, 1996; Harter & Wieland, 1998; Benghezal *et al.*, 2000; Contreras *et al.*, 2004). Ein anderes wichtiges Motiv, das die Verpackung in COPI-coated Vesikel begünstigt, besteht aus zwei Phenylalaninresten (FF) (Fiedler *et al.*, 1996; Sohn *et al.*, 1996). Die δ -COP Untereinheit erkennt bestimmte Motive mit aromatischen Aminosäuren (Cosson *et al.*, 1998) und interagiert über das Motiv WXXXW mit Dsl1p (Andag & Schmitt, 2003). Dsl1p ist ein zusätzlicher Rezeptor, der in Hefe die Verpackung von Proteinen in COPI-coated Vesikel ermöglicht. An der Rekrutierung von Transportgut ist ebenfalls ein K/HDEL-Rezeptor beteiligt. Dieser wird durch Bindung an ArfGAP in COPI-coated Vesikel eingelagert (Aoe *et al.*, 1999). Der Rezeptor erkennt die Sequenz K/HDEL im C-Terminus von ER-residenten Proteinen und sorgt für deren Rücktransport in das ER (Munro & Pelham, 1987). Ein entsprechendes Homolog des Rezeptors (ERD2) ist auch in Pflanzen vorhanden (Denecke *et al.*, 1992; Napier *et al.*, 1992).

2.13. Störungen im Vesikeltransport haben dramatische Auswirkungen auf die Morphologie des Golgi-Apparates.

Das Endoplasmatische Reticulum und der Golgi-Apparat erfüllen eine Vielzahl von Funktionen und sind mit einer unüberschaubaren Menge verschiedenster Moleküle ausgestattet. Allein am Golgi-Apparat finden sich mehr als 1.000 verschiedene Proteine (Wu *et al.*, 2000). Beide Kompartimente stehen in engem physiologischen Kontakt und tauschen ständig Material über COPII- und COPI-coated Vesikel miteinander aus. Einige integrale Membranproteine wie Mannosidasell, Galaktosyltransferase, SNAREs und Rezeptoren für Transportgut wie ERGIC53, p24-Proteine und K/HDEL-Rezeptoren zirkulieren dabei kontinuierlich zwischen beiden Organellen (Cole *et al.*, 1996; Presley *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2001).

Experimente mit Inhibitoren wie Brefeldin A, Exo1 oder Ilimaquinon (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Takizawa *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 2003) und die Expression mutierter Proteine, die eine Funktion im ER-Golgi-Transport wahrnehmen (Kuge *et al.*, 1994; Vasudevan *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 2001), haben gezeigt, daß Störungen im Vesikeltransport erhebliche Auswirkungen auf die Struktur des

Golgi-Apparates haben. Die beobachteten Phänotypen reichten dabei vom Zerfall des Golgi-Apparats in vesikuläre Strukturen, über den Verlust einzelner Golgi-Zisternen bis hin zur Resorption des kompletten Golgi-Apparats in das ER. Es wird heute angenommen, daß sich der Golgi-Apparat erst durch das koordinierte Zusammenwirken von COPII- und COPI-coated Vesikeln aus Material des Endoplasmatischen Reticulums entwickelt (Altan-Bonnet *et al.*, 2004). Ein genauestens regulierter Austausch von Transportvesikeln ist daher Grundvoraussetzung für den Erhalt der Integrität des Golgi-Apparates.

2.14. *Medicago truncatula* – eine Pflanze mit Modellcharakter für die genetische Forschung

Medicago truncatula fällt unter die große Gruppe der Leguminosen, die ca. 16.000 Arten in mehr als 650 Gattungen umfassen. Die Leguminosen bilden nach den Gräsern die zweitwichtigste Gruppe von Pflanzen mit wirtschaftlicher Bedeutung. Sie spielen eine wichtige Rolle für die menschliche Ernährung (z.B. Soja, Erdnüsse, Erbsen, Ackerbohnen) und als Futterpflanzen (z.B. Luzerne, Klee, Lupine), da sie einen zwei- bis dreifach höheren Proteingehalt als Getreide enthalten. Besonders geschätzt werden Leguminosen aber auch als Bodenverbesserer. Sie gehen Symbiosen mit Stickstoff-fixierenden Bodenbakterien der Gattung *Sinorhizobium* ein (Foucher & Kondorosi, 2000; Gage, 2004; Patriarca *et al.*, 2004) und sorgen so auf natürlichem Wege für einen hohen Stickstoffeintrag in den Boden (Lucinski *et al.*, 2002). Dieses Phänomen ist seit geraumer Zeit bekannt. Schon lange wurden Leguminosen als Zwischenfrüchte zur Düngung von Ackerflächen angebaut. So ist es auch nicht überraschend, daß sich die Forschung früh mit dem Thema auseinandersetzte und die ersten wissenschaftlichen Beschreibungen zur biologischen Stickstoffierung schon vom Ende des 19. Jahrhunderts datieren (Hellriegel, 1887; Hellriegel & Wilfarth, 1888). Daneben besitzen Leguminosen die zusätzliche Fähigkeit, Symbiosen mit Mykorrhizapilzen der Gattung *Glomus* einzugehen. Die Pilze können im Boden gebundenes Phosphat mobilisieren und der Wirtspflanze zur Verfügung stellen (Karandashov & Bucher, 2005). Mykorrhizierte Pflanzen zeigen daher besseres Wachstum auf phosphatarmen Böden und sind gleichzeitig resistenter gegenüber Pathogenbefall (Pozo *et al.*, 2002).

Als erste Pflanze mit Modellcharakter wurde *Arabidopsis thaliana* aus der Familie der Kreuzblüter (*Brassicaceae*) definiert. Bereits im Jahre 2000 konnte das gesamte Genom der Pflanze entschlüsselt werden (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). *Arabidopsis* nimmt allerdings, wie viele Brassicaceen, eine Sonderstellung im Pflanzenreich ein. Die Pflanze wird nicht von stickstofffixierenden Bakterien besiedelt und gehört zu den wenigen Vertretern, die keine Mykorrhizasymbiose etablieren können. Darüber hinaus sind Arabidopsissamen zwar ein gutes Modell für ölreiche Samen wie die des Rapses (*Brassica rapa*), lassen sich jedoch nicht mit den proteinreichen Samen der Leguminosen vergleichen. Aus diesen Gründen wurde nach einer Leguminose gesucht, die sich als Modell eignet. Die Wahl fiel dabei auf *Medicago truncatula*, eine Futterpflanze die im mediterranen Raum beheimatet ist und dort in einer großen Vielzahl verschiedener Ökotypen (290 polymorphe Populationen wurden vom INRA in Montpellier seit 1985 gesammelt) vorkommt (Barker *et al.*, 1990; Cook, 1999).

Abbildung 2.10. gibt einen Überblick über charakteristische Merkmale der Pflanze. Der geneigte Leser wird sich an dieser Stelle fragen: Warum ausgerechnet *M. truncatula* als Modell, wo doch andere Leguminosen eine viel größere wirtschaftliche Bedeutung einnehmen? Verwandte wie Luzerne und Klee eignen sich nicht als Modellpflanzen, da sie große Genome tragen und tetraploid und allogam (nicht selbstbefruchtend) sind, was ihre genetische Analyse extrem erschwert. *Medicago truncatula* hingegen besitzt ein nur kleines, diploides Genom (500-550 Mb), bestehend aus 2 x 8 Chromosomen und ist autogam (selbstbefruchtend). Zudem handelt es sich um eine einjährige Pflanze mit einer relativ kurzen Generationszeit. Stabil transgene Pflanzen lassen sich durch Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* und anschließende somatische Embryogenese gewinnen (Thomas *et al.*, 1992; Chabaud *et al.*, 2003). Daneben besteht auch die Möglichkeit zur transienten Transformation von Wurzeln mittels *Agrobacterium rhizogenes* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). *M. truncatula* kann mit Bakterien der Gattung *Sinorhizobium* stickstofffixierende Knöllchen ausbilden und wird durch Bodenpilze der Gattung *Glomus* mykorrhiziert. All diese Eigenschaften führten zur Auswahl von *Medicago truncatula* als Modellorganismus.



Abb. 2.10.: Die Modelleguminose *Medicago truncatula*. Die Pflanze ist ein Bodendecker und wird weltweit in gemäßigt heißen Zonen als Futtermittel angebaut. Oben links: Die Blätter sind dreiteilig gefiedert, wie es für kleeartige Pflanzen typisch ist. Im Zentrum jedes Blattes findet sich ein charakteristischer, dunkel purpurfarbener Fleck. Unten links: Die Pflanze entwickelt kleine gelbe Blüten. Die Form der Blüten spiegelt die Zugehörigkeit zur Familie der *Fabaceen* (Schmetterlingsblüter) wieder. Oben rechts: Stadien der Samenreifung. Die Samen entwickeln sich in spiralig gedrehten Kapseln, die nach ihrer Reifung austrocknen. Unten rechts: Fertige Samenkapseln bieten einen exzellenten Schutz. Sie sind sehr widerstandsfähig und mit einer Vielzahl von dornartigen Fortsätzen umgeben. Aufnahmen von M. Hahn, University of Georgia.

Bereits seit einiger Zeit wird *M. truncatula* intensiv genetisch untersucht. So wurden mittlerweile mehr als 200.000 EST-Sequenzen von *M. truncatula*, angezogen unter verschiedensten Bedingungen, erstellt und in entsprechenden Datenbanken hinterlegt. Zudem wird zur Zeit das gesamte Genom der

Pflanze durch ein Konsortium amerikanischer und europäischer Laboratorien sequenziert. Mit der Fertigstellung wird im Jahre 2007 gerechnet, aber bereits jetzt sind 523 BACs sequenziert und in der TIGR-Datenbank (<http://www.tigr.org/>) annotiert. Damit stehen ausgezeichnete Möglichkeiten zur Verfügung, ausgewählte Gene schnell zu isolieren und ihre Produkte im funktionellen Zusammenhang zu untersuchen. In dieser Arbeit galt dieses für Proteine, die eine Funktion im Vesikeltransport am Golgi-Apparat wahrnehmen.

2.15. Ziele der Arbeit

Der durch COPI-coated Vesikel vermittelte retrograde (rückwärtsgerichtete) Transport von Material zwischen dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Reticulum wird im tierischen System und in Hefen seit geraumer Zeit untersucht und ist mittlerweile gut charakterisiert. Entsprechende Erkenntnisse sind für Pflanzen hingegen kaum vorhanden. Insbesondere eine Untersuchung der am Vesikeltransport beteiligten Komponenten im lebenden System fehlte bis zum Beginn dieser Arbeit vollständig.

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand daher in einer Identifizierung von homologen Komponenten von COPI-coated Vesikeln für die Modellpflanze *Medicago truncatula* durch bioinformatische Analysen von EST-Datenbanken. Die Pflanze wäre damit die erste Leguminose, für die die Existenz von COPI-coated Vesikeln nachgewiesen werden könnte.

Das zweite Ziel bestand in einer *in vivo* Lokalisierung von strukturellen und regulatorischen Komponenten von COPI-coated Vesikeln, um ein Modell für deren Funktion in Pflanzen erstellen zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Bakterien-, Pflanzen- und Pilzspezies

3.1.1. Bakterienstämme

Stamm	genetische Eigenschaften	Publiziert durch
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' proA⁺B⁺, lacI^q lacZDM15 Tn10 (tet^r)</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21 DE3	<i>F' ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ (tet^r) gal (DE3) endA Hte</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> DB3.1	<i>F⁻, gyrA462 endA1 D(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rbsL20(Sm^r) xyl-5 λ⁻ leu mtl-1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> Dh5α	<i>F⁻ deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1.</i>	Hanahan, 1983
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ArQua1	Sm ^r -derivative of strain R1000 R1000 = derivative of strain A4T (White <i>et al.</i> , 1985)	Quandt <i>et al.</i> , 1993
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	"Wildtyp", Sm ^r , EPSI ⁺ , NOD ⁺ , FIX ⁺	Casse <i>et al.</i> , 1979

Tab. 3.1. Verwendete Bakterienstämme und ihre genetischen Eigenschaften

3.1.2. Pflanzenspezies

Medicago truncatula cv. Jemalong

(Purkiss Seeds, P.O. Box 286, Armidale 2350, NSW Australia)

3.1.3. Pilze

Glomus mosseae BEG 12 Granulat

(Biorize Company, 8 rue Sainte Anne, 21000 Dijon-France)

3.2. Medien

3.2.1. Bakterienmedien

LB-Medium (Luria-Bertani Broth, Sambrook *et al.*, 1989)

10 % Trypton, 5 % Hefeextrakt, 5 % NaCl, pH 7,4

LBG-Medium (Luria-Bertani Broth mit Glucose)

10 % Trypton, 5 % Hefeextrakt, 5 % NaCl, 1 % Glucose, pH 7,4

PA-Medium

1,75 % Antibiotic-Medium No. 3

SOC-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2,0 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂

YEP-Medium

Bacto-Pepton 10 % (w/v), Hefeextrakt 5 % (w/v), NaCl 5 % (w/v), pH 7,0

Alle aufgeführten Medien werden mit Millipore-Wasser angesetzt und autoklaviert.

3.2.1. Pflanzenmedien**modifiziertes Hoagland Medium (PO₄³⁻-reduziert) für Mykorrhizierungsexperimente**

Auf 1 Liter Millipore Wasser:

5 ml 1,0 M KNO₃

+ 5 ml 1,0 M Ca(NO₃) x 4 H₂O

+ 2 ml 0,5 M MgSO₄ x 7 H₂O

+ 1 ml Mikronährelemente (1000 x)

(+ 1 ml 1 M KH₂PO₄) für nicht PO₄³⁻-reduziertes Medium

Mikronährelemente (1000 x):

50,0 mM KCl

25,0 mM H₃BO₃

5,0 mM MnSO₄ x H₂O

2,0 mM ZnSO₄ x 7 H₂O

0,5 mM CuSO₄ x 5 H₂O

0,014 mM (NH₄)₆MoO₂₄ x 4 H₂O

40,0 mM Fe-EDTA

0,1 mM CoSO₄ x 7 H₂O

Pflanzenmedium nach Rolfe et al. (1980), N₂-reduziert, für Nodulationsexperimente

Die Stammlösungen A, B1, B+B₁, C und D werden mit Millipore angesetzt und autoklaviert. Zur Herstellung von 1 L Medium werden 15 g Pflanzenagar Nr. 1 (Oxoid) in 1 L Millipore autoklaviert und

anschließend mit je 0,5 ml der Lösungen A, B+B₁, C und D, sowie 1 ml der Lösung B1 versetzt. Die Platten werden auf einer um ca. 15° geneigten Oberfläche gegossen.

Salzlösung	Menge/L	Substanz	g/L
Lsg. A	0,5ml/l	CaCl ₂	294
Lsg. B + B ₁	0,5ml/l	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	150/50
Lsg. B ₁	1,0ml/l	K ₂ HPO ₄	116
Lsg. C	0,5ml/l	Fe-Citrat	6,7
Lsg. D	0,5ml/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O	123
		K ₂ SO ₄	87
		MnSO ₄ ·H ₂ O	0,338
		H ₃ BO ₃	0,247
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,288
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1
		CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,056
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,048

Tab. 3.2. Inhaltsstoffe der Lösungen A, B, + B₁, B₁, C und D, die zur Herstellung von Pflanzenmedium für Nodulationsexperimente genutzt wurden.

3.2.2. Medienzusätze

Agar

Für alle Bakterienmedium werden 20 g Select-Agar pro Liter Flüssigmedium verwendet.

Für Pflanzenmedien wird 15 g Agar No.1 (Oxid) pro Liter verwendet.

Antibiotika

Verwendete Antibiotikakonzentrationen in [µg/ml]

Für die Selektion von *E. coli*-Zellen:

Ampicillin (Amp) 100, Kanamycin (Km) 50, Chloramphenicol (Cm) 25, Gentamycin (Gm) 25

Für die Selektion von *A. rhizogenes*-Zellen:

Streptomycin (Sm) 600, Kanamycin (Km) 50, Rifampicin (Rif) 5

X-Gal und IPTG zur „Blau-Weiß-Selektion“ auf *lacZ*'-Inaktivierung

X-Gal-Lösung: 408,6 mg/ml in 10 ml N-N'-Dimethylformamid sterilfiltriert

IPTG-Lösung: 238,3 mg/ml in 10 ml H₂O sterilfiltriert

3.3. Verwendete Primer und Plasmide

3.3.1. Primer

Primer	Sequenz (5'-3')
Arf up	5'-GATGTCGGGGTCAGGAC-3'
Arf lo	5'-TTGGAAGATCTTGTGGTTAGCA-3'
<i>MtArf1</i> 5' RACE	5'-GGAAGATCTTGTGGTTGCAAAAAC-3'
<i>MtArf1</i> 3' RACE	5'-TGTCGGGGTCAGGACAAGAT-3'
Adaptor primer 1 (AP1)	5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
<i>MtArf1</i> up	5'-ATGGGGTTAACGTTACGAAG-3'
<i>MtArf1</i> lo	5'-TTATGCCTTGCTTGCAATGTTG-3'
<i>MtArf1</i> BamHI up	5'-GGATCCATGGGGTTAACGTTACGAAG-3'

<i>MtArf1</i> EcoRI lo	5' GAATTCTCACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTATTGCCTTGCTTGCA-ATGTTGTTAGAAAGC-3'
MtZeta1 BamHI up	5'-GGATCCATGGCATCCAACGGCTTGTGTCCTTC-3'
MtZeta1 EcoRI lo	5' GAATTCTCACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTGTTAAAAGAG-TTCTTGTAAGTGTGTC-3'
MtZeta2 BamHI up	5'-GGATCCATGTCTCCTTCCAAACTCGAGTTGAACCC-3'
MtZeta2 EcoRI lo	5' GAATTCTCACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTTTTAAAGAAGG-GATCTTGCAAGATGTTCC-3'
T31N up	5'-AAGA A TACTATTTTGTATAAATTGAAGCTTGGAGAA-3'
T31N lo	5'-TAGTATTCTTACCAGCCGCATCGAGA-3'
Q71L up	5'-GGGATGTCGGGGG T TTGGACAAGATCCGCC-3'
Q71L lo	5'-GGGCGGATCTTGTCC A AACCCCGACATCCC-3'
GFP BamHI up	5'-GGATCCAAAAAATGCATAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG-3'
GFP BamHI lo	5'-GGATCCCCCATCCTTTTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'
GFP SacI lo	5'-GAGCTCTCACCCATCCTTTTTGTATAGTTCATCCAT -3'
Arf1 XbaI up	5'-TCTAGAAAAAAATGGGGTTAACGTTACGAAG-3'
Arf1 BamHI lo	5'-GGATCCTGCCTTGCTTGCAATGTTGTTAG-3'
Zeta1 XbaI up	5'-TCTAGAAAAAAATGGCATCCAACGGCTTGTGTCCTTC-3'
Zeta1 XbaI lo	5'-TCTAGATGTTAAAAGAGTTCTTGTGAAAGTGTGTC-3'
Zeta2 XbaI up	5'-TCTAGAAAAAAATGTCTCCTTCCAAACTCGAGTTGAACCC-3'
Zeta2 BamHI lo	5'-GGATCCTTTAAGAAGGGATCTTGCAAGATGTTCC-3'
35S EcoRI up	5'-GAATTCAGATTAGCCTTTTCAATTTTCAAGA-3'
NOS Sall lo	5'-GTCGACGATCTAGTAACATAGATGACACC-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAG-3'
T7term	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
M13	5'-AGTCACGACGTTGTA-3'
M13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tab. 3.3. In dieser Arbeit Verwendete Primer. Die fett markierten Nukleotide führen Aminosäureaustausche in die Sequenz von *MtArf1* ein. up: "upper" oder "sense" Primer, lo: "lower" oder "antisense" Primer.

3.3.2. Plasmide

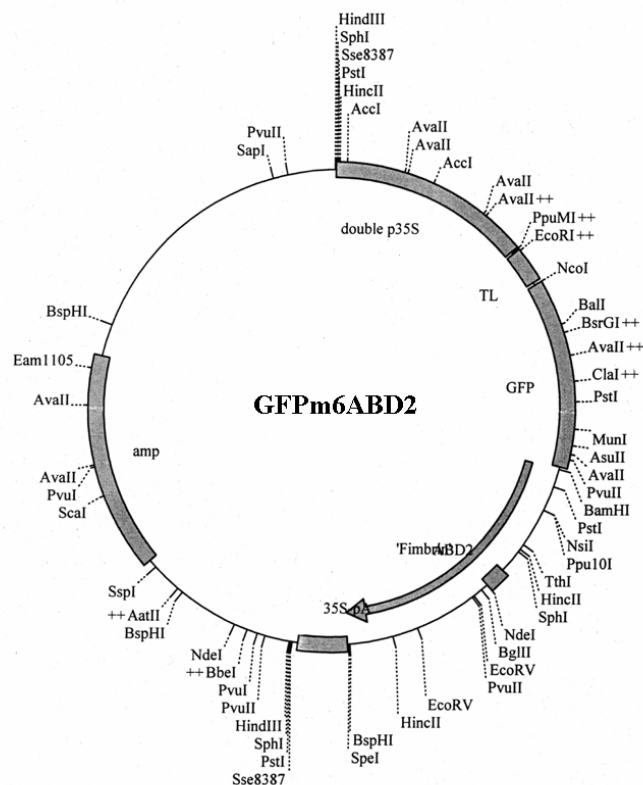


Abb. 3.1. Vektorkarte von GFPm6ABD2. GFPm6ABD2 ist ein Pflanzentransformationsvektor, der Ampicillin-Resistenz (*amp*) zur Selektion in Bakterien vermittelt und zwischen left- und right border eine Expressionskassette bestehend aus einem doppelten 35S Promotor, einem Translationsenhancer (TL) und einem 35S Terminator enthält. In die Expressionskassette sind ein mGFP6-Gen und eine Aktin-Bindedomäne (ABD2) des Aktin-bindenden Proteins Fimbrin kloniert.

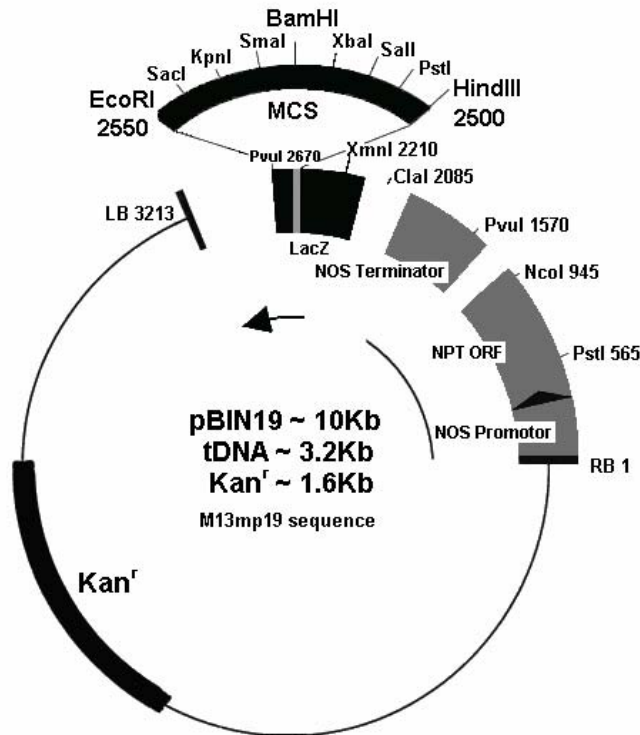


Abb. 3.2. Vektorkarte von pBIN19. pBIN19 ist ein Pflanzentransformationsvektor, der Kanamycin-Resistenz (*Kan^r*) zur Selektion in Bakterien vermittelt. Zwischen left- und right border enthält der Vektor einen NOS (Nopaline Synthase)-Promotor, ein Gen, das für Neomycinphosphotransferase (NPT) kodiert und einen NOS (Nopaline Synthase)-Terminator. Die Aktivität der Neomycinphosphotransferase verleiht transgenen Pflanzen Resistenz gegenüber Kanamycin. Weiterhin befindet sich eine multiple cloning site (MCS) in einem LacZ-Gen zwischen left- und right border, die das Einklonieren von Expressionskassetten erlaubt. Das LacZ-Gen erlaubt die Identifizierung positiver Klone durch Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/XGal-haltigen Agarplatten.

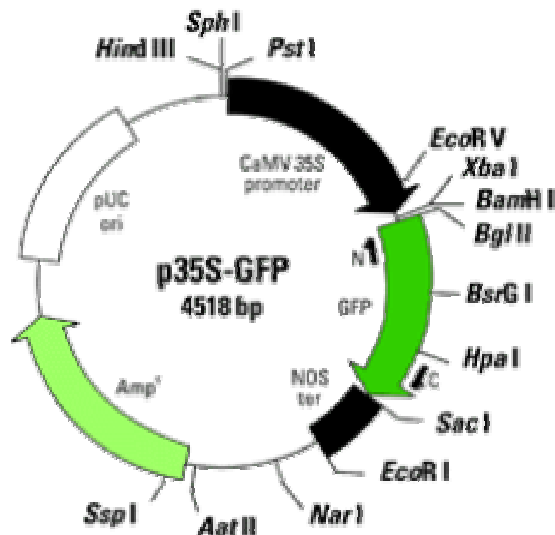




Abb. 3.3. Vektorkarte und multiple cloning site (MCS) von p35S-GFP. Der Vektor enthält einen pUC-Origin, ein Gen, das Ampicillin-Resistenz vermittelt (Amp^r), sowie eine 35S-Promotorkassette. Die Kassette umfaßt einen 35S Promotor, eine MCS bestehend aus den Schnittstellen für XbaI, BamHI und BglII, ein eGFP-Gen und einen NOS-Terminator.

Plasmid	Herkunft
pET32a(+)	Novagen™
pET24a(+)	Novagen™
pBIN19	Prof. Staiger, Lehrstuhl für Molekulare Zellphysiologie, BioVIII, Universität Bielefeld
GFPm6ABD2	Boris Voigt, Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik, Zellbiologie der Pflanzen, Universität Bonn
ST-GFP	Prof. Chris Hawes, Plant cell biology and microscopy, Oxford Brookes University, Headington Campus, Gipsy Lane, Oxford OX3 0BP
pGEM-Teasy	Promega™
p35S-GFP	Clontech™
pGEM-MtArf1	diese Arbeit
pGEM-MtArf1 Q71L	diese Arbeit
pGEM-MtArf1 T31N	diese Arbeit
pGEM-Mt ζ -COP1	diese Arbeit
pGEM-Mt ζ -COP2	diese Arbeit
pGEM-Mt ϵ -COP2	diese Arbeit
pET24a(+)MtArf1	diese Arbeit
pET24a(+)MtArf1 Q71L	diese Arbeit
pET24a(+)MtArf1 T31N	diese Arbeit
pET24a(+)Mt ζ -COP1	diese Arbeit
pET24a(+)Mt ζ -COP2	diese Arbeit
pET32a(+)mGFP6	diese Arbeit
pET24a(+)MtArf1::mGFP6	diese Arbeit
pET24a(+)MtArf1 Q71L::mGFP6	diese Arbeit
pET24a(+)MtArf1 T31N::mGFP6	diese Arbeit
pET24a(+)Mt ζ -COP1::mGFP6	diese Arbeit
pET24a(+)Mt ζ -COP2::mGFP6	diese Arbeit
p35S-mGFP6	diese Arbeit
p35S-MtArf1::mGFP6	diese Arbeit
p35S-MtArf1 Q71L::mGFP6	diese Arbeit
p35S-MtArf1 T31N::mGFP6	diese Arbeit
p35S-Mt ζ -COP1::mGFP6	diese Arbeit
p35S-Mt ζ -COP2::mGFP6	diese Arbeit
pBin19-mGFP6	diese Arbeit
pBin19-MtArf1::mGFP6	diese Arbeit
pBin19-MtArf1 Q71L::mGFP6	diese Arbeit
pBin19-MtArf1 T31N::mGFP6	diese Arbeit
pBin19-Mt ζ -COP1::mGFP6	diese Arbeit
pBin19-Mt ζ -COP2::mGFP6	diese Arbeit

Tab. 3.4. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Angabe zu ihrer Herkunft.

3.4. Anzucht von Bakterien und Pflanzen

3.4.1. Anzucht von *Medicago truncatula* cv. Jemalong

Oberflächensterilisation von *M. truncatula*-Samen

- Boden eines möglichst großen Erlenmeyer-Kolbens gerade mit Samen bedecken
- Samen für 12 min in konzentrierter Salzsäure schütteln
- Säure abschütten und zur Neutralisierung mindestens 5 x mit sterilem H₂O waschen
- H₂O möglichst vollständig abgießen und Samen unter der Sterilbank trocknen lassen

Anzucht von Keimlingen für Transformationsversuche

- Ca. 50 oberflächensterilisierte Samen auf einer Pflanzenagarplatte mit Hoagland-Medium für zwei Tage bei RT im Dunkeln keimen lassen (bei hohen Temperaturen im Sommer ist das Vernalisieren der Samen über Nacht im Kühlschrank zu empfehlen)
- Nach zwei Tagen je 10 Keimlinge auf einer Pflanzenagarplatte parallel auslegen, so daß die Wurzeln in jeweils gleicher Richtung orientiert sind
- Anzucht der Pflanzen in aufrecht gestellten Agarplatten bei 25°C, 200 µE/m²*s, 65% Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkelheit.

Anzucht von Keimlingen für die Induktion von Wurzelknöllchen

- Oberflächensterilisierte Samen auf (Rolfe *et al.*, 1980) für 2 Tage bei RT im Dunkeln keimen lassen
- Nach zwei Tagen Keimlinge auf Agarplatten mit N₂-reduzierten Pflanzenmedium parallel auslegen
- 1,5 ml stationäre Kultur von *S. meliloti* 2011 in Zentrifuge bei 10.000 g pelletieren, Medium verwerfen und Bakterienpellet in 1,5 ml sterilen PBS-Puffer (siehe Western-Blot) resuspendieren
- *M. truncatula*-Keimlinge im Bereich der Wurzeln mit jeweils ca. 50 µl Bakteriensuspension inokulieren
- Agarplatten mit Parafilm umwickeln, den im Bereich zwischen Deckel und Boden der Petrischalen mehrfach mit einem Skalpell durchstechen, um Gasaustausch zu ermöglichen.
- Anzucht aufrecht gelagert für 21 Tage bei 25°C, 200 µE/m²*s, 65% Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkelheit.
- Knöllchen mit einer sterilen Pinzette „ernten“, sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren, bei -80 °C lagern.

Anzucht von *Medicago truncatula* in Erde

- 3 Tage alte Keimlinge in Erde pikieren und in einer Klimakammer unter folgenden Bedingungen anziehen: 25°C, 200 µE/m²*s, 65% Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkelheit
 - Nach Bedarf mit Wasser gießen
-

Behandlung mit Hefeelicitor

- Pflanzen mit 100 mg/ml Hefeelicitor (3.10.1) in MS-Medium plus 5 µl/ml Silwet-L 77 besprühen (Lehle Seeds, PO box 2366, Round Rock TX 78680, USA)
- 25 h inkubieren lassen

Anzucht von *Medicago truncatula* in Perlit/Vermiculite zur Mykorrhizierung

- Perlit und Vermiculite (Ø 3 mm) 1:2 mischen und autoklavieren.
- Das Gemisch in oberflächensterilisierte Pflanzgefäße füllen, die mit einem Deckel verschlossen werden können. Zur Sterilisierung die Gefäße mit 70 % Ethanol gewaschen und unter einer Sterilbank trocknen
- Nach Wässerung des Substrats mit einer sterilisierten Pinzette Vertiefungen schaffen und dort hinein Mykorrhiza-Inokulat (*Glomus mosseae* BEG12, Biorize Company) schütten
- Auf sterilen Hoagland(PO₄³⁻-freien)-Pflanzenagarplatten gekeimte *M. truncatula* Setzlinge inmitten des Mykorrhiza-Inokulats setzen
- Pflanzen in einer Klimakammer bei 25°C, 200 µE/m²*s, 65% Luftfeuchte und 16 h Licht/8 h Dunkelheit anziehen
- Pflanzen nach Bedarf mit sterilem, PO₄³⁻-freien Hoagland-Medium gießen

3.4.2. Färbung von Wurzeln zum Nachweis auf Mykorrhizierung (Gange et al., 1999)

Ein Nachweis zur Mykorrhizierung von Pflanzenwurzeln kann nur über das Anfärben von Pilzstrukturen und eine anschließende mikroskopische Analyse geführt werden. Im ungefärbten Zustand können maximal extraradikale Hyphen nachgewiesen werden, Pilzstrukturen in der Wurzel zeichnen sich jedoch nicht von den umgebenden Pflanzenzellen ab. Die Anwesenheit von extraradikalen Hyphen alleine läßt jedoch keine Aussage über die Kolonisierung der Pflanzenwurzel zu, da Hyphen oftmals nicht in die Wurzel eindringen und diese nur oberflächlich besiedeln. Mittels Farbstoffen wie Trypan Blue, Chlorazol Black E, Lactophenolblau oder saures Fuchsin lassen sich Strukturen des Pilzes wie Hyphen, Vesikel und Arbuskeln selektiv, auch innerhalb der Wurzel, anfärben und mikroskopisch erfassen.

- Mykorrhizierte Wurzeln in kleine Stücke von ca. 1 cm Länge schneiden
- Wurzeln über Nacht in FAA fixieren
- 35 min bei 90°C in 10% KOH inkubieren
- mit H₂O spülen
- in 0,03 % CBE 60 min bei 90 °C färben
- 10 min bei RT in 3,7% HCl ansäuern
- mit H₂O spülen
- in 0,01 % AF oder 0,005 % TB für 30 min färben
- oder 90 min bei RT mit Lactophenolblau färben
- mit 50 % Lactat entfärben

FAA-Fixierlösung

45,85 % (v/v) H₂O, 45,85 % (v/v) Ethanol, 6 % (v/v) Formaldehyd, 2,3 % (v/v) Eisessig

CBE-Färbelösung

0,03 % (w/v) Chlorazol Black E, $\frac{1}{3}$ (v/v) Glycerin, $\frac{1}{3}$ (v/v) H₂O, $\frac{1}{3}$ (v/v) Lactat

AF-Färbelösung

0,01 % (w/v) Acid Fuchsin, 87,5 % (v/v) Lactat, 6,3 % (v/v) Glycerin, 6,3 % (v/v) H₂O

TB-Färbelösung

0,005 % (w/v) Trypan Blue, 50 % (v/v) Glycerin, 49,95 % (v/v) H₂O, 0,05 % (v/v) HCl

3.4.3. Anzucht und Konservierung von Bakterien

Anzucht von *E. coli*

- *E. coli*-Zellen in LB-Flüssigmedium im Roller oder auf LB-, bzw. PA-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika über Nacht bei 37 °C anziehen
- Den Bakterientiter photometrisch durch Messen der Zelldichte bei 580 nm ermitteln. Eine optische Dichte (o.D.₅₈₀) von 0,1 entspricht einem Titer von 2×10^7 *E. coli*-Zellen pro ml

Anzucht von *Sinorhizobium meliloti* und *Agrobacterium rhizogenes*

- Bakterien in YEP-Flüssigmedium oder auf YEP-Agarplatten mit gewünschten Antibiotika bei 28 °C über Nacht inkubieren.
- Die notwendige Inkubationszeit kann sich unter Umständen auf bis zu drei Tage verlängern (z.B. bei elektroporierten *A. rhizogenes*-Zellen)
- Den Bakterientiter photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 580 nm ermitteln. Eine optische Dichte (o.D.₅₈₀) von 0,1 entspricht einem Bakterientiter von 1×10^8 Zellen

Konservierung von Bakterien

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien in SM-Puffer mit Glycerin eingefrieren.

- 1,5 ml einer über Nacht bei 37 °C gewachsenen Bakterienkultur für 30 sec mit 8.000 g pelletieren
- Überstand abziehen, Pellet im Rücklauf durch Vortexen lösen
- 750 µl SM-Puffer mit Glycerin zugeben
- bei -20°C lagern

SM-Puffer

10 mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5

1:4 mit sterilem Glycerin (87 %) mischen

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Proteinextraktion aus Pflanzengewebe

- Alle notwendigen Materialien (Mörser, Pistill, Plastikgefäße) mit flüssigem Stickstoff vorkühlen
-

- Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gründlich mörsern
- Extraktionspuffer zugeben und in vorgekühltes Zentrifugationsgefäß überführen
- 15 min bei 4°C mit 12.000 g zentrifugieren
- Pellet verwerfen
- Proteinkonzentration im Überstand mittels BioRad Protein-Assay (3.5.2) messen
- Den Überstand am besten frisch verwenden, ansonsten bei -70°C einfrieren

Extraktionspuffer

50 mM HEPES pH 7,2, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc, 1 mM o-Vanadat, 10 mM NaF, 75 mM NaCl

+ 200 µl Proteaseinhibitor-Cocktail auf 5 ml Puffer (Complete™ Mini, Roche, Kat. Nr. 1836153)

3.5.2. Gesamtproteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration kann der BioRad Protein-Assay verwendet werden. Der Nachweis basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 in Gegenwart von Proteinen von 465 nm auf 595 nm. Die o.D.595 ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration.

- 5 – 50 µl proteinhaltige Lösung mit H₂O auf 800 µl auffüllen und 0,2 ml BioRad-Konzentrat hinzugeben
- Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 595 nm und Vergleich der Absorption mit einer geeigneten Eichkurve

3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli (1970))

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen Gel aus Polyacrylamid. Für die Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen und Elektrophoreseläufe wurde ein SDS-PAGE-System der Firma Hoefer verwendet.

Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

- Glasplatten, Aluminiumoxid-Platten, Probenkämme und Spacer mit Ethanol säubern
- Material auf einem Gießstand („Mighty small SE 245 Dual Gel Caster“) zusammenbauen ⇒ Gelkassette
- Trenngel-Lösung ansetzen und bis ca. 0,5 cm unterhalb der Zähne der Probenkämme einfüllen
- Gellösung sofort mit Millipore-Wasser überschichten
- Nach Auspolymerisieren des Gels Wasser abgießen und Restflüssigkeit entfernen
- Sammelgellösung ansetzen, auf das Trenngel gießen und Probenkamm einsetzen

Auftragen von Proben und Elektrophoreselauf

- Gelkassette mittels Klammern in Elektrophoreseeinheit („2050 Midget“) befestigen
 - SDS-Elektrophorese-Puffer in oberen und unteren Pufferbehälter gießen
-

- Luftblasen unter der Gelkassette entfernen
- 5-10 µl Probe pro Tasche auftragen
- Elektrophoreselauf mit 60-100 V durch das Sammelgel und mit 150-180 V durch das Trenngel bis die BPB-Front das untere Ende der Gelkassette erreicht hat
- Nach Beendigung des Laufes Gelkassette aus der Laufkammer entfernen und mit Hilfe der Spacer vorsichtig öffnen, Gel zum Färben oder zur Western-Blot-Analyse verwenden

Trenngellösung (12 %)

12 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (Rothiphorese Gel 30, Fa. Roth), 3,75 ml 3 M Tris-HCl pH 8,8, 0,3 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung, 0,23 ml 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat(APS)-Lösung, 13,7 ml Millipore, 20 µl TEMED

Sammelgellösung

2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung, 5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,2 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung, 0,25 ml 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat(APS)-Lösung, 12,2 ml Millipore, 25 µl TEMED

SDS-Elektrophorese-Puffer

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
Die Lösung kann als 10 x Puffer angesetzt werden

SDS-Probenpuffer (5x)

320 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (BPB)

3.5.4. Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie

Färbung mit Coomassie-Blue R250

- Gel in einer Schale mit Coomassie-Färbelösung für 1 h bei RT schütteln
- Färbelösung abgießen und Entfärbe-Lösung zugeben
- Gel über Nacht bei RT unter Schütteln entfärben lassen, die Entfärbe-Lösung mehrfach wechseln
- Gel zur Dokumentation einscannen oder trocknen

Coomassie-Färbelösung

250 ml Methanol, 70 ml Eisessig, 680 ml Millipore, 1 g Coomassie-Blue R250
Coomassie-Pulver unter stetigem Rühren gründlich lösen, Lösung anschließend durch Faltenfilter filtrieren

Coomassie-Entfärbelösung

250 ml Methanol, 70 ml Eisessig, 680 ml Millipore

Konservierung von SDS-Polyacrylamid-Gelen durch Trocknen

Zur Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde das „DryEasy“-System der Firma Novex (jetzt Invitrogen) verwendet.

- Gel für mindestens 10 min in 10 % (v/v) Glycerin inkubieren
- Cellophan-Folien in 10 % (v/v) Glycerin einweichen
- Trocknungsrahmen nach Anleitung zusammenbauen, dabei das Gel zwischen den Cellophan-Folien möglichst luftblasenfrei fixieren

Gel für mindestens zwei Tage bei RT trocknen lassen

3.5.5. Western-Blot

Für den Western-Blot von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen wurde das sogenannte „Tank-Blot-Verfahren“ genutzt.

Zusammenbau des Tank-Blots

- SDS-Polyacrylamidgel für mindestens 10 min in Puffer TB schwenken
- PVDF-Membran zurechtschneiden, für 1 min in Methanol aktivieren, anschließend in Puffer TB waschen
- Whatman-Blotting-Papier zurechtschneiden und mit Puffer TB vollsaugen lassen
- In Sandwich-Bauweise folgende Komponenten in vorgesehener Halterung zusammenschichten: 2 Whatman-Blotting-Papiere, PVDF-Membran, SDS-Polyacrylamidgel, 2 Whatman-Blotting-Papiere
- Blotting-Sandwich in Tank-Blot-Apparatur (TE Series Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer) einsetzen, dabei unbedingt auf die Orientierung achten. Die PVDF-Membran muß in Richtung Anode orientiert sein.
- Blot-Apparatur bis zum Eichstrich mit Puffer TB füllen und mit Deckel verschließen
- Für mindestens 90 min bei 120 V blotten lassen
- TB-Lösung (falls notwendig) durch Rühren durchmischen, um eine Überhitzung des Puffers zu vermeiden

TB-Puffer (10 x)

500 mM Tris-HCl, 500 mM Borsäure

3.5.6. Immunologische Detektion geblotteter Proteine

- Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen PVDF-Membran in PBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT inkubieren
 - Membran mindestens 3 x für je 10 min mit PBS mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver waschen
 - Membran mit Primärantikörper in PBS mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubieren
 - 4 x mit PBS mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver waschen
-

- Membran mit Sekundärantikörper in PBS mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT inkubieren
- 4 x mit PBS ohne Magermilchpulver waschen
- Membran in Diaminobenzidin (DAB)-Lösung inkubieren, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind
- DAB-Färbereaktion durch Waschen mit Wasser abstoppen
- Membran trocknen und zur Dokumentation einscannen

Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung

1 DAB Tablette in 15 ml Millipore lösen, unmittelbar vor der Farbreaktion 12 µl 30 % H₂O₂ hinzugeben

PBS-Puffer (10 x)

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, pH 7,4

3.5.7. Antikörper

Bei der Firma Eurogentec wurde die Herstellung eines peptidspezifischen Antikörpers gegen Mt ζ -COP in Auftrag gegeben. Dazu wurde von der Firma ein Peptid synthetisiert, für das eine hohe Antigenizität prognostiziert wurde und in Kaninchen injiziert. Durch Affinitätschromatographie an einer mit dem Peptid beladenen Säule wurde der Antikörper aus dem isolierten Serum aufgereinigt.

Primärantikörper

- Peptidspezifischer Antikörper gegen Mt ζ -COP
Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Peptidsequenz:
H₂N-CKYYSDDWPTNSSKLA-CONH₂
Der Antikörper kann 1:2000 verdünnt angewandt werden
- Anti-FLAG IgG aus Maus, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
Monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Sigma, Kat. Nr. A 2220)
Kann 1:5000 verdünnt angewandt werden

Sekundärantikörper

- Anti-Kaninchen IgG aus Esel
Monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
Kann 1:5000 verdünnt angewandt werden (ABR, Kat. Nr. SA1-200)

3.5.8. Massenspektroskopie nach Trypsin-Verdau

Probenvorbereitung

- Vorgespülte Eppendorf-Gefäße benutzen
 - Gel scannen und ausdrucken
 - Auszuschneidende Spots markieren
-

- Auf Folie Banden mit sauberem Skalpell ausschneiden
- Zu jeden Gelstück 250 µl 50% Acetonitril/ 50% H₂O zugeben
- 5 min schütteln
- Überstand verwerfen
- 250 µl 50% Acetonitril/ 50 mM NH₄CO₃ zugeben
- 30 min schütteln
- Überstand verwerfen
- 250 µl 50% Acetonitril/ 10 mM NH₄CO₃ zugeben
- 30 min schütteln
- Überstand verwerfen
- Trocknen der Gelstücke unter Vakuum in der SpeedVac

Vorspülen von Eppendorf-Gefäßen

- Gefäße 2 mal mit 500 µl 0,1 % TFA/ 60% Acetonitril (davon einmal über Nacht) vorspülen

Trypsin-Verdau

- Zu jeder Probe mit 2 µl aktiviertes Trypsin und 15 µl 10 mM NH₄HCO₃ geben
- 5 min bis 10 min inkubieren
- 20 µl 10 mM NH₄HCO₃ zugeben
- 24 h bei 37°C inkubieren
- Proben können bei -20°C gelagert werden

Aktivierung von Trypsin

- Trypsin (Promega, Kat. Nr. V5111) in mitgeliefertem Puffer lösen
- Für 15 min bei 30°C inkubieren

Probenmessung

- MALDI-TOF durch Messung der Standardsubstanzen AngiotensinII, Substance P und ACTH kalibrieren
- 2 µl Probe mit 2 µl Matrixlösung mischen
- auf Probenträger aufbringen und trocknen lassen
- Messung im positiv-Modus

Matrixlösung

Gesättigte Lösung von α-Cyanohydroxymizsäure in 60% Acetonitril, 0,1% TFA, H₂O

3.6. Methoden zur heterologen Expression von Proteinen in *E. coli*

3.6.1. Heterologe Expression von FLAG-Fusionsproteinen

In dieser Arbeit wurden alle zu untersuchenden Proteine C-terminal mit einem FLAG-Tag fusioniert. Das FLAG-Epitop ist ein saures Oktapeptid der Sequenz DYKDDDDK, das als Marker für heterolog

exprimierte Proteine dient. Die Fusionen wurden in den Expressionsvektor pET24a(+) (Novagen) kloniert und heterolog im *E. coli*-Stamm BL21 DE3 exprimiert. Die exprimierten Fusionsproteine können mittels Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines Anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen werden. Des Weiteren steht ein System zur affinitätschromatographischen Reinigung der Fusionsproteine zur Verfügung. Die Chromatographie beruht auf einer Anti-FLAG-Matrix, an die sich das Fusionsprotein über seinen FLAG-Anteil bindet. Die Elution erfolgt entweder durch einen Überschuss an FLAG-Peptid oder unter sauren Bedingungen.

Anzucht und Induktion der Bakterien

- 10 ml LB-Flüssigmedium mit 10 µl Kanamycin (50 mg/ml) versetzen
- Mit 50 µl Bakterien aus Glycerinkultur beimpfen
- Über Nacht bei 37 °C im rollend in einem Brutschrank inkubieren
- Überimpfen von 1 ml Kultur in 10 ml frisches LB-Medium mit 1 mM IPTG, als Kontrolle LB-Medium ohne IPTG beimpfen
- 4 h bei 37 °C rollend inkubieren. Nach jeder Stunde 1 ml Kultur entnehmen und in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 99 °C kochen
- Proteinextrakte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auftrennen und durch Western-Blot auf Expression der Fusionsproteine testen

3.6.3. Affinitätschromatographische Reinigung von heterolog exprimierten FLAG-Fusionsproteinen

Anzucht und Induktion der Bakterien zur Aufreinigung von Fusionsproteinen

- 10 ml LB-Flüssigmedium mit 10 µl Kanamycin (50 mg/ml) versetzen
- Mit 50 µl Bakterien aus Glycerinkultur beimpfen
- Über Nacht bei 37 °C im rollend in einem Brutschrank inkubieren
- 250 ml LB-Flüssigmedium in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 3-5 ml Übernachtskultur beimpfen
- Inkubation bei 25 °C in einem Kolbenschüttler bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 (logarithmische Wachstumsphase)
- Induktion der Kultur durch Zugabe von 1 mM IPTG
- Inkubation für weitere 4 h bei 25 °C im Schüttler
- Bakterien bei 4.500g für 10 min bei 4°C pelletieren
- Lagerung bei -20°C für 1 Tag, bzw. -80°C für 4 Tage lagern

Aufreinigung der Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie

- Bakterienpellet aus 1000 ml Kultur in 26 ml Extraktionspuffer resuspendieren
 - Für 20 min bei RT inkubieren
 - 3 x 30sec Ultraschallbehandlung (Intensität = 100 %), jeweils dazwischen 3 min auf Eis abkühlen
 - Zellextrakt für 1 h bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugieren, Pellet verwerfen
 - 1 ml FLAG-Agarose in geeignete Säule füllen
-

- Säule mit 20-30 ml mit HBS waschen
- Mit 20 ml mit HBSM äquilibrieren
- Zentrifugierten Zellextrakt mit HBSMD 1:2 verdünnen
- Zellextrakt auf die Säule auftragen, Eluat auffangen und erneut auftragen (4x)
- Säule mit 15 ml mit HBSMD waschen
- 3 x mit je 2 ml FLAG-Peptid (100 µg/ml) in HBSMD eluieren, Eluat auffangen
- Säule mit höchstens 10 ml Glycin-HCl pH 3,0 waschen
- Säule mit 30 ml HBS/NaN₃ regenerieren
- Proteinkonzentration in Eluat-Fractionen mittels BioRad Protein-Assay (3.5.2) messen
- 10 µl der Eluat-Fractionen mit SDS-Probenpuffer versetzten und für 5 min bei 99 °C kochen. Anschließend durch SDS-PAGE auftrennen und mittels Coomassie-Färbung oder durch Western-Blot analysieren
- Die Eluat-Fractionen können bei -70 °C gelagert werden

HBS

20mM HEPES

25mM NaCl

1 mM DTT

HBSMHBS + 5mM MgCl₂HBS/NaN₃HBS + 0,02% NaN₃Glycin HCl

1M pH 3,0

Extraktionspuffer

	für 1000 ml	für 500 ml	Endkonzentration
0,2 M Tris pH 7,5	2,6 ml	1,3 ml	20 mM Tris
0,25 M EDTA	520 µl	260 µl	5 mM EDTA
1 mg/ml NaN ₃	1,3 ml	0,65 ml	50 µg/ml NaN ₃
2 M MgCl ₂	65 µl	32,5 µl	5 mM MgCl ₂
1 M DTT	26 µl	13 µl	1 mM DTT
Protease Inhibitor	1040 µl	520 µl	
Lysozym (frisch)	5,2 mg	2,6 mg	0,2 mg
H ₂ O	20,449 ml	10,225 ml	

Tab. 3.5. Zusammensetzung des Extraktionspuffers zur Isolierung von in *E. coli* heterolog exprimierten Proteinen.**3.7. Genetische Methoden****3.7.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Eine Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren ist durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm möglich. Für die Umrechnung der ermittelten optischen Dichte in Konzentration gelten folgende Regeln:

- $\text{o.D.}_{260} 1,0 = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$
- $\text{o.D.}_{260} 1,0 = 40 \mu\text{g/ml ssDNA, RNA}$
- $\text{o.D.}_{260} 1,0 = 33 \mu\text{g/ml Oligonukleotide}$

- zur Konzentrationsbestimmung ist immer eine Quarzküvette verwenden

3.7.2. Isolierung von Plasmid-DNA durch schnelle HB-Lyse

Diese Methode dient der Aufreinigung von Plasmid-DNA, die zur Restriktionsspaltung genutzt werden soll, um z.B. den Erfolg von Klonierungen zu überprüfen. Sie ist nicht geeignet zur Reinigung von Plasmiden für nachfolgende Klonierungsexperimente, da die DNA dafür nicht rein genug ist.

- 2 x 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur bei 10.000 g pelletieren
- Überstand restlos entfernen
- Pellet in 200 μl 10 mM EDTA pH 8,0 durch Vortexen resuspendieren
- Zugabe von 400 μl 0,2 M NaOH Lösung mit 1 % (w/v) SDS
- Zugabe von 300 μl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 und mehrfach invertieren
- Für 10 min mit 10.000g zentrifugieren
- Klaren Überstand abziehen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen. Pellet verwerfen.
- 600 μl eiskaltes Isopropanol zugeben, gut mischen und für mindestens 5 min bei RT inkubieren
- 10 min mit 10.000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol waschen
- Ethanol vollständig entfernen und Pellet bei 65 °C trocknen lassen
- Pellet in 20 μl Millipore resuspendieren, mit 1 μl DNase-freier RNase (0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzen und für 10 min bei 65 °C inkubieren

3.7.3. Isolierung von Plasmid-DNA durch Säulenchromatographie

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für nachfolgende Klonierungsexperimente wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (Kat. Nr. 27106) verwendet. Bakterienzellen werden ebenso wie bei der HB-Lyse durch alkalische Lyse aufgeschlossen und Proteine und chromosomale DNA durch Zentrifugation vom Plasmid-haltigen Überstand abgetrennt. Der Unterschied zur HB-Lyse besteht in der Anwendung eines Affinitätschromatographie-Verfahrens. Plasmid-DNA wird an Säulen gebunden und durch Waschen mit Puffern von restlichen Proteinen, RNA und Salzen befreit. Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

3.7.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe (Glick & Thompson, 1993)

- 1g Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff mit Pistill und Mörser fein zerkleinern
-

- Gewebepulver in ein Nunc-Röhrchen mit 10 ml RNA-Extraktionspuffer geben (Das Material muß immer gefroren gehalten werden!)
- Für 30 sec vortexen
- 1 ml 2 M Natriumacetat pH 4,0 zugeben und für 30 sec vortexen
- 10 ml wassergesättigtes Phenol hinzufügen und für 30 sec vortexen
- 4 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugeben und für 30 sec vortexen
- Für 10 min mit 5.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren. Protein und DNA verteilen sich auf die Trennschicht und nichtwässrige Phase.
- Die obere wässrige Phase mit einer Pasteurpipette abnehmen und in ein neues Nunc-Röhrchen überführen. Ein gleiches Volumen Isopropanol zugeben, gut mischen und über Nacht bei -20°C inkubieren.
- Bei 4°C für 15 min bei 10.000 x g zentrifugieren
- RNA-Pellet in 5 ml RNA-Extraktionspuffer resuspendieren. Vortexen bis die RNA gelöst ist (Inkubation bei 65°C kann notwendig sein, die Zeit sollte allerdings so kurz wie möglich gehalten werden)
- Ein gleiches Volumen Isopropanol hinzufügen, gut mischen und für 1 h bei -20°C inkubieren
- Für 15 min bei 4°C mit 10.000 x g zentrifugieren
- RNA-Pellet mit 10 ml eiskaltem 75% igen Ethanol waschen
- Pellet in einem Exsikkator für 5 bis 10 min trocknen (Das Pellet sollte nicht komplett austrocknen, da sonst das Resuspendieren sehr schwer wird)
- Konzentration der RNA photometrisch bestimmen (siehe 3.7.1)
- RNA in 0,5 bis 1 ml RNase freiem Wasser resuspendieren und bei -70°C lagern

RNA-Extraktionspuffer

4 M GITC (Guanidinisothiocyanat)

25 mM Natriumcitrat pH 7,0

0,5 % Sarkosyl

0,1 M β -Mercaptoethanol

3.7.5. Isolierung von PolyA⁺-mRNA

PolyA⁺-mRNA wurde mittels des "PolyAtract[®] mRNA isolation system" der Firma Promega (Kat. Nr. Z5200) isoliert. Die Isolierung der mRNA aus Gesamt-RNA erfolgt durch Bindung an Oligo-dT-Primer, die an magnetischen Partikeln immobilisiert sind. Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

- Nach Aufreinigung Konzentration der mRNA photometrisch bestimmen

3.7.6. Erstellung von Adaptor-ligierten cDNA-Banken

Für die Erstellung von Adaptor-ligierten cDNA-Banken wurde das „Marathon™ cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech (Kat. Nr. 634913) verwendet. Als Ausgangsmaterial diente die aus verschiedenen

Pflanzengewebe gewonnene PolyA⁺-mRNA (3.7.4.). Alle Schritte wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Im letzten Schritt der Synthesereaktion wird ein spezifischer Adaptor an beide Enden der doppelsträngigen cDNA ligiert (Abb. 3.1.). Dieser ist teilweise doppelsträngig und enthält Schnittstellen für NotI, SrfI und XmaI. Des Weiteren enthält der Adaptor eine T7-Promotor-Sequenz, die eine *in vitro*-Transkription der cDNAs ermöglicht. In dem Kit sind zudem zwei Adaptor-Primer (AP1 und AP2) enthalten, die speziell für RACE-Reaktionen konzipiert sind.

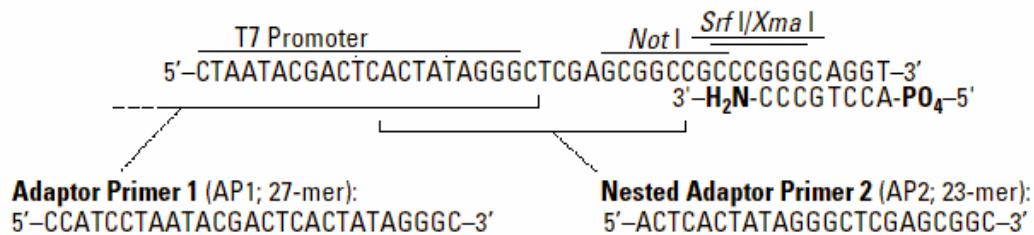


Abb. 3.4.: Struktur der an beide Enden der cDNA ligierten Adapter.

Der Adaptor-Primer 1 (AP1) zum größten Teil gegen die komplementäre Sequenz des T7-Promotors im Adaptor gerichtet. In der Sequenz des Adaptors ist daher, da dieser in diesem Bereich einzelsträngig vorliegt, zunächst keine Bindungsstelle für den Primer vorhanden. Eine Bindungsstelle wird erst geschaffen, wenn mittels eines genspezifischen Primers (GSP) während der Erststrangsynthese einer PCR-Reaktion eine zum T7-Promotor komplementäre Sequenz gebildet wird. Dieses Prinzip ist sowohl auf 5'- als auch auf 3'-RACE-Reaktionen gleichermaßen anwendbar. Durch die Verwendung eines „nested Adaptor“ Primers (AP2) in Verbindung mit einem zweiten genspezifischen Primer (GSP 2) kann die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte gesteigert werden. Eine nützliche Eigenschaft der Adapter ist weiterhin, daß sie zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen in der cDNA führen, insofern die Adaptersequenzen an beiden Enden doppelsträngig vorliegen. Nach Aufschmelzen der doppelsträngigen cDNA hybridisieren cDNA-Einzelstränge über ihre komplementären Adaptersequenzen. Diese Eigenschaft ist für PCR-Reaktionen entscheidend von Bedeutung, da so eine end-to-end PCR über den Adaptor-Primer ausgeschlossen ist.

3.7.7. PCR

Mittels PCR werden DNA-Fragmente mit hitzestabiler DNA-Polymerase exponentiell vermehrt (Mullis *et al.*, 1986). In dieser Arbeit wurden die meisten PCR-Reaktionen mit den Komponenten des „Advantage™ cDNA Polymerase Mix“ der Firma Clontech (Kat. Nr. 639105) durchgeführt, der einen Mix verschiedener Polymerasen, u.a. auch mit Proof-reading Aktivität, beinhaltet und besonders zur Amplifizierung langer DNA-Abschnitte geeignet ist. Primer für PCR-Reaktionen wurden mittels des Programms PrimerSelect™ Vers. 5.00 (DNASTAR Inc.) kreiert.

Für einen 25 µl Ansatz folgende Komponenten mischen:

- 2,5 µl PCR-Puffer (10 x)
- je 1 µl Primer (100 µM)

- 1-3 µl dNTP-Mix (10 µM)
- 100 ng Template-DNA (Plasmide, cDNA, DNA-Fragmente)
- 1 µl Polymerase-Mix (1 U)
- auf 25 µl mit Millipore auffüllen
- möglichst schnell für die PCR-Reaktion einsetzen
- nach Beendigung der PCR-Reaktion Produkt(e) mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüfen

Um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen kann dem PCR-Ansatz noch $MgCl_2$ zugesetzt werden. Für jede PCR-Reaktion ist ein angepaßtes Programm zu entwickeln, wobei insbesondere die Annealing-Temperatur der Primer und die Elongationszeit anzupassen ist.

3.7.8. Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsansatz folgendermaßen mischen:

- 1 µl Inkubationspuffer
- 1-5 U Restriktionsenzym(e)
- bis zu 20 µg zu spaltende DNA
- Ansatz durch Zugabe von Millipore auf 10 µl Gesamtvolumen bringen
- Inkubation bei geeigneter Temperatur für 75 min bis 150 min
- Enzyme durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktivieren
- Erfolg der Spaltung durch Auftragen von 3-5 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel (siehe 3.8.1.) überprüfen

3.7.8. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

- 34µl restringierte DNA
- 2 µl alkalische Phosphatase (1U/µl) und 4µl Puffer zugeben
- 15 min bei 37°C inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation für 30 min bei 65°C

3.7.9. Ligation

Ligationsansatz folgendermaßen mischen:

Restringierte Vektor-DNA und zu klonierende DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 auf Eis mischen

- 1 µl Ligationspuffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) zugeben
- Mit Millipore auf ein Gesamtvolumen von 10 µl auffüllen
- Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubieren
- Das Ligationsgemisch kann direkt zur Transformation von kompetenten Zellen eingesetzt werden.

Ligationspuffer (10x)

500 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 70 mM MgCl₂, pH 7,5

3.7.10. PCR-Mutagenese

Für die PCR-Mutagenese müssen Plasmide aus einem *E. coli*-Stamm mit Restriktions-/Modifikationssystem (dam⁺) wie z.B. Dh5 α verwendet werden.

- Mit geeigneten Primern gesamten Vektor amplifizieren (3.7.7.) und dadurch gewünschte Mutationen einfügen
- Für 30 min bei 37°C mit DpnI inkubieren
- PCR-Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese auftrennen (3.8.1.) und anschließend Produkte aus dem Gel eluieren (3.8.3.)
- Ligation über Nacht bei 4°C (3.7.9)
- Transformation in *E. coli* XL1-blue

3.7.11. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Abschnitten wurden sämtlich durch die Firma IIT GmbH (Universität Bielefeld) durchgeführt.

3.8. Elektrophorese und Isolierung von Nukleinsäuren

3.8.1. Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

- Agarose in gewünschter Konzentration in TA-Puffer bis zum vollständigen Lösen aufkochen
- Lösung in Elektrophoresekammer gießen
- nach dem Erstarren Gel mit TA-Puffer überschichten und Probenkamm vorsichtig entfernen
- DNA-Probe mit BPB-DNA-Probenpuffer 4:1 mischen
- Gel mit Proben beladen und bei 120 V für 30 min laufen lassen
- Nach ausreichender Trennung Elektrophoreselauf beenden und Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) für mehrere Minuten färben
- DNA-Banden mit einem UV-Transluminator anregen und fotografisch dokumentieren

TA-Puffer

40 mM Tris-HCl, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8 mit Essigsäure einstellen

Die Lösung kann 50 x konzentriert angesetzt werden

BPB-DNA-Probenpuffer (5x)

10 ml TA-Puffer, 10 ml Glycerin 86%, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 0,2% (w/v) Xylen-Cyanol

3.8.2. Auftrennung von RNA mittels Agarosegelelektrophorese

- Gelkammer mit 98 % Ethanol waschen
 - Agarose in gewünschter Konzentration in TA-Puffer bis zum vollständigen Lösen aufkochen
-

- Lösung in Elektrophoresekammer gießen
- nach dem Erstarren Gel mit TA-Puffer überschichten und Probenkamm vorsichtig entfernen
- RNA-Probe mit RNA-Probenpuffer 1:2 mischen, 10 min bei 65 °C erhitzen
- Gel mit Proben beladen und bei 120 V für 30 min laufen lassen
- Nach ausreichender Trennung Elektrophoreselauf beenden und Gel in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) für mehrere Minuten färben
- DNA-Banden mit einem UV-Transluminator anregen und fotografisch dokumentieren

TA-Puffer

40 mM Tris-HCl, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8 mit Essigsäure einstellen

Die Lösung kann 50 x konzentriert angesetzt werden

RNA-Probenpuffer (1,5x)

45 µl Formamid

4 µl Glycerin

1-2 µl Bromphenolblau

3.8.3. Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen

Um DNA für nachfolgende Klonierungsexperimente zu isolieren, werden PCR- und Restriktionsansätze mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, Banden ausgeschnitten und die DNA aus den Agarose-Stückchen eluiert. Mit diesen Schritten wird die DNA von Primern, Salzen und Proteinen gereinigt. Zur Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Kat Nr. 28704) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.9. DNA-Transfer-Methoden

3.9.1. Transformation von *E. coli*

Durch Transformation können Bakterien DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen. *E.coli* allerdings verfügt nicht über ein natürliches Transformationssystem. Die Zellen müssen daher erst durch eine Vorbehandlung mit CaCl₂ transformationskompetent gemacht werden.

Herstellung ultrakompetenter *E.coli*-Zellen

- 10 ml LB-Medium mit *E. coli* beimpfen und über Nacht bei 37 °C rollend inkubieren
 - 250 ml SOB-Medium mit ca. 3 ml Übernachtskultur beimpfen und bei 18-25 °C bis zu einer o.D.₅₈₀ von ca. 0,6 anwachsen lassen (Inkubation bei 25 °C führt zu einer etwas geringen Kompetenz)
 - 10 min auf Eis inkubieren
 - Bakterien mit 2.500 g für 10 min bei 4 °C pelletieren
 - Zellen vorsichtig in 80 ml eiskaltem Puffer TB resuspendieren
-

- Für 10 min auf Eis inkubieren
- Mit 2.500 g für 10 min bei 4 °C zentrifugieren
- Zellen vorsichtig in 20 ml eiskaltem Puffer TB resuspendieren
- DMSO bis zu einer Konzentration von 7% (v/v) zugeben
- 10 min auf Eis stellen
- Zellen aliquotieren und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Kompetente Zellen bei -80 °C lagern

SOB-Medium

2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,0

Puffer TB

10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂

Alle Komponenten (bis auf MnCl₂) mischen und pH auf 6,7 mit KOH einstellen. Dann MnCl₂ zugeben und die Lösung sterilfiltrieren.

Transformation von *E. coli*-Zellen

- Eppendorf-Gefäß mit kompetenten Zellen auf Eis auftauen lassen
- DNA-haltige Lösung zugeben und mit den Zellen durch Schnipsen am Eppendorf-Gefäß durchmischen (nicht vortexen)
- Für 15 bis 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C
- Zellen sofort auf Eis stellen und mindestens 2 min kühlen
- 0,75 ml SOC-Medium zugeben und für 45 min bei 37 °C inkubieren
- Zellen mit 8.000 g für kurze Zeit zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet im Rücklauf durch Schnipsen am Eppendorf-Gefäß resuspendieren (nicht vortexen)
- Auf geeignetem Selektionsmedium ausstreichen und über Nacht bei 37 °C inkubieren lassen

SOC-Medium

2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7,0

3.9.2. Transformation von *Agrobacterium rhizogenes*

Herstellung elektrokompenter Agrobakterien

- 250 ml LB-Medium mit 3 ml einer Übernachtskultur von *A. rhizogenes* beimpfen
 - Bei 28 °C für 5-6 h schütteln lassen, bis die Kultur eine o.D. von ca. 0,6 erreicht hat
 - Bakterien für 5 min mit 5.000 g bei 4 °C pelletieren
 - Pellet in einer eiskalten, 10%igen (v/v) Glycerin-Lösung resuspendieren
 - Bakterien noch zwei mal mit 10% (v/v) eiskaltem Glycerin waschen
-

- Pro 250 ml verwendeter Ausgangskultur 5 ml 10% (v/v) Glycerin zu den Bakterien geben
- Zellen resuspendieren und in Mengen von 200 µl aliquotieren
- Mit flüssigem Stickstoff einfrieren, Lagerung bei -80 °C

Elektroporation von Agrobakterien

- Eppendorf-Gefäß mit kompetenten Zellen auf Eis auftauen lassen
- In vorgekühlte Elektroporationsküvette füllen
- DNA-haltige Lösung zugeben und mit den Zellen durch Schnipsen am Eppendorf-Gefäß durchmischen
- Elektroporation mit 2,5 kV
- 750 µl YEP-Medium zugeben
- In Eppendorf-Gefäße überführen
- 4 h bei RT rollern lassen
- Zellen mit 8.000 g für 30 sec pelletieren, Überstand verwerfen
- Bakterien im Rückstand resuspendieren
- Auf YEP-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausstreichen
- Für 3 Tage bei 28 °C inkubieren

3.9.3. Transformation von *Medicago truncatula* cv. Jemalong

Zur „hairy root“ Transformation von *Medicago truncatula* wurde der Agrobakterium-Stamm ArQua1 verwendet (Quandt *et al.* 1993). Bei dieser Methode werden Agrobakterien in die Wurzeln von Keimlingen injiziert oder es wird die Wurzelspitze abgeschnitten und die Wundstelle über eine mit Agrobakterien bewachsene Agarplatte gestrichen.

- Zwei bis drei Tage alte *Medicago truncatula*-Keimlinge in paralleler Ausrichtung auf Pflanzenagarplatten auslegen
- gewünschten *Agrobacterium rhizogenes*-Stamm auf YEP-Medium mit geeigneten Antibiotika ausstreichen und über Nacht bei 28 °C inkubieren
- Bakterienrasen mit PBS-Puffer von der Oberfläche der Agarplatte kratzen und in Lösung bringen
- Bakterienlösung in Insulinspritze aufnehmen
- Durch mehrmaliges Einstechen und Injizieren Wurzeln der Keimlinge mit den Agrobakterien beimpfen
- Agarplatten zum Schutz gegen Austrocknung mit Parafilm umwickeln, zwischen Deckel und Boden mehrfach einstechen, um Gasaustausch zu gewährleisten und für drei bis sechs Wochen inkubieren (siehe 3.4.1).

PBS-Puffer (10 x)

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, pH 7,4

3.10. Physiologische Methoden

3.10.1. Präparation von Hefeelictor (Schuhmacher *et al.*, 1987)

- 1 kg Hefe mit 1,5 l 100 mM Citratpuffer (pH 7,5) vermischen und darin 30 min bei RT rühren
- 20 min bei 121°C autoklavieren
- 250ml der Rohfraktion in einen 500 ml Zentrifugenbecher geben und bei 7.000 g 10 min zentrifugieren
- Überstände sammeln und durch einen Faltenfilter geben
- 1 VT Ethanol zugeben und bei 4°C über Nacht rühren lassen
- 250 ml der Rohfraktion erneut in einen 500 ml Zentrifugenbecher überführen und bei 5.000 g 10 min zentrifugieren
- Pellet unter Rühren über Nacht in möglichst geringer Menge Millipore lösen
- 15 min bis 80 min bei 7.000 g zentrifugieren
- Überstand drei Tage gegen Millipore dialysieren (MWCO 1000), dabei das Dialysewasser zweimal täglich wechseln
- Dialysiertes Produkt gefriertrocknen
- In einer Argonatmosphäre ist der Elicitor mehrere Jahre haltbar

3.10.2. Inhibitorstudien

Inhibierung der Polymerisation von Mikrotubuli durch Nocodazol

Nocodazol bindet an einen Argininrest in der β -Tubulin Untereinheit und verhindert dadurch die Polymerisation von freiem Tubulin zu Mikrotubuli-Filamenten.

- Nocodazol (methyl[5-(2-thienyl-carbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]-carbamate, Sigma, Kat. Nr. M1404) in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO lösen
- Pflanzenwurzeln mit 10 μ g/ml Nocodazol in H₂O für 7 h inkubieren

Inhibierung der Polymerisation von Aktin durch Latrunculin B

Latrunculin B ist ein Zellgift, das ursprünglich in dem Meeresschwamm *Latruncula magnifica* entdeckt wurde. Es bindet monomeres G-Aktin im Verhältnis 1:1 und verhindert die Polymerisation zu F-Aktinfilamenten. Der genaue Wirkmechanismus ist aber noch unbekannt.

- Latrunculin B (Sigma, Kat. Nr. L5288) in einer Konzentration von 2 mg/ml in DMSO lösen
- Pflanzenwurzeln mit 2 μ g/ml Latrunculin B in H₂O für 7 h inkubieren
- Inhibitor durch Inkubation der Wurzeln über Nacht in H₂O auswaschen

Inhibierung des Vesikeltransports am Golgi-Apparat mit Brefeldin A

Brefeldin A ist ein Gift aus dem Schimmelpilz *Penicillium brefeldianum*, das die Morphologie des Golgi-Apparats beeinträchtigt. Es bindet an „große“ Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) die eine Sec7-Domäne beinhalten und stabilisiert einen Übergangszustand aus GEF und kleinen G-Proteinen. Diese können dadurch nicht mehr durch einen Austausch von GTP gegen GDP aktiviert

werden. Die Folge ist eine Inhibierung von Vesikeltransportprozessen am Golgi-Apparat und damit einhergehend eine gravierende morphologische Veränderung der Golgi-Struktur.

- Brefeldin A (γ ,4-Dihydroxy-2-(6-hydroxy-1-heptenyl)-4-cyclopentanecrotonic acid-lactone, Sigma, Kat. Nr. B7651) in einer Konzentration von 50 mg/ml in Ethanol lösen
- Pflanzenwurzeln mit 100 μ g/ml Brefeldin A in H₂O für 7 h inkubieren

3.10.3. Organellspezifische Färbungen

Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker

- MitoTracker[®] Red CMXRos (Molecular Probes, Kat. Nr. M7512) in einer Konzentration von 1 mM in DMSO lösen, Lagerung bei -20°C
- Pflanzenwurzeln mit 1 μ M MitoTracker in H₂O für 30 min inkubieren
- MitoTracker-Lösung entfernen und Wurzeln für mind. 10 min in H₂O inkubieren

Membranfärbung mit FM4-64

- FM[®]4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide, Molecular Probes, Kat. Nr. T3166) in einer Konzentration von 1 mM in DMSO lösen, Lagerung bei -20°C
- Pflanzenwurzeln mit 20 μ M FM4-64 in H₂O inkubieren. Kurzzeitinkubation für 30 min. Langzeitinkubation für 7 h.
- Da FM4-64 nur nach Einlagerung in Membranen stark fluoresziert, ist ein Auswaschen des Farbstoffes nicht erforderlich

Färbung des Endoplasmatischen Reticulums mit ER-Tracker

- DiOC₅(3) (3-pentyl-2-(3-(3-pentyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl)-, iodide, Molecular Probes, Kat. Nr. D272) in einer Konzentration von 500 μ M in DMSO lösen
- Pflanzenwurzeln mit 0,5 μ M DiOC5 für 30 min inkubieren
- DiOC₅-Lösung entfernen und Wurzeln zweimal für mind. 10 min in H₂O inkubieren

3.11. Mikroskopische Verfahren

3.11.1. Selektion von transgenen Wurzeln

Drei bis sechs Wochen nach der Transformation (3.9.3) wurden Wurzeln von *M. truncatula* auf Expression der eingebrachten Konstrukte überprüft. Für die Untersuchungen wurde ein MZFLIII-Fluoreszenzbinokular der Firma Leica verwendet. Dieses ist mit einer Kaltlichtquelle, einem 100 W HBO-Brenner, zwei verschiedenen Objektiven (Plano 1 x NA 0,125 und PlanApo 1,6 x NA 0,125) und Filtern für GFP-, CFP-, YFP- und dsRed-Anregung ausgestattet:

Filterset	Anregungsfilter	Sperrfilter
GFP Plant fluorescence	470/40 nm	525/50 nm
CFP	436/20 nm	480/40 nm
YFP	510/20 nm	560/40 nm
DsRed	546/12 nm	560 LP

Tab. 3.6. Filterausstattung des Leica MZFLIII Fluoreszenzbinokulars. LP = long pass Filter

Mit dem Leica MZFLIII Fluoreszenzbinokular lassen sich transformierte Pflanzen nicht invasiv überprüfen. Wie unter Punkt (3.9.3.) beschrieben, werden die Pflanzen in auf Nährmedium in Petrischalen kultiviert. Diese müssen zur Untersuchung nicht geöffnet werden, so daß die das Material weiterhin steril bleibt. Transgene Wurzeln können von nicht transgenen Wurzeln an der deutlich sichtbaren grünen GFP-Fluoreszenz unterschieden werden. Nicht transgene Wurzeln zeigen vorwiegend gelbe Autofluoreszenz und, in Abhängigkeit von den zur Kultivierung eingesetzten Lichtbedingungen, teilweise rote Autofluoreszenz der Proplastiden.

3.11.2. Zwei-Photonen Mikroskopie

In der „normalen“ Fluoreszenzmikroskopie werden Moleküle durch die Absorption von einzelnen Lichtquanten in einen energiereichen, angeregten Zustand versetzt. Ein Teil der Anregungsenergie wird als Fluoreszenz wieder emittiert, wenn das Molekül in den energieärmeren Grundzustand zurückfällt (Abb. 3.5.). Die absorbierte Energie berechnet sich dabei wie folgt:

$$\Delta E = E_e - E_g = h\nu_{\text{abs}}$$

wobei:

ΔE = Energiedifferenz

e = angeregter Zustand

g = Grundzustand

ν_{abs} = Frequenz entsprechend der Bohrschen Frequenzbedingung

h = Plancksches Wirkungsquantum

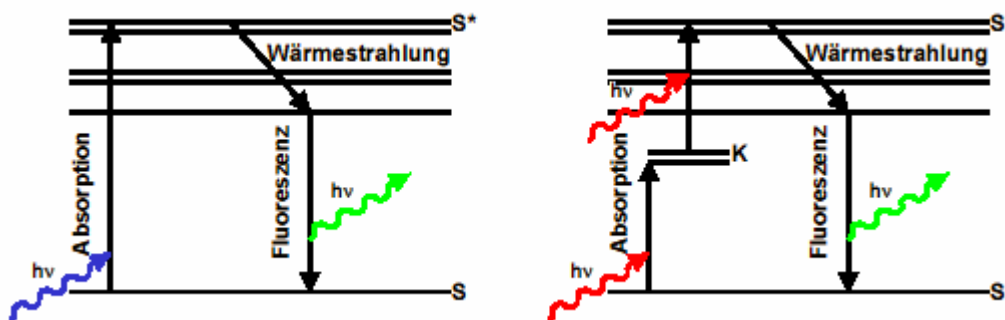


Abb. 3.5.: Vergleich der Energieschemata von Fluoreszenz- und Zwei-Photonen-Anregung. Links: Bei der konventionellen Fluoreszenzanregung wird ein energiereiches Lichtquant absorbiert. Dadurch erreicht das Molekül einen energiereicheren, angeregten Zustand (S^*). Innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} Sekunden gibt das angeregte Molekül einen Teil der absorbierten Energie als Wärmestrahlung, den Rest hingegen als Fluoreszenzstrahlung ab und fällt in den nicht angeregten Grundzustand zurück (S). Rechts: Bei der Zwei-Photonen Mikroskopie wird die notwendige Energie zur Anregung des Moleküls durch Absorption von zwei Lichtquanten geliefert. Das Prinzip funktioniert nur, wenn die beiden Quanten praktisch gleichzeitig von dem Molekül absorbiert werden, so daß es einen kritischen Übergangszustand (K) überwinden kann. Genau wie bei der konventionellen Fluoreszenzanregung wird ein Teil der aufgenommenen Energie als Wärme abgestrahlt, der andere Teil hingegen als Fluoreszenz emittiert.

Nach den Regeln der Quantenmechanik ist es allerdings möglich, die zur Fluoreszenz notwendige Anregungsenergie auch durch die Absorption mehrerer Lichtquanten geringen Energiegehalts zu erreichen, insofern diese gleichzeitig absorbiert werden (Abb. 3.5.). Dieses Prinzip wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts erkannt und von der späteren Nobelpreisträgerin Maria Göppert-Mayer theoretisch formuliert (Göppert-Mayer, 1929).

Ein ganz wesentlicher Unterschied zwischen der Ein- und Zwei-Photonen Technik besteht in der Fokusabhängigkeit der Zwei-Photonen Anregung. Bei der Ein-Photonen Anregung, wie sie beim confokalen Laserscanningmikroskop verwendet wird, kann die Absorption von Photonen entlang der gesamten Strahlachse erfolgen:

$$N_{\text{abs},1P}(z) = n_F \sigma^{(0)} \frac{E_0}{h\nu} dz$$

wobei:

$N_{\text{abs}}(z)$ = Anzahl der pro Puls absorbierten Photonen in der Tiefe z

σ = Wirkungsquerschnitt

E_0 = Gesamtenergie im Puls

$h\nu$ = Frequenz des Laserlichts

dz = Schichtdicke

nF = Volumendichte

1P = Ein-Photonen Anregung

Die Absorption von Photonen ist also unabhängig von der Tiefe z , und es können auch Moleküle außerhalb der Fokusebene angeregt werden. Dieses wiederum zieht Streulichteffekte nach sich, die durch die Verwendung einer Lochblende (Pinhole) minimiert werden müssen. Bei der Zwei-Photonen Anregung hingegen erfolgt die Zwei-Photonen Anregung ausschließlich im Fokus, weil nur hier die Intensität der auftreffenden Strahlen hoch genug ist:

$$N_{\text{abs},2P}(z) = n_F \sigma^{(2)} \frac{E_0^2}{(h\nu)^2} \frac{\sqrt{2\ln(2)}}{\sqrt{\pi}} \frac{1}{\pi\omega^2(z)} \frac{1}{\tau} dz$$

wobei

$N_{\text{abs}}(z)$ = Anzahl der pro Puls absorbierten Photonen in der Tiefe z

σ = Wirkungsquerschnitt

E_0 = Gesamtenergie im Puls

$h\nu$ = Frequenz des Laserlichts

τ = volle zeitliche Halbwertsbreite

$\pi\omega^2$ = Strahlquerschnitt

dz = Schichtdicke

nF = Volumendichte

2P = Zwei-Photonen Anregung

Das insgesamt angeregte Volumen ist daher bei der Zwei-Photonen Mikroskopie wesentlich kleiner als bei der Ein-Photonen Mikroskopie und es entfällt die Notwendigkeit der Verwendung einer

Lochblende, weil kein Streulicht aus anderen Ebenen einfällt (Piston, 1999). Zugleich ergibt sich daraus der Vorteil, daß es nicht zum Ausbleichen der Probe außerhalb der Fokusebene kommt.

Das erste Zwei-Photonen Laser Raster Mikroskop wurde 1990 von Winfried Denk, James Strickler und Watt Webb (Cornell University, USA) vorgestellt und patentiert (Denk *et al.*, 1990). Bei der Methode wird das zu untersuchende Präparat mit ultrakurzen Laserpulsen aus einem Titan-Saphir (Ti:Sa) Laser bestrahlt. Die Pulslänge liegt dabei typischerweise in einem Bereich von 50 bis 100 Femtosekunden bei einem Pulsabstand von 12,5 ns. Die meisten heute erhältlichen Ti:Sa Laser arbeiten dabei in einem Wellenlängenbereich zwischen 720 nm und 900 nm. Die Verwendung eines Infrarot-Lasers hat den positiven Nebeneffekt, daß sich die phototoxische Wirkung auf das Präparat verringert. Im Vergleich zur Ein-Photonen Mikroskopie treten geringere Strahlenschädigungen pro Zeiteinheit auf, wodurch sich das Ausbleichen der Probe verzögert. Mit der Zwei-Photonen Anregung verlängert sich also der Untersuchungszeitraum für die Probe (Squire & Bastiaens, 1999).

In dieser Arbeit wurde ein Aufbau zur Zwei-Photonen Mikroskopie in der Fakultät für Physik verwendet. Die Funktionsweise des Mikroskops ist schematisch in Abb. 3.6. wiedergegeben:

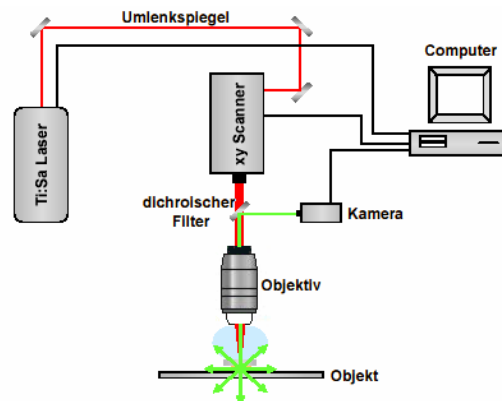


Abb. 3.6.: Schematische Zeichnung des Zwei-Photonen Mikroskops. Der Infrarot-Laserstrahl wird von einem Titan-Saphir-Laser erzeugt und über Umlenkspiegel zu einem xy-Scanner geleitet. Hier wird der Laserstrahl durch einen Strahlteiler in 64 Einzelstrahlen aufgeteilt und die Positionierung in xy-Richtung moduliert. Die Strahlen werden dann weiter zum Mikroskop und über das Wasserimmersionsobjektiv zum Präparat geleitet. Im Fokus des Objektivs kommt es zur Zwei-Photonen Anregung und es entsteht Fluoreszenz, die unter anderem zum Objektiv zurückgestrahlt wird. Das Fluoreszenzlicht gelangt über die Objektivöffnung zu einem dichroischen Spiegel und wird dort zur Kamera umgelenkt. Die Kamera wird über eine Steuerungssoftware auf dem Computer kontrolliert. Erfasste Daten werden auf dem Computer gespeichert und können dort nachbearbeitet werden.

Das System bestand aus einem Olympus IX-70 Inversmikroskop, einem Strahlteiler für multifokale Multiphoton-Mikroskopie und einem MaiTai Infrarot Laser (Nielsen *et al.*, 2001). Das Mikroskop war mit einem Infrarot-korrigierten Olympus 40 x LUMPLanFI / IR Wasserimmersionsobjektiv (NA = 0,8) ausgestattet. Zur Zwei-Photonen Anregung wurde ein gepulster Laserstrahl von 860 nm verwendet. Bilder wurden von einer Andor DV887 Kamera, kontrolliert durch die zugehörige iXon Steuerungssoftware (Vers. 1.1.45.0) aufgenommen und auf einem Computer gespeichert. Auf dem Weg zur Kamera war ein GFP-Filter in den Lichtweg geschoben, um emittiertes Licht zu filtern. Einzelbilder wurden in einem Abstand von je 1 sec aufgenommen, im *.tif-file Format exportiert und

mittels der Hyugens Essential (Scientific Volume Imaging b.v., Alexanderlaan 14, 1213 XS Hilversum, Netherlands) Dekonvolutionssoftware nachbearbeitet (siehe 3.12.1).

3.11.3. Confokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Die confokale Lasermikroskopie erfolgt nach dem Prinzip der Ein-Photonen Anregung, wie sie in Abbildung 3.5. skizziert ist und verlangt daher nach dem Einsatz einer Lochblende, um den Einfall Streulicht aus nichtfokussierten Ebenen zu minimieren.

In dieser Arbeit wurde ein Leica DMRE (SDK) Mikroskop, ausgestattet mit einem TCS-SP2 confokalen Scankopf, verwendet (Leica Microsystems, Heidelberg). Zur Datenerfassung wurde das Mikroskop von der Leica LCS (Vers. 2.00.871) Software gesteuert. Transgene Wurzeln wurden jeweils mit einem Leica 63 x HCX PIAPO Ölimmersionsobjektiv (NA = 1.32) mikroskopiert. Für die Untersuchung der GFP-Fluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 500 nm und 600 nm erfaßt. Zur Doppellokalisierung von GFP und MitoTracker[®] Red CMXRos oder FM[®]4-64 wurde das GFP bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 500 nm und 540 nm gemessen. Die Farbstoffe hingegen wurden bei 543 nm angeregt und die Emission zwischen 580 nm und 670 nm dokumentiert. Für die Aufnahmen wurden generell folgende Einstellungen gewählt:

- Modus xyt
- Beam expand 3
- Format 1024x1024 Pixel
- Line Average 4
- Pinhole Airy 1
- Scangeschwindigkeit 400 Hz

Einzelbilder wurden in einem Abstand von ca. 12 Sekunden aufgenommen und mittels der Leica LCS Software als avi-Videofiles mit einer Bildwiederholungsrate von 15 pro Sekunde exportiert.

3.12. Verwendete Software

3.12.1. Dekonvolution von Zwei-Photonen Aufnahmen

Zur Filterung von Hintergrundrauschen wurden Zwei-Photonen Aufnahmen mit der Dekonvolutionssoftware Hyugens Essential (Scientific Volume Imaging b.v., Alexanderlaan 14, 1213 XS Hilversum, Netherlands) nachbearbeitet. Dazu mußten in der Software ein Wert für das Hintergrundrauschen und die Anzahl an Iterationsschritten als die beiden entscheidenden Parameter angegeben werden. Für das Hintergrundrauschen wurden Werte zwischen 20 bis 120 eingestellt und es wurde immer mit vier Iterationsschritten gerechnet. Die dekonvolierten Einzelbilder wurden anschließend mit der Freeware RAD Video tools (RAD Game tools Incorporated, 401 Parkplace suite 103, Kirkland, WA 98033, USA) zu avi-Videofiles mit einer Bildwiederholungsrate von 15 pro Sekunde assembliert.

3.12.2. Komprimierung von avi-Videofiles

Bildfolgen aus der confokalen Laserscanning-Mikroskopie und der Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden mittels geeigneter Programme zu avi-Videofiles zusammengesetzt (Abschnitte 3.11.3 und 3.12.1.). Um die Größe der Videos zu minimieren, wurden diese in Animation Shop (Vers.2.00, Jasc Software, Corel Corporation, Ottawa, Kanada) geladen und mittels des Cinepack Codec (Radion) bei einer Qualität von 100 % komprimiert.

3.12.3. EST-Datenbankrecherchen

Zur Suche nach Homologen von Coatomerproteinen aus Pflanzen, wurde zunächst die SwissProt Datenbank (<http://www.expasy.org>) mit Schlüsselworten wie „COP, Coat, Coatomer, non-Clathrin oder Coatomer-like“ durchsucht. Die gefundenen Sequenzen für COPI-Protein Homologe aus verschiedenen Pflanzen wurden dann mittels BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf korrekte Annotierung hin überprüft (Altschul *et al.*, 1990). Ausgewählte Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* wurden im nächsten Schritt zur Blast-Abfrage der *M. truncatula* EST-Datenbanken bei TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) genutzt. Für alle Blast-Abfragen wurde die Blosum-Matrix 62 verwendet. EST-Sequenzen mit entsprechenden Homologien wurden heruntergeladen, gespeichert und mit der Software MegAlign™ (Vers. 5.00, DNASTAR Software Paket, DNASTAR Incorporation, 1228 S. Park St., Madison, WI 53715, USA) multiple Alignments unter Benutzung der Methoden ClustalW, ClustalV oder Jotun Hein und phylogenetische Bäume erstellt. Multiple Alignments wurden als msf-Files gespeichert, in GeneDoc (Vers. 2.6.002, <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>, Nicholas *et al.*, 1997) geladen und als wmf-Files exportiert.

3.12.4. 3D-Rendering

Zum 3D-Rendering wurden die *M. truncatula* γ -COP EST-Sequenz TC77876 in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und für die letzten 267 Aminosäuren aus dem C-Terminus des Proteins eine 3D-Struktur unter Verwendung des Programms Geno3D errechnet (http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html, Combet *et al.*, 2002). Als Referenz wurde das Modell der Appendage-Domäne der humanen γ COP Untereinheit verwendet (PDB Nummer 1R4X). Die PDB-Modelle wurden anschließend in RasMol (Vers. 2.7.2.1., Sayle & Milner-White, 1995) geöffnet und als bmp-Files exportiert.

4. Ergebnisse

4.1. EST-Datenbankanalysen zur Suche von Bestandteilen von COPI-coated Vesikeln aus *Medicago truncatula*

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß COPI-coated Vesikel in tierischen Zellen eine entscheidende Rolle bei retrograden Transportprozessen zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER spielen (Letourneur *et al.*, 1994). Für Pflanzen hingegen gab es zu diesem Zeitpunkt durch die Identifizierung einiger Sequenzhomologe von Vesikelbestandteilen und durch den Nachweis von Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen tierische Coatomer-Untereinheiten in Pflanzenproteinextrakten nur erste Hinweise auf die Existenz von COPI-coated Vesikeln (Memon *et al.*, 1995; Andreeva *et al.*, 1998; Movafeghi *et al.*, 1999). Erst die Veröffentlichung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) eröffnete einen neuen perspektivischen Blick auf Membrantransportprozesse in Pflanzen und führte zu der Erkenntnis, daß Pflanzen die gleiche zelluläre Maschinerie des Vesikeltransports nutzen wie tierische Zellen (Bock *et al.*, 2001). In der Zwischenzeit konnte die Bildung von COPI-coated Vesikeln *in vitro* aus einem Blumenkohl-Zellextrakt induziert (Pimpl *et al.*, 2000) und die Vesikel *in situ* mittels Antikörpern lokalisiert werden (Pimpl *et al.*, 2000; Couchy *et al.*, 2003). Nichtsdestotrotz fehlen immer noch Informationen über die *in vivo* Lokalisation von COPI-coated Vesikeln in Pflanzen.

Die Modelleguminose *Medicago truncatula* war bisher noch nicht zur Untersuchung des pflanzlichen Vesikeltransports verwendet worden. Dementsprechend gab es von dieser Pflanze in den entsprechenden Datenbanken keine Sequenzinformationen zu Proteinkomponenten von COPI-Vesikeln. Die Identifizierung von *M. truncatula* EST-Sequenzen mit Homologien zu COPI-Coatomer-Untereinheiten bildete daher den ersten, grundlegenden Schritt im Rahmen dieser Arbeit. Dazu mußte zunächst eine geeignete Strategie zur Auffindung solcher EST-Sequenzen entwickelt werden. Diese gliederte sich in vier Abschnitte:

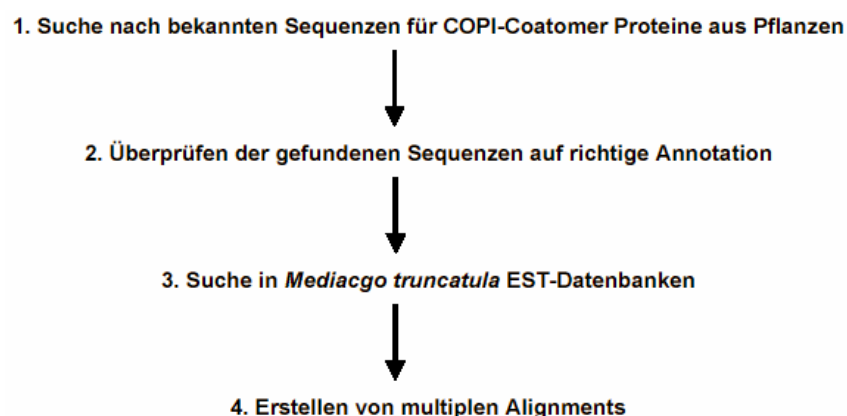


Abb. 4.1. Flußschema der Strategie zur Identifizierung von *M. truncatula* EST-Sequenzen mit Homologien zu COPI-Coatomer-Untereinheiten.

Die Anwendung der Strategie und deren Resultate werden in diesem Teil der Ergebnisse detailliert beschrieben.

4.1.1. Suche nach bekannten Sequenzen für COPI-Coatomer Proteine aus Pflanzen

Zur Suche nach Homologen von COPI-Coatomerproteinen aus Pflanzen wurde die SwissProt Datenbank (<http://www.expasy.org>) genutzt. In dieser werden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von bereits charakterisierten und hypothetischen Proteinen aller Organismen gesammelt. Die Datenbank kann mit Schlüsselworten nach spezifischen Einträgen durchsucht werden. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß ähnlich Gene oft sehr unterschiedlich annotiert sind und die Suche nur mit verschiedenen Schlagworten zum Erfolg führt. Für die Suche nach COPI-Coatomer Proteinen erwiesen sich Begriffe wie „COP“, „Coat“, „Coatomer“ oder insbesondere „non-Clathrin“ und „Coatomer-like“ als besonders erfolgreich. Als Ergebnis wurde von der Datenbank eine lange Liste mit Einträgen erstellt, die zweckmäßigerweise nach Begriffen wie „*Arabidopsis*“, „*thaliana*“, „*Medicago*“, „*truncatula*“, „*Glycine*“, „*max*“, usw. durchsucht wurde. In den meisten Fällen erwies sich dabei *A. thaliana* als einzige Quelle für Sequenzen von pflanzlichen Coatomer-Proteinen. Allerdings waren diese nur spekulativen Charakters. Die Datenbankeinträge waren für fast alle Proteine mit dem Zusatz „putative“ versehen, d.h. die Zuordnung der Proteine erfolgte nur über Sequenzähnlichkeiten mit tierischen Coatomer-Proteinen, nicht jedoch aufgrund einer funktionellen Charakterisierung. Insgesamt konnten für alle der sieben bekannten Coatomer-Untereinheiten entsprechende Homologe gefunden werden:

	Protein	Organismus	Acc. no.	bp/aa	kDa	pI
1	α-Coatomer	<i>A. thaliana</i>	AAD23693	3654/1218	136,47	6,73
2	β-Coatomer	<i>A. thaliana</i>	CAB79867	2874/958	107,3	5,84
3	β`-Coatomer	<i>A. thaliana</i>	BAB02664	2733/911	102,57	4,69
4	δ-Coatomer	<i>A. thaliana</i>	AAK96849	1581/527	57,73	5,8
5	ε-Coatomer	<i>A. thaliana</i>	AAM98315	879/293	32,66	5,09
6	γ-Coatomer	<i>A. thaliana</i>	CAB80162	2493/831	92,56	5,11
7	ζ-Coatomer	<i>G. max</i>	BAA92779	540/180	20,08	4,64

Tab. 4.1.: Pflanzliche COPI-Coatomer-Proteine. Für alle Proteine sind die Länge der codierenden Sequenz in Basenpaaren (bp) und die Länge der Aminosäuresequenz (aa) angegeben. Des weiteren sind das Molekulargewicht in kDa und der isoelektrische Punkt (pI) aufgeführt. Die Accession number gibt an, mit welcher Nummer die Proteine in Datenbanken eingetragen sind. *A. thaliana* = *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *G. max* = *Glycine max* (Sojabohne).

Arabidopsis thaliana war die einzige Pflanze, für die das komplette Set aus sieben COPI-Coatomer Proteinen gefunden werden konnte (*A. thaliana* ζ-Coatomer Acc. no.: AAO22718). Diese waren zudem in verschiedenen Isoformen in der Datenbank vertreten. Für andere Pflanzen hingegen fanden sich nur vereinzelte oder, wie für *M. truncatula*, gar keine Einträge für Coatomer-Untereinheiten in SwissProt.

4.1.2. Überprüfung der gefundenen Sequenzen auf korrekte Annotation.

Bei der automatischen Annotation von Genen kann es leicht zur falschen Zuordnung kommen, wenn schon vorhandene Datenbankeinträge nicht korrekt sind oder die gefundenen Homologien nur zwischen einzelnen Domänen bestehen. Im nächsten Schritt wurden die gefundenen Sequenzen daher auf richtige Annotation überprüft. Dazu wurde ein Homologievergleich der pflanzlichen

Aminosäuresequenzen mittels BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt und nach konservierten Domänen gesucht.

	Protein	Organismus	Id-Nummer	Identität [%]
1	α -Coatomer	<i>X. laevis</i>	AAH75251	52,8
2	β -Coatomer	<i>H. sapiens</i>	NP_057535	45,6
3	β' -Coatomer	<i>R. norvegicus</i>	AAH88397	55,2
4	δ -Coatomer	<i>B. primigenius</i>	CAA63941	36,2
5	ε -Coatomer	<i>G. Gallus</i>	CAG32434	41
6	γ -Coatomer	<i>X. tropicalis</i>	AAH80897	51,6
7	ζ -Coatomer	<i>D. rerio</i>	NP_571583	39

Tab. 4.2.: Ein Homologievergleich offenbart große Ähnlichkeiten zwischen pflanzlichen und tierischen Coatomer-Proteinen. Aufgelistet sind die Sequenzen, welche die höchste Homologie zu den pflanzlichen Coatomerproteinen (Tab. 4.1.) zeigten. In der letzten Spalte ist angegeben, zu welchem Prozentsatz tierische und pflanzliche Sequenz identisch waren. *X. laevis* = *Xenopus laevis* (Krallenfrosch), *H. sapiens* = *Homo sapiens* (Mensch), *R. norvegicus* = *Rattus norvegicus* (Wanderratte), *B. primigenius* = *Bos primigenius* (Hausrind), *G. gallus* = *Gallus gallus* (Huhn), *X. tropicalis* = *Xenopus tropicalis* (afrikanischer Krallenfrosch), *D. rerio* = *Danio rerio* (Zebrafisch). In Anhang 1 (Abb. 7.1.) finden sich als Zusatz phylogenetische Bäume, die den Verwandtschaftsgrad pflanzlicher und tierischer Coatomerproteine graphisch darstellen.

Für alle in der SwissProt Datenbank eingetragenen pflanzlichen Coatomer-Proteine konnten durch Homologievergleiche Identitäten zwischen 36% und 55% zu entsprechenden Proteinen aus dem tierischen System festgestellt werden. Die großen Untereinheiten α -Coatomer (136 kDa), β -Coatomer (107 kDa), β' -Coatomer (103 kDa) und γ -Coatomer (93 kDa) erwiesen sich dabei als höher konserviert (46% bis 55% identisch) als die kleinen Untereinheiten δ -Coatomer (58 kDa), ε -Coatomer (33 kDa) und ζ -Coatomer (20 kDa) (36% bis 41% identisch). Ein Vergleich der Domänenstruktur der Proteine führte zu dem Ergebnis, daß die pflanzlichen Homologe exakt die gleichen Domänen enthielten wie die tierischen Coatomer-Proteine:

	Protein	Tier	Pflanze
1	α -Coatomer	WD40, Coatomer_WDAD, COPI_C, COG2319	WD40, Coatomer_WDAD, COPI_C, COG2319
2	β -Coatomer	Adaptin_N, COG5096	Adaptin_N, COG5096
3	β' -Coatomer	WD40, Coatomer_WDAD	WD40, Coatomer_WDAD
4	δ -Coatomer	Adap_comp_sub	Adap_comp_sub
5	ε -Coatomer	Coatomer_E	Coatomer_E, TPR
6	γ -Coatomer	Adaptin_N, SEC21	Adaptin_N, SEC21
7	ζ -Coatomer	Clat_adaptor_s	Clat_adaptor_s

Tab. 4.3.: Domänenstruktur pflanzlicher und tierischer Coatomer-Untereinheiten im Vergleich. Die Domänenbezeichnungen folgendes der Nomenklatur unter (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Die hohen Homologien zwischen pflanzlichen und tierischen Coatomer-Untereinheiten und insbesondere das Vorkommen gleicher Domänenstrukturen ließen den Schluß zu, daß die pflanzlichen Coatomer-Proteine korrekt annotiert waren und sie zur Suche nach homologen EST-Sequenzen von *M. truncatula* verwendet werden konnten.

4.1.2. EST-Datenbankanalyse

Zur Suche nach EST-Sequenzen aus *M. truncatula* mit Homologien zu Coatomer-Proteinen wurden die EST-Datenbanken unter NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Datenbank dbEST) und TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi>) mit den entsprechenden Homologen aus *A. thaliana* und *G. max* durchsucht. Dabei konnten für alle Coatomer-Untereinheiten entsprechende EST-Sequenzen gefunden werden:

Coatomer-Protein	Acc. no.	EST Sequenzen von <i>M. truncatula</i> (Acc. no.)
<i>A. thaliana</i> α -COP	AAD23693	TC78665, TC87605, TC82848, TC81826, TC78999
<i>A. thaliana</i> β -COP	CAB79867	TC89513, AL368347, TC77558, EST432480, EST641360, MtBC47C07F1, MtBC15A04F1, NF090G01, NF067C03
<i>A. thaliana</i> β^{\prime} -COP	BAB02664	NF009E04, NF009H04, NF017G08, NF031H03, NF084D0, TC87605, NF105G10, NF115A05, T113580E, NF059H03, NF084H07, NF087A02, TC82717, NF015A04, TC83357, EST641821, TC89186, TC80224
<i>A. thaliana</i> δ -COP	AAK96849	TC86025, TC86026, EST642185, EST646329, NF001E07, NF032B04, NF043H08, NF089A05, NF102C06, NF102H06, MtBA08E03R1, BE325979, TC86028
<i>A. thaliana</i> ε -COP	AAM98315	TC77793 , EST429635, MtBB56B02R1, MtBC16A11F1, NF020B11
<i>A. thaliana</i> γ -COP	CAB80162	AW691305, EST506679, TC84216, NF029C08, AW690179, TC77875, TC77876
<i>G. max</i> ζ -COP1	BAA92779	EST403005, EST457768, EST668977, NF046F01, NF091G07, TC87228 , NF023C07, AJ548103, EST636606, NF101A12, EST5313217, EST318062, NF052B11
<i>G. max</i> ζ -COP2	BAA93004	TC79711

Coatomer-Protein	Größe	Anzahl der ESTs	Abdeckung ORF	Identität
α -COP	3657 bp/1218 aa	5	75.3%	83.1%
β -COP	2874 bp/957 aa	10	89.0%	78.7%
β^{\prime} -COP	2733 bp/910 aa	18	87.7%	71.6%
δ -COP	1581 bp/526 aa	13	98.9%	68.0%
ε -COP	879 bp/292 aa	7	100%	74.8%
γ -COP	2493 bp/830 aa	7	90.0%	75.4%
ζ -COP1	543 bp/180 aa	13	100%	90.6%
ζ -COP2	540 bp/179 aa	1	100%	85.5%

Tab. 4.4.: Zusammenfassung der Suche nach EST-Sequenzen aus *M. truncatula*, die für Coatomer-Proteine codieren. In der oberen Hälfte der Tabelle sind links die Sequenzen mit Informationen zu ihrem Ursprung und Identifikationsnummern (Acc. no.) angegeben, die für die Suche verwendet wurden. Im rechten Teil sind die Identifikationsnummern der homologen EST-Sequenzen aus *M. truncatula* zusammengefaßt. Die Nummern sind dabei entsprechend einer Reihenfolge geordnet, je nachdem welchen Teil der Gesamtsequenz des Proteins die jeweiligen ESTs repräsentierten. Dieses wurde durch das Erstellen von multiplen Alignments ermittelt (siehe Anhang 2, Abb. 7.2.). D.h. Sequenzen, die den N-Terminus des Coatomer-Proteins kodieren, sind zuerst aufgeführt, während EST-Sequenzen, die dem C-Terminus der Proteinsequenz entsprechen, als letzte in der Reihe angegeben sind. In der unteren Hälfte der Tabelle sind die Größe in Basenpaaren (bp) und Aminosäuren (aa) der zur Suche verwendeten Proteine aufgeführt. In der nächsten Spalte ist zusammengefaßt, wie viele homologe EST-Sequenzen jeweils insgesamt gefunden werden konnten. Aus multiplen Alignments (siehe Anhang 2, Abb. 7.2.) konnte abgeschätzt werden, zu wieviel Prozent der jeweilige potentielle open reading frame (ORF) abgedeckt werden konnte und wie hoch die Identität der EST-Sequenzen im Mittel zu den bereits bekannten pflanzlichen Coatomer-Proteinen war.

Wie in Tabelle 4.4. zusammengefaßt, konnten für alle der insgesamt sieben Coatomer-Untereinheiten entsprechende Homologe in *M. truncatula* ermittelt werden. Die Anzahl an gefundenen EST-

Sequenzen war dabei jeweils unterschiedlich hoch und korrelierte nicht mit der Größe der Coatomer-Proteine. Zum Beispiel konnten für die beiden, fast gleich großen Untereinheiten β - und β' -COP 10 bzw. 18 homologe ESTs identifiziert werden. Für die Untereinheit ζ -COP wurden zwei verschiedene Isoformen gefunden, die sich bei nachfolgender Analyse als homolog zu zwei entsprechenden Proteinen aus *G. max* erwiesen. Während für die Isoform ζ -COP1 insgesamt 13 EST-Sequenzen in den Datenbanken eingetragen waren, fand sich für die zweite Isoform ζ -COP2 nur ein einziger homologer EST. Wie sich durch Analyse von multiplen Alignments (Anhang 2, Abb. 7.2.) zeigte, konnte der hypothetische open reading frame (ORF) der einzelnen Coatomer-Untereinheiten zwischen 75% und 99% mit den EST-Sequenzen abgedeckt werden. Für die Untereinheiten ε - und ζ -COP waren tentative consensus (TC) Sequenzen vorhanden, die den ORF sogar zu 100% repräsentierten (TC-Sequenzen werden aus mehreren ESTs zu einer hypothetischen Gesamtsequenz assembliert).

Durch Homologievergleiche mittels BlastP wurden die einzelnen, translatierten EST-Sequenzen anschließend daraufhin überprüft, ob sie konservierte Aminosäuresequenzen enthielten. Dabei konnte festgestellt werden, daß zahlreiche ESTs für Domänen (oder zumindest Teile von ihnen) kodierten, wie sie schon für die entsprechenden Coatomeruntereinheiten aus *A. thaliana* nachgewiesen wurden (Tab. 4.5.).

Protein	Domäne	EST-Sequenzen
α -Coatomer	WD40	TC78665, TC87605
α -Coatomer	Coatomer_WDAD	TC82846
α -Coatomer	COPI_C, COG2319	TC78999, TC81826
β -Coatomer	Adaptin_N	TC89513, AL368347
β -Coatomer	COG5096	TC77558 bis NF067C03
β' -Coatomer	WD40	NF009E04 bis TC82717
β' -Coatomer	Coatomer_WDAD	NF015A04 bis TC80224
δ -Coatomer	Adap_comp_sub	TC86025 bis NF102H06
ε -Coatomer	Coatomer_E	TC77793 bis NF020B11
γ -Coatomer	Adaptin_N	AW691305 to TC77875
γ -Coatomer	SEC21	TC77876
ζ -Coatomer 1	Clat_adaptor_s	EST403005 bis NF052B11
ζ -Coatomer 2	Clat_adaptor_s	TC79711

Tab. 4.5. Die EST-Sequenzen aus *M. truncatula* kodieren für konservierte Domänen, wie man sie typischerweise in Coatomerproteinen findet (Vergleiche auch Tab. 4.3. und Tab. 4.4.).

Die ermittelten EST-Sequenzen aus *M. truncatula* erwiesen sich als hochkonserviert im Vergleich zu den entsprechenden Homologen aus *A. thaliana*. Sie zeigten hohe Homologien zu den Proteinen aus *A. thaliana* (Tab. 4.4.) und enthielten exakt die gleichen, für Coatomerproteine typischen Domänen (Tab. 4.5.).

4.2. Herstellung von cDNA-Banken aus verschiedenen Geweben von *Medicago truncatula*

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Isolierung von Sequenzen aus *Medicago truncatula*, die für regulatorische und strukturelle Bestandteile von COPI-coated Vesikeln codieren. Dieses bildete eine wichtige Grundlage für die spätere *in vivo* Lokalisierung der entsprechenden Proteine. Um Zeit und Material während der Isolierung zu sparen, wurden Adaptor-ligierte cDNA-Banken aus verschiedenen

Gewebe von *M. truncatula* hergestellt. Die cDNA-Banken bieten den Vorteil der ständigen Verfügbarkeit, d.h. es muß nicht ständig wieder RNA in cDNA umgeschrieben werden, sie repräsentieren hoch-angereichert die mRNA eines spezifischen Gewebes und sind insbesondere für die Isolierung von unbekannt Genen durch RACE (random amplification of cDNA ends) PCR geeignet.

Jede cDNA-Bank repräsentiert dabei das Transkriptom eines Ausgangsgewebes zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung. Dabei spiegelt eine cDNA-Bank im Prinzip die Expressionsstärke eines Gens zu dem gewählten Zeitpunkt wieder. Die cDNA von Genen mit einem hohen Transkriptionslevel ist häufiger in einer Bank repräsentiert als von solchen, die nur in geringem Ausmaß transkribiert werden. Diese Regel gilt allerdings nur für gleich lange Sequenzabschnitte, da lange mRNA-Sequenzen naturgemäß mit geringerer Effizienz vollständig zu cDNA umgeschrieben werden. Jede cDNA-Bank enthält also eine Schar von Sequenzen die abhängig von ihrer Expressionsstärke und ihrer Länge vertreten sind. Bedingt durch entwicklungspezifische Prozesse oder biotische/abiotische Faktoren werden nicht zu jedem Zeitpunkt alle Gene eines Organismus gleichzeitig abgelesen. Es empfiehlt sich daher, cDNA-Banken aus unterschiedlichen Geweben anzulegen, um einen möglichst großen Genpool zu erfassen. Für die Erstellung von cDNA-Banken aus *Medicago truncatula* wurden daher neben Blattmaterial symbiontische Gewebe wie Wurzelknöllchen und mykorrhizierte Wurzeln als Material zur RNA-Isolierung verwendet. Des weiteren wurden Pflanzen verwendet, die mit einem aus Hefe isolierten Elicitor behandelt worden waren, um die Expression von abwehrrelevanten Genen zu induzieren. Die cDNA-Banken sollten neben „Haushaltsgenen“ so ein möglichst breites Spektrum an Genen abdecken, die nur unter symbiontischen- oder Streßbedingungen exprimiert werden.

Die Strategie zur Herstellung der Adaptor-ligierten cDNA-Banken gliederte sich in drei Abschnitte:

1. Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben
2. Isolierung von mRNA
3. Synthese doppelsträngiger cDNA und Ligation von speziellen Adaptorsequenzen an beide Enden der cDNA

4.2.1. Überprüfung der Mykorrhizierung von *M. truncatula*

Bevor allerdings mit Punkt 1, der Isolierung von Gesamt-RNA gestartet werden konnte, mußte zunächst ein Nachweis auf Mykorrhizierung von *M. truncatula* geführt werden.

Die Knöllchensymbiose von *M. truncatula* ist leicht an den gebildeten Wurzelknöllchen zu erkennen (Gage, 2004). Als sichtbares Zeichen der erfolgreichen Nodulation werden Wurzelknöllchen mit einer Länge von mehreren Millimetern gebildet. Im Gegensatz dazu kann für die Mykorrhizasymbiose die Kolonisation der Wurzeln durch den Pilz nur durch geeignete Färbetechniken nachgewiesen werden (Gange *et al.*, 1999). Zwar können bei Betrachtung von Wurzelabschnitten unter dem Stereomikroskop extraradikale Hyphen erkannt werden, dieses läßt jedoch keine Rückschlüsse auf den Mykorrhizierungsgrad zu. Vor der Isolierung von RNA wurden daher ausgewählte Wurzelabschnitte der verwendeten Pflanzen auf die Ausbildung von symbiosespezifischen Strukturen überprüft.

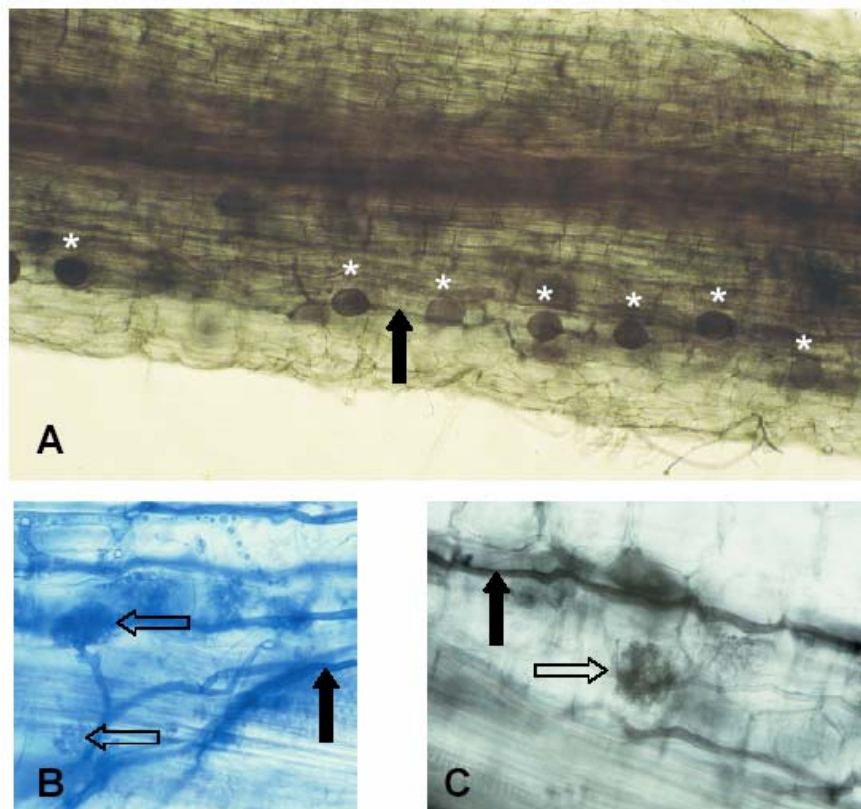


Abb. 4.1.: Überprüfung der Mykorrhizierung von *M. truncatula* durch *Glomus mosseae* BEG12 durch Mikroskopie angefärbter Wurzelabschnitte.

A. Färbung mit Chlorazol Black E. Der Zentralzylinder mit den Leitelementen erscheint als dunkler, leicht bräunlich gefärbter Strang in der Mitte der Wurzel. Der Farbstoff lagert sich bei *M. truncatula* zu einem geringen Teil auch in den Leitelementen ab und führt zu deren Verfärbung. Mykorrhizastrukturen hingegen sind deutlich schwarz gefärbt. Im Wurzelkortex treten Vesikel, die dem Pilz als Speicherorgan für Lipide dienen (van Aarle & Olsson, 2003), als ovale Strukturen hervor (markiert durch weiße Sterne). Hyphenstrukturen durchziehen als unregelmäßig geformte Strukturen die Wurzel und treten an der Wurzeloberfläche hervor (schwarzer Pfeil). Der Zentralzylinder ist frei von Mykorrhizastrukturen, nur der Wurzelkortex wird von dem Pilz kolonisiert. Vergrößerung 100 fach.

B. + C. Färbung von jungen Arbuskeln mit Trypan Blau (B) und Chlorazol Black E (C). Die Abbildungen zeigen Ausschnitte des mykorrhizierten äußeren Wurzelkortex von *M. truncatula*. Die Wurzeln sind apoplastisch von Pilzhypen (offene Pfeile) durchzogen, die an einigen Stellen in Zellen eingedrungen sind und sich zu Arbuskeln differenzieren (schwarze Pfeile). Die Arbuskeln sind ein typisches Merkmal einer Symbiose mit Pilzen der VAM- (vesikulär arbuskuläre Mykorrhiza) Klasse und bilden die Organe, an denen der Stoffaustausch zwischen den beiden Organismen energetisiert wird (Smith & Smith, 1989; Strack *et al.*, 2003). Vergrößerung 400 fach.

Mit den Farbstoffen Chlorazol Black E und Trypan Blau konnte die erfolgreiche Kolonisierung von *M. truncatula* mit *Glomus mosseae* BEG12 nachgewiesen werden. In den gefärbten Wurzelstückchen zeigten sich typische symbiontische Strukturen wie Vesikel und Arbuskeln (Abb. 4.1.). Durch Quantifizierung von kolonisierten gegen nicht-kolonisierte Wurzelabschnitte konnte ein durchschnittlicher RLC-Wert (root length colonized, McGonigle *et al.*, 1990) von ca. 15 % ermittelt werden. Zur Isolierung von RNA wurde Wurzelgewebe von parallel angezogenen Pflanzen verwendet, das nicht zuvor angefärbt worden war.

4.2.2. Synthese Adaptor-ligierter cDNA aus verschiedenen Geweben von *M. truncatula*

Als Ausgangsmaterial für die Erstellung von cDNA-Banken wurde Gesamt-RNA aus jeweils 1g Pflanzengewebe isoliert. Vor der Isolierung von mRNA wurde die Gesamt-RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Qualität hin überprüft, sowie der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Dabei konnten folgende Mengen an isolierter Gesamt-RNA ermittelt werden (Tab. 4.6.):

Alter	Gewebe	Gesamt-RNA [mg]
6 Wochen	Blatt	12,4
6 Wochen	mykorrhizierte Wurzeln (<i>Glomus mosseae</i>)	2,5
6 Wochen	ganze Pflanzen, behandelt 25h mit 100 µg/ml Hefeelictor	7,1
6 Wochen	Knöllchen (<i>S. meliloti</i> 2011)	5,3

Tab. 4.6.: Mengen an isolierter Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von *M. truncatula* cv. Jemalong. Die Pflanzen wurden wie unter 3.4.1. beschrieben angezogen und die Gesamt-RNA nach der unter 3.7.4. beschriebenen Methode gewonnen.

Die isolierte Gesamt-RNA enthält eine Mischung aus mRNA, rRNA und tRNA, wobei die mRNA nur einen Anteil von 1-2 % ausmacht. Für die Herstellung von cDNA-Banken ist daher eine Anreicherung der mRNA sinnvoll. Zur Konzentrierung der mRNA wurde das PolyAtract™-System der Firma Promega verwendet. Dabei wurde die mRNA aus der Gesamt-RNA unter Verwendung von Oligo-dT-Primern isoliert, die an magnetische Partikel gebunden waren. Die mRNA ist im Gegensatz zur tRNA und rRNA am 3'-Ende polyadenyliert, so daß nur diese sich an die Oligo-dT-Primer binden kann. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Oligo-dT-Primern ist, daß überwiegend full-length-mRNA isoliert wird. Degradierete mRNA ohne PolyA-Tail kann nicht an die Oligo-dT-Primer binden und wird daher nicht aus dem RNA-Mix extrahiert. Jeweils insgesamt 1 mg Gesamt-RNA wurde zur Isolierung der mRNA verwendet. Mittels des PolyAtract™-Kits konnte für alle Proben erfolgreich mRNA aus der Gesamt-RNA extrahiert werden. Insgesamt konnten folgende mRNA-Mengen isoliert werden (Tab. 4.7.):

Quelle	A ₂₆₀	A _{260/280}	mRNA [ng/µl]	mRNA gesamt [µg]
Blätter	1,378	4,1	110,2	22
myc ⁺ -Wurzeln	0,158	2,1	12,6	2,5
elicitierte Pflanzen	0,596	3,3	47,6	9,5
Knöllchen	0,152	1,6	7,6	3

Tab. 4.7.: Gesamtmenge der aus verschiedenen Geweben von *M. truncatula* isolierten mRNA.

Zur Prüfung der Qualität der mRNA wurde diese anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Die mRNA bildete dabei in einem gewissen Bereich der einzelnen Bahnen einen gleichmäßigen Schmier. Die für Gesamt-RNA typischen Banden der 18S und 28S rRNA konnten nicht mehr detektiert werden:

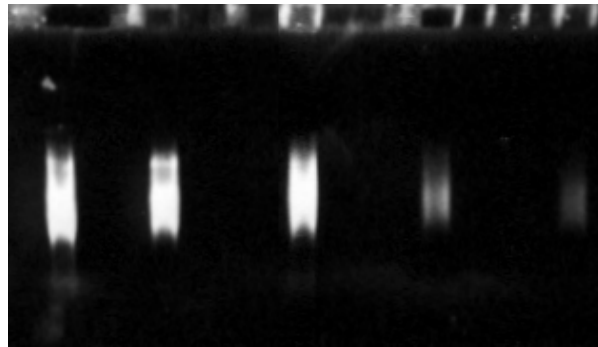


Abb. 4.2.: Aus verschiedenen Geweben von *M. truncatula* isolierte mRNA. Von links nach rechts: 2 µg mRNA aus Blättern, 1 µg mRNA aus Knöllchen, 2 µg mRNA aus elicitierten Pflanzen, 0,5 µg mRNA aus mykorrhizierten Wurzeln, 2 µg positive Kontrollprobe.

Für die nachfolgende Synthese von cDNA-Banken wurde das „Marathon™ cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech verwendet, mit dem sich Adaptor-ligierte cDNA-Banken erzeugen lassen. Jeweils 1 µg der isolierten mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und in einer abschließenden Reaktion spezifische, teilweise doppelsträngige Adaptoren an beide Enden der cDNA angefügt (Für Informationen zur Struktur der Adaptorsequenzen siehe 3.7.6). Durch Auftragen von jeweils 2 µl aus den Reaktionsansätzen auf ein Agarosegel wurde die Qualität der cDNA-Banken überprüft:

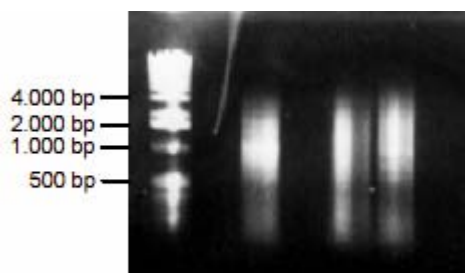


Abb. 4.3.: Überprüfung der mittels des Marathon™ cDNA Amplification Kit erstellten cDNA-Banken. Es wurden je 2 µl jeder Bank auf das Gel aufgetragen. Von links nach rechts: Marker, cDNA-Bank aus *M. truncatula* Blättern, cDNA-Bank aus *M. truncatula* mykorrhizierten Wurzeln, cDNA-Bank aus *M. truncatula* elicitierten Pflanzen.

Die Überprüfung der cDNA-Banken mittels Agarose-Gelelektrophorese ergab jeweils einen Schmier in einem Größenbereich bis ca. 4 kb. Der Schmier setzte sich aus den verschiedenen großen, einzelnen cDNAs zusammen. Offensichtliche Hinweise auf Degradierung der cDNA, wie eine Auftrennung in verschiedenen, distinkten Banden, konnten daher nicht gefunden werden.

4.3. Isolierung einer Sequenz für das Regulatorprotein der COPI-Vesikel Biogenese, der kleinen GTPase Arf1, aus cDNA-Banken von *M. truncatula*

Nach Abschluß der entsprechenden Vorarbeiten (EST-Datenbankrecherche und Herstellung von cDNA) stand als nächste Aufgabe die Isolierung von regulatorischen und strukturellen Bestandteilen von COPI-coated Vesikeln aus den erstellten *M. truncatula* cDNA-Banken an.

Im Vorfeld dieser Arbeit war bekannt, daß das kleine G-Protein Arf1 im tierischen System die Bildung von COPI-coated Vesikeln an der Golgi-Membran reguliert (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998). Die *in vivo* Lokalisation von Arf1 war daher von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit. Das

Interesse wurde weiterhin verstärkt durch die Identifizierung einer Sequenz für das kleine G-Protein Arf1 in einer SSH-Bank (single-strand subtractive Hybridization) von Erbse durch PD P. Franken (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg). Die SSH-Bank war durch Hybridisierung von RNA aus mykorrhizierten Erbsen gegen eine arbuskelfreie Erbsenmutante erstellt worden. Der entsprechende Sequenzabschnitt wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

```
5'-CTTACCCGTGTGGGATGTCGGGGGTCAGGACAAGATCSGTCCCTTGTGGAGGCRCTACTTCCAGAACAC
TCAGGGTCTTATATTTGTTGTAGACAGCAATGACAGGGATAGADTTGTTGAGGCCARAGATGAGTTACATAGA
ATGTTGAATGAGGATGRACTGADARAXGCAGTATTGCTTGTCTTTGCTAAVAAACAAGATCTTCCAAAKGSAA
TGAATGCGYCTGAAATTACTGACAAGTTGGGTCTTCACTCTTTGGAACAGCGCCACTGGGTAMCTGCCCGRX
MXXCCGCTCGAAATBACYAGTKRATTTCGCcGGCCGCCTGcAGGTCSACSRTATKGGG-3'
```

```
FTVWVDVGGQDKIXPLWRXYFQNTQGLIFVDSNDRDRXVEAXDELHRMLNEDLXXAVLLVFAXKQDLPXXMNA
AEITDKLGLHSLEQRHWVXARXXARNXXXIRRPPAGXXYX
```

Abb. 4.4.: Partieller Sequenzabschnitt für *Arf1* aus einer SSH-Bank von Erbse. Die Nukleotid- und korrespondierende Aminosäuresequenz sind angegeben.

Der Sequenzabschnitt aus Erbse wurde in einen Abschnitt aus 114 Aminosäuren übersetzt (Abb. 4.4.) und mittels BlastP auf seine Validität überprüft. Für die Sequenz konnten dabei entsprechende Homologien zu Arf-Proteinen anderer Pflanzen gefunden werden (siehe auch Anhang 3.1):

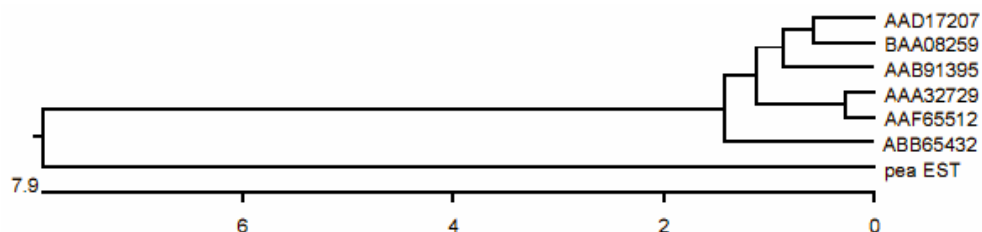


Abb. 4.5. Eine phylogenetische Analyse offenbart die Verwandtschaft der EST-Sequenz aus Erbse zu bekannten Sequenzen für Arf-Proteine aus Pflanzen. Die Skala gibt die Anzahl an Austauschen pro 100 Aminosäuren an.

AAA32729 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) ADP-ribosylation factor, AAB91395 *Vigna unguiculata* (Wicke) ADP-ribosylation factor, AAD17207 *Glycine max* (Sojabohne) ADP-ribosylation factor, AAF65512 *Capsicum annuum* (Paprika) ADP-ribosylation factor, ABB65432 *Oryza sativa* (Reis) Arf1, BAA08259 *Daucus carota* (Karotte) ADP-ribosylation factor.

In der Sequenz aus Erbse konnte dabei eine Aminosäureabfolge identifiziert werden, wie sie für die hochkonservierte G3-Box kleiner G-Proteine der Untergruppe Arf typisch ist (Abb. 4.4., rot markiert). Aufgrund der aufgefundenen Homologien wurde die Sequenz aus Erbse daher anschließend zur Suche nach EST-Sequenzen für Arf1 in entsprechenden Datenbanken von *M. truncatula* genutzt. Da die Qualität der Sequenz in 3'-Richtung allerdings erheblich nachließ, wurde zur Suche nur ein 155 Basen langer Abschnitt, entsprechend einer Länge von 51 Aminosäuren, verwendet.

Durch Suche in den EST-Datenbanken von TIGR und NCBI konnten fünf ESTs für *M. truncatula* mit entsprechenden Homologien identifiziert werden (7.3.2.). Die erhaltenen Sequenzen wurden in die Aminosäureabfolge übersetzt und mittels BlastP-Suche überprüft. Für alle ESTs konnten Homologien zum kleinen G-Protein Arf1 nachgewiesen werden (7.3.2.). Die EST-Sequenzen repräsentierten den entsprechenden open reading frame (ORF) allerdings nur partiell, so daß eine Amplifikation des gesamten Gens nicht möglich war und eine Strategie zur Isolierung der Gesamtsequenz entwickelt werden mußte:

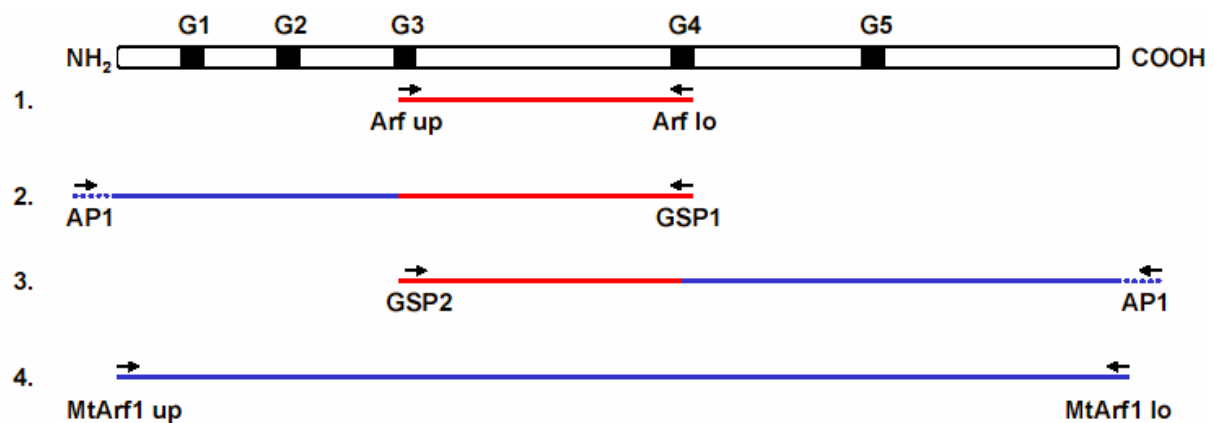


Abb. 4.6. Strategie der Isolierung einer Sequenz für *MtArf1* aus *M. truncatula* cDNA-Banken. Die Abbildung verdeutlicht die Lage der Primer, die für die einzelnen Schritte verwendet wurden.

1. Amplifikation einer partiellen Sequenz von *MtArf1* zwischen den hochkonservierten G-Boxen 3 und 4 mittels der Primer Arf up und Arf lo. 2 und 3. 3'- und 5'-RACE PCR mittels der genspezifischen Primer GSP1 und GSP2 und dem Adaptor Primer AP1. 4. Amplifikation des gesamten ORFs für *MtArf1* mittels der Primer MtArf up und MtArf lo.

4.3.1. Isolierung eines *MtArf1*-spezifischen Sequenzabschnitts

In dem multiplen Alignment der translatierten EST-Sequenzen (7.3.2.) konnten die beiden hochkonservierten G-Boxen 3 (WDVGGQD) und 4 (NKQD) identifiziert werden. Diese erschienen für die Generierung von spezifischen Primern als besonders geeignet. Gegen die beiden Abschnitte wurden die spezifischen Primer Arf up und Arf lo konstruiert (Abb 4.6.). Mit diesen konnten aus verschiedenen cDNA-Banken von *M. truncatula* jeweils ca. 200 bp große Produkte amplifiziert werden. Die Produkte wurden über durch die zur Amplifikation verwendete Taq-Polymerase angefügte Adenosin-Überhänge in den Vektor pGEM-Teasy kloniert (T-overhang vector). Nach Transformation in *E. coli* wurden positive Klone durch Blau/Weiß-Selektion auf IPTG/X-Gal-haltigen Medien identifiziert. Die nachfolgende Sequenzierung von insgesamt 10 unabhängigen Klonen führte zur Identifizierung von Nukleotidsequenzen mit einer Länge von jeweils 196 bp. Mittels eines multiplen Alignments konnte festgestellt werden, daß alle Sequenzen, bis auf eine einzige Ausnahme, jeweils unterschiedlich waren (7.3.3.). Es fand sich immer mindestens ein Austausch in der Nukleotidsequenz. Nach Übersetzung der sequenzierten Abschnitte in die jeweilige Aminosäureabfolge relativierte sich dieses Ergebnis allerdings wieder. Von den 10 sequenzierten Abschnitten zeigten sich 9 in ihrer Aminosäuresequenz identisch (7.3.3.). So konnte folgende Konsensussequenz ermittelt werden:

DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELRDVALLVFANKQDLP

Mit blau gekennzeichnet sind die hochkonservierten Bereiche, gegen die die Primer Arf up und Arf lo gerichtet waren. Ein Homologievergleich des Abschnitts ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit entsprechenden Abschnitten von Arf-Proteinen aus *Daucus carota* (P51822), *Arabidopsis thaliana* (AAF04868), *Glycine max* (AAD17207), *Oryza sativa* (AAB65432) und *Zea mays* (P49076).

4.3.2. Amplifizierung des 5` und 3`-Endes von *MtArf1* durch RACE-PCR

Nach der erfolgreichen Identifizierung eines internen Sequenzabschnitts für *MtArf1* zwischen den G-Boxen 3 und 4 stand als nächster Schritt die Aufklärung der unbekannt Sequenzen des Genanfangs und –endes an. Um die Frage zu lösen, konnten die Adaptor-ligierten cDNA-Banken von *M. truncatula* genutzt werden. Diese sind aufgrund ihrer Struktur mit den an beide Enden ligierten Adaptor-Sequenzen ideal für RACE-PCR Reaktionen geeignet (3.7.6.).

Der unter 4.3.1. ermittelte Sequenzabschnitt für *MtArf1* wurde als Vorlage für die Generierung von entsprechenden genspezifischen (GSP) RACE-Primern genutzt. Diese wurden wieder gegen die hochkonservierten Sequenzen generiert, die für die G-Boxen 3 und 4 kodieren. Für die 5`-RACE-Reaktion wurden die Primer Arf1 5`-RACE und der gegen die Adaptorsequenz gerichtete Primer AP1 (Adaptor Primer 1) verwendet, für die 3`-RACE-Reaktion die Primer Arf1 3`-RACE und AP1. Die Lage der genspezifischen RACE-Primer war dabei so gewählt, daß die entstehenden PCR Produkte im Bereich der Sequenzen zwischen den beiden G-Boxen überlappen sollten (Abb. 4.6.).

Mittels PCR konnten aus *M. truncatula* cDNA-Banken ein 5`-RACE-Produkt von ca. 480 bp und ein 3`-RACE-Produkt von ca. 430 bp amplifiziert werden. Durch Sequenzierung konnten Abschnitte einer Länge von 456 bp bzw. 407 bp ermittelt werden:

5`-RACE-Produkt

```
TCGCGTTTTGCTCTTCTCTTCAAATATCTCAGATCGAAGAAAAAAGAGCGATTTGTGTAGGTGAAAATGGG
GTTAACGTTACGAAGCTGTTTCAGTAGGTTGTTTGCGAAGAAGGAGATGAGAATTTTATGTTAGGTCTCGA
TGCGGCTGGTAAGACTACTATTTTGTATAAATTGAAGCTTGAGAAATCGTTACTACCATCCCTACCATTGGA
TTAATGTTGAAACCGTGGAGTACAAGAACATCAGCTTCACCGTGTGGGATGTCGGGGGTCAGGACAAGATC
CGCCATTGTGGAGGCACTACTTCCAGAACACCCAGGGTCTTATTTTTGTGGTTGATAGCAATGATAGAGAC
CGGGTGGTTGAGGCAAGGGATGAGTTGCACAGGATGTTGAATGAGGATGAACTTAGAGATGCTGTTTTGCTT
GTTTTGCCAACAAACAAGATCTTCC
```

3`-RACE-Produkt

```
TGTCGGGGGTCAGGACAAGATCCGCCATTGTGGAGGCACTACTTCCAGAACACCCAGGGTCTTATTTTTGT
GGTTGATAGCAATGATAGAGACCGGGTGGTTGAGGCAAGGGATGAGTTGCACAGGATGTTGAATGAGGATG
AACTTAGAGATGCTGTTTTGCTTGTTTTTGCCAACAAACAAGATCTTCCAAATGCAATGAATGCTGCAGAAATA
ACTGACAACTTGGACTTCATTCTCTCCGCCAACGCCACTGGTATATTCAGAGCACTTGTGCAACTTCTGGAG
AGGGTCTTACGAGGGTTAGACTGGCTTCTAACAAACATTGCAAGCAAGGCATAATGAGACATTTGAACAAT
TTGGGTGTGATCTGATCATTCTCTGAGTCTGGGTGGTTCTTTGG
```

Durch eine BlastN-Abfrage konnte sowohl für das 5`- als auch für das 3`-RACE-Produkt die Homologie zu Arf1-Proteinen bestätigt werden. Eine nachfolgende Analyse beider Produkte ergab für jede Sequenz einen untranslatierten Bereich (schwarz) sowie einen Abschnitt mit einem durchgehenden offenen Leserahmen (blau + rot markierter Sequenzabschnitt). Da sich beide Produkte in einem Bereich überlappen sollten, wurden diese nach entsprechenden Sequenzhomologien untersucht. Dabei konnte ein identischer Bereich mit einer Länge von 192 bp identifiziert werden (rot markiert). Dieser entsprach, wie erwartet, genau dem zuvor ermittelten internen Sequenzabschnitt zwischen den G-Boxen 3 und 4 von *MtArf1*. Beide Produkte konnten daraufhin zu einer Gesamtsequenz von 676 bp assembliert werden. Diese gliederte sich in eine 68 bp große 5`-UTR (untranslated region), einen hypothetischen open reading frame (ORF) von 546 bp und eine 3`-UTR von 62 bp.

4.3.3. Amplifizierung und Analyse der Gesamtsequenz von *MtArf1*

Zur Isolierung des Gens *MtArf1* aus cDNA-Banken von *M. truncatula* wurde die Sequenzinformation aus der 5'- und 3'-RACE-Sequenz zur Generierung von spezifischen Primern genutzt. Die beiden Primer *MtArf1* up und *MtArf1* lo wurden exakt gegen die Enden des offenen Leserahmens in den beiden RACE-PCR-Produkten konstruiert, so daß sie den kompletten open reading frame umspannen sollten (Abb.4.6.).

Durch PCR konnte, unter Verwendung der beiden Primer *MtArf1* up und *MtArf1* lo, aus allen *M. truncatula* cDNA-Banken ein Produkt von 546 bp amplifiziert werden. Das abgeleitete Protein hatte eine Länge von 181 Aminosäuren mit einer theoretischen Masse von 20737 Da und einem isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 6,8. Durch Analyse der Primärsequenz konnten für das Protein eine ganze Reihe charakteristischer Merkmale für kleine G-Proteine der Untergruppe Arf entdeckt werden (Abb. 4.7.). Genau betrachtet enthielt die Sequenz auffälligerweise exakt die gleichen hochkonservierten Aminosäurereste in den entsprechenden Positionen, wie sie für Arf1 aus *Homo sapiens* beschrieben waren (Abb 2.6.):

```

1   atgggggtaacgttcacgaagctgttcagtaggttgtttgccaagaaggagatgagaatt 60
1   M  G  L  T  F  T  K  L  F  S  R  L  F  A  K  K  E  M  R  I  20

61  ttgatggttaggtctcgcgatgcggtgtaagactactatTTTTgtataaattgaagcttggaa 120
21  L  M  V  G  L  D  A  A  G  K  T  T  I  L  Y  K  L  K  L  G  40

121 gaaatcggtactaccatccctaccattggatttaagtgttgaaccgtggagtacaagaac 180
41  E  I  V  T  T  I  P  T  I  G  F  N  V  E  T  V  E  Y  K  N  60

181 atcagcttcaccgtgtgggatgtcgggggtcaggacaagatccgcccattgtggaggcac 240
61  I  S  F  T  V  W  D  V  G  G  Q  D  K  I  R  P  L  W  R  H  80

241 tacttccagaacacccagggctcttTTTTgtggtgatagcaatgatagagaccgggtg 300
81  Y  F  Q  N  T  Q  G  L  I  F  V  V  D  S  N  D  R  D  R  V  100

301 gttgaggcaagggatgagttgcacaggatgttgaatgaggatgaacttagagatgctggt 360
101 V  E  A  R  D  E  L  H  R  M  L  N  E  D  E  L  R  D  A  V  120

361 ttgcttgtTTTTgccaacaacaagatcttccaaatgcaatgaatgctgcagaaataact 420
121 L  L  V  F  A  N  K  Q  D  L  P  N  A  M  N  A  A  E  I  T  140

421 gacaaaacttgacttcattctctccgccaacgccactggatatattcagagcacttgtgca 480
141 D  K  L  G  L  H  S  L  R  Q  R  H  W  Y  I  Q  S  T  C  A  160

481 acttctggagagggtctttacgagggttagactggctttctaacaacattgcaagcaag 540
161 T  S  G  E  G  L  Y  E  G  L  D  W  L  S  N  N  I  A  S  K  180

541 gcataa
181 A  *

```

Abb. 4.7. Analyse der Primärstruktur der mittels der Primer *MtArf1* up und *MtArf1* lo amplifizierten cDNA-Sequenz aus *Medicago truncatula*. Aufgeführt sind die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz. Sequenzen der konservierten G-Boxen sind fett markiert. Aminosäuren in Switch 1 und Switch 2 sind unterstrichen, die Aminosäureabfolge des Interswitches doppelt unterstrichen. Hydrophobe Aminosäurereste, die die N-terminale amphipatische α -Helix bilden, sind kursiv dargestellt. Der Glycinrest an Position 2 bildet eine Isoprenylierungsstelle, an der ein Myristoylsäurerest angefügt wird. Blau: Aminosäurereste, die eine hydrophobe

Bindungstasche für die N-terminale α -Helix ausbilden. Rot: Aminosäuren, die eine besondere Rolle bei der Interaktion mit GTP spielen.

Dazu gehörten die für Arf1 typischen Sequenzen MVGLDAAGKTTI, IVTTIPTIGF, WDVGGQDKI, VLLVFANKQDLP und TCAT der hochkonservierten G-Boxen 1 bis 5 und die Sequenzen EIVTTIPTIGF, DVGGQDKIRPLWRHY und NVETVEYKISFTV der Switch Domänen 1 und 2, sowie des Interswitches. Verglichen mit Arf1 aus *Homo sapiens* konnten in der translatierten cDNA-Sequenz von *M. truncatula* exakt die gleichen Aminosäureabfolgen gefunden werden. Weiterhin konnten ebenso in den Positionen 31 und 48 Threonin-Reste und in Position 71 ein Glutamin-Rest identifiziert werden. Diese Aminosäuren sind für die Funktion von Arf-Proteinen von außerordentlicher Bedeutung, da sie in die Bindung und Hydrolyse von GTP involviert sind (Scheffzek *et al.*, 1997). Auch die Aminosäurereste Tyr58, Asn60, Ile61 und Phe63, die in Arf1 aus *Homo sapiens* eine hydrophobe Bindungstasche für die N-terminale α -Helix bilden, konnten in der Sequenz aus *M. truncatula* an den gleichen Positionen gefunden werden. Abweichungen in der Primärstruktur fanden sich allerdings am N-Terminus der translatierten cDNA-Sequenz aus *M. truncatula*. Von den insgesamt 17 Aminosäureresten, die im humanen Arf1 die amphipatische α -Helix bilden, waren in der Sequenz aus *M. truncatula* nur 10 identisch. D.h. es gab 7 Abweichungen in der Aminosäureabfolge:

N-Terminus *Homo sapiens* Arf1 1-MGNIFANLFKGLFGKKE-17

N-Terminus *Medicago truncatula* cDNA 1-MGLTFTKLF SRLFAKKE-17

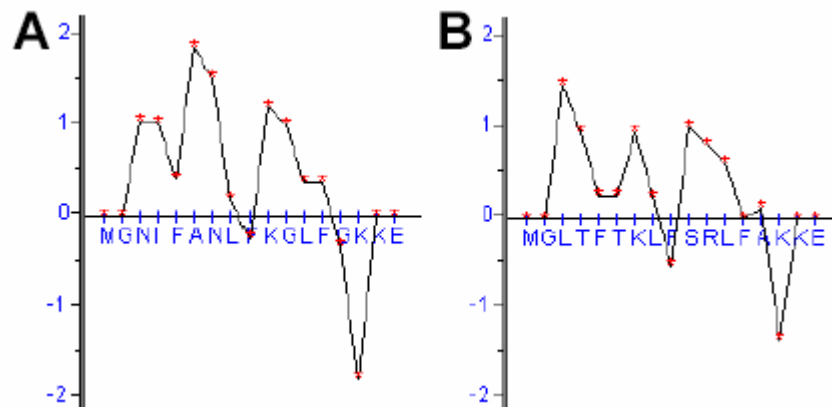


Abb. 4.8. Hydrophobizitätsplots für die ersten 17 Aminosäuren der Sequenz von Arf1 aus *Homo sapiens* (A) und der translatierten Sequenz des cDNA Klons aus *Medicago truncatula* (B).

Ein Vergleich der Sequenzen mittels eines Hydrophobizitätsplots nach der Methode von Kyle & Doolittle (1982) offenbarte jedoch keine wesentlichen Unterschiede in den hydrophoben Eigenschaften beider Aminosäureabfolgen. Zudem konnte auch in der Sequenz aus *M. truncatula* in der zweiten Position ein Glycinrest entdeckt werden, der im humanen Arf1 bekanntermaßen mit einem Myristoylrest modifiziert wird (Franco *et al.*, 1996). Zusammenfassend ließ sich festhalten, daß die cDNA-Sequenz aus *M. truncatula* alle hochkonservierten Motive enthielt, wie man sie in funktionellen kleinen G-Proteinen der Untergruppe Arf findet.

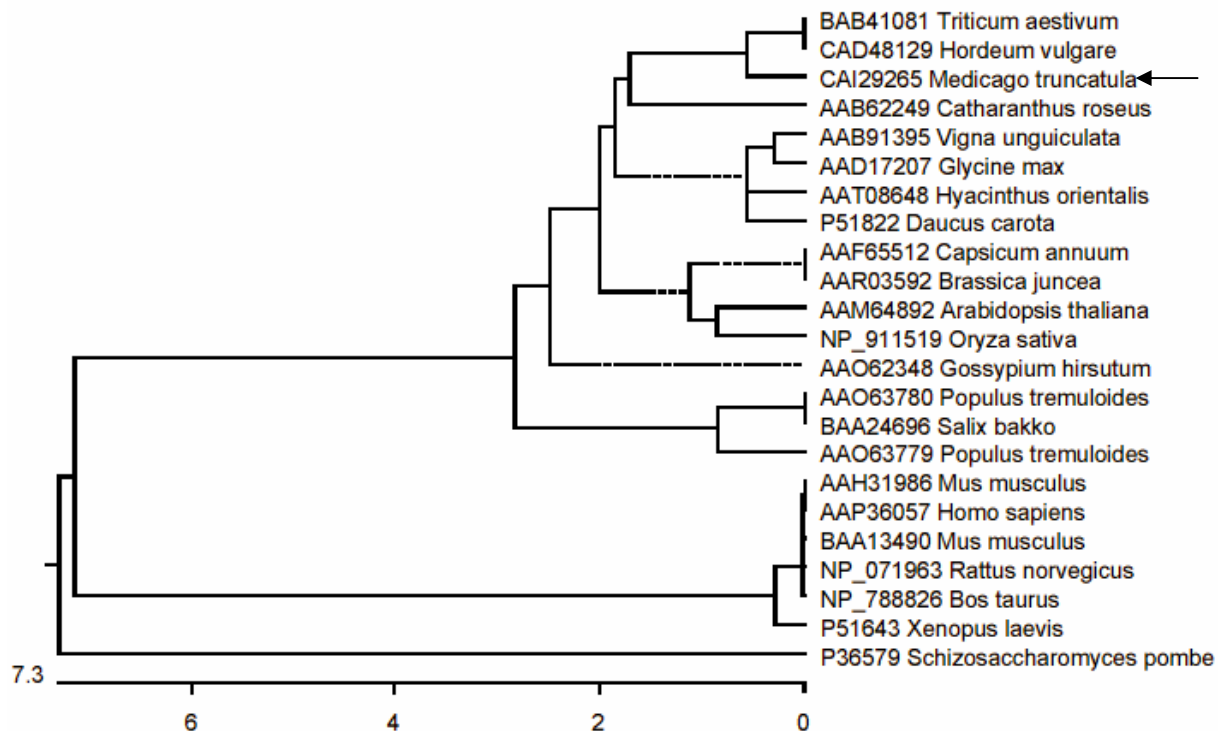


Abb. 4.8. Phylogenetischer Vergleich der Verwandtschaft von *MtArf1* mit bekannten *Arf*-Homologen. Die Skala gibt die Anzahl an Austauschen pro 100 Aminosäuren an.

BAB41081 *Triticum aestivum* (Weizen) ADP-ribosylation factor, CAD48129 *Hordeum vulgare* (Gerste) ADP-ribosylation factor 1-like protein, AAB62249 *Catharanthus roseus* (Madagaskar-Immergrün) ADP-ribosylation factor 1, AAB91395 *Vigna unguiculata* (Wicke) ADP-ribosylation factor, AAD17207 *Glycine max* (Sojabohne) ADP-ribosylation factor, AAT08648 *Hyacinthus orientalis* (Hyazinthe) ADP-ribosylation factor, P51822 *Daucus carota* (Karotte) ADP-ribosylation factor 1, AAF65512 *Capsicum annuum* (Paprika) ADP-ribosylation factor, AAR03592 *Brassica juncea* (Sareptasenf) ARF-like small GTPase, AAM64892 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) ADP-ribosylation factor 1, NP_911519 *Oryza sativa* (Reis) ADP-ribosylation factor 1, AAO63780 *Populus tremuloides* (Amerikanische Zitterpappel) ADP-ribosylation factor 2, BAA24696 *Salix bakko* (Japanische Weide) ADP-ribosylation factor, AAO63779 *Populus tremuloides* (Amerikanische Zitterpappel) ADP-ribosylation factor 1, AAH31886 *Mus musculus* (Hausmaus) ADP-ribosylation factor 1, AAP36057 *Homo sapiens* (Mensch) ADP-ribosylation factor 1, BAA13490 *Mus musculus* (Hausmaus) ARF1, NP_071963 *Rattus norvegicus* (Wanderratte) ADP-ribosylation factor 1, NP_788826 *Bos taurus* (Hausrind) ADP-ribosylation factor 1, P51643 *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) ADP-ribosylation factor 1, P36579 *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) ADP-ribosylation factor 1.

Durch einen Homologievergleich mittels BlastP konnte die Sequenz dabei eindeutig als ein Homolog der kleinen GTPase Arf1 identifiziert werden. Eine phylogenetische Analyse der entsprechenden Aminosäuresequenz offenbarte die enge Verwandtschaft zu bekannten Homologen sowohl aus dem pflanzlichen, als auch aus dem tierischen System (Abb. 4.8.). Das Protein zeigte sich dabei am nächsten verwandt zu Arf-Proteinen aus Weizen und Gerste. Insgesamt gliederte sich der phylogenetische in Baum in zwei Cluster, entsprechend Arf-Proteinen aus dem pflanzlichen und aus dem tierischen System. Diese lagen allerdings nicht weit voneinander entfernt, wie an der unten angegebenen Skala abzulesen ist. Im Vergleich zu Arf1-Proteinen aus anderen Pflanzen zeigt sich die Aminosäuresequenz zwischen 97% bis 99% identisch, im Vergleich zum Tierreich immerhin noch zu 85% bis 88% (7.3.5.). Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeiten und dem Auffinden von

hochkonservierten Aminosäuresequenzen in definierten Positionen, wurde daher davon ausgegangen, daß die isolierte Sequenz für ein funktionelles Homolog von Arf1 aus *Medicago truncatula* kodiert. Die Sequenz wurde daraufhin an EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) gesandt und mit der Identifikationsnummer AJ866985 als Arf1 aus *Medicago truncatula* (*MtArf1*) in der Datenbank eingetragen.

Als Randnotiz sei an dieser Stelle angemerkt, daß aufgrund der Information um die spezifische Induktion der Expression von *Arf1* in mykorrhizierten Erbsen, die Expression von *MtArf1* in symbiontischen und nicht-symbiontischen *M. truncatula* Wurzeln mittels Real-time PCR gemessen wurde. Die Expressionsstärke zeigte sich dabei zwischen den Geweben als unverändert. Eine Verstärkung der Expression von *Arf1* in mykorrhizierten Wurzeln ist daher, zumindest in *M. truncatula*, nicht gegeben.

4.3.4. Erstellung von „loss of function“ und „gain of function“ Mutanten von *MtArf1* durch PCR-Mutagenese

Arf1 als Mitglied der kleinen G-Proteine unterliegt einem Zyklus von Aktivierung durch GTP-Bindung und Inaktivierung durch GTP-Hydrolyse. Generell wurden die Mechanismen der Regulation kleiner G-Proteine durch zahlreiche *in vitro* Studien zur Kinetik der GTP-Bindung und -Hydrolyse erforscht (Florio & Sternweis, 1985; Brandt & Ross, 1985, Brandt & Ross, 1986; Neal *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1989; Neal *et al.*, 1990). Dabei spielte insbesondere der Vergleich zwischen unveränderten Proteinen und mutierten, onkogenen Varianten eine entscheidende Rolle (Gibbs *et al.*, 1984; Downward *et al.*, 1990; Eccleston *et al.*, 1993). Für Arf1 konnten Abweichungen in der Aminosäuresequenz an den Positionen 31 oder 71 als entscheidend für eine veränderte GTPase-Aktivität nachgewiesen werden (Dascher & Balch, 1994). Dort befinden sich die hochkonservierten Aminosäurereste Thr31 und Gln71, die entscheidend an der Bindung und Hydrolyse von GTP beteiligt sind. So ist bekannt, daß eine Mutation von Threonin³¹ zu Asparagin³¹ (T31N) die Affinität von Arf1 zu GTP stark vermindert, während eine Mutation von Glutamin⁷¹ zu Leucin⁷¹ (Q71L) die GTPase Aktivität von Arf1 blockiert (Tanigawa *et al.*, 1993; Dascher & Balch, 1994; Teal *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994). Arf1 T31N ist daher konstitutiv inaktiv (loss of function) und Arf1 Q71L konstitutiv aktiv (gain of function). Dieses gilt gleichermaßen für Arf1 aus dem pflanzlichen System (Lee *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2002, Molendijk *et al.*, 2004).

Für die Generierung von „loss of function“ und „gain of function“ Mutanten von *MtArf1* wurden die Primer T31N up/T31N lo und Q71L up/Q71L lo erstellt. Als Vorlage für die PCR-Reaktionen wurde das Plasmid pGEM-Teasy mit einklonierter Sequenz für *MtArf1* verwendet (pGEM-MtArf1, Tab. 3.4.). Dieses war zuvor aus dem Bakterienstamm DH5 α isoliert worden. Die Lage der Primer war so gewählt, daß sich mit ihnen das komplette Plasmid amplifizieren ließ. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* behandelt. *DpnI* schneidet blunt end in der Sequenz GATC, insofern die Adenosinreste im Doppelstrang methyliert sind. Entsprechende Methylierungen finden sich nur im Ursprungsplasmid pGEM-MtArf1, das aus DH5 α isoliert wurde, nicht aber in den PCR-Amplifikaten. Nach der *DpnI*-Behandlung wurden die PCR-Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und aus diesem eluiert. Die aufgereinigten Produkte wurden anschließend mit Ligase behandelt, um verbliebene nicks zu schließen und

anschließend nach *E. coli* XL1-blue transformiert. Durch doppelsträngige Sequenzierung mittels der Primer uni und rev konnten für einige Klone die gewünschten Mutationen in der Sequenz von *MtArf1* nachgewiesen werden. Die entsprechenden Plasmide wurden als pGEM-MtArf1T31N und pGEM-MtArf1Q71L bezeichnet (Tab. 3.4.).

4.4. Die EST-Datenbanksuche bildete die Grundlage zur Isolierung von Sequenzen für *Mt ζ COP1*, *Mt ζ COP2* und *Mt ϵ COP* aus *M. truncatula* cDNA-Banken

Mittels der unter 4.1. beschriebenen Suche nach EST-Sequenzen mit Homologien zu Coatomer-Proteinen ließ sich für *M. truncatula* das komplette Set aus allen sieben bekannten Untereinheiten identifizieren. Als Grundlage für die geplante *in vivo* Lokalisierung dieser strukturellen Komponenten galt es nun, einzelne Sequenzen aus cDNA-Banken von *M. truncatula* zu isolieren. Aufgrund der gewonnenen Informationen boten sich dazu insbesondere die Coatomer-Untereinheiten ζ COP1, ζ COP2 und ϵ COP an, da für diese TC-Sequenzen gefunden werden konnten, die bereits den kompletten open reading frame umspannten (Tab. 4.4., fett gedruckte Einträge). Die Sequenzinformationen aus den TCs 77793 (ϵ COP), 87228 (ζ COP1) und 79711 (ζ COP2) wurden daher zur Generierung von spezifischen Primern genutzt, die genau am Anfang und am Ende des entsprechenden open reading frames binden sollten, um eine Amplifikation der kompletten kodierenden Sequenz zu gewährleisten. Mittels PCR konnten aus cDNA-Banken von *M. truncatula* Amplifikate der erwarteten Größen gewonnen werden:

Protein	Größe [bp/aa]	Masse [Da]	pI	Identität pflanzliche Homologe	Identität tierische Homologe
Mt ϵ -COP	870/289	32045	4,9	64%-90%	40%-42%
Mt ζ -COP1	543/180	19962	4,4	71%-92%	42%-44%
Mt ζ -COP2	546/182	20076	4,6	66%-87%	45%-46%

Tab. 4.8. Zusammenfassung charakteristischer Eigenschaften Sequenzen für *Mt ϵ -COP*, *Mt ζ -COP1* und *Mt ζ -COP2*. Die Größe der amplifizierten Sequenzen in Basenpaaren (bp), der translatierten Sequenzen in Aminosäuren (aa), der theoretisch kalkulierten Masse in Dalton (Da) und des isoelektrischen Punktes (pI), sowie die Identität der Aminosäuresequenz zu bekannten pflanzlichen und tierischen Homologen sind angegeben.

Die nachfolgende Sequenzierung ergab für ϵ -COP ein Produkt mit einem durchgehenden offenen Leserahmen von 870 bp, entsprechend einem Protein mit einer Länge von 289 Aminosäuren, einer theoretischen Masse von 32045 Da und isoelektrischen Punkt bei pH 4,9. Für ζ -COP1 konnte ein Produkt von 543 bp identifiziert werden, das für ein Protein von 180 Aminosäuren mit einer kalkulierten Masse von 19962 Da und einem isoelektrischen Punkt bei pH 4,4 kodierte und für ζ -COP2 ein Produkt von 549 bp, das für ein Protein von 182 Aminosäuren mit 20076 Da und einem isoelektrischen Punkt bei pH 4,6 kodierte (Tab. 4.8.). Mittels BlastP-Analyse wurden für die Sequenzen entsprechende Homologien zu ϵ -COP- und ζ -COP-Proteinen aus Pflanzen und Tieren gefunden. In allen drei Fällen betrug die Identität zu pflanzlichen Homologen bis zu ca. 90%, zu tierischen Homologen hingegen nur bis zu maximal ca. 45% (Tab. 4.8.). Die größten Unterschiede zu

den entsprechenden Sequenzen aus tierischen Organismen konnte dabei in multiplen Alignments für den N-Terminus der Proteine ermittelt werden (Abb. 7.4.1.).

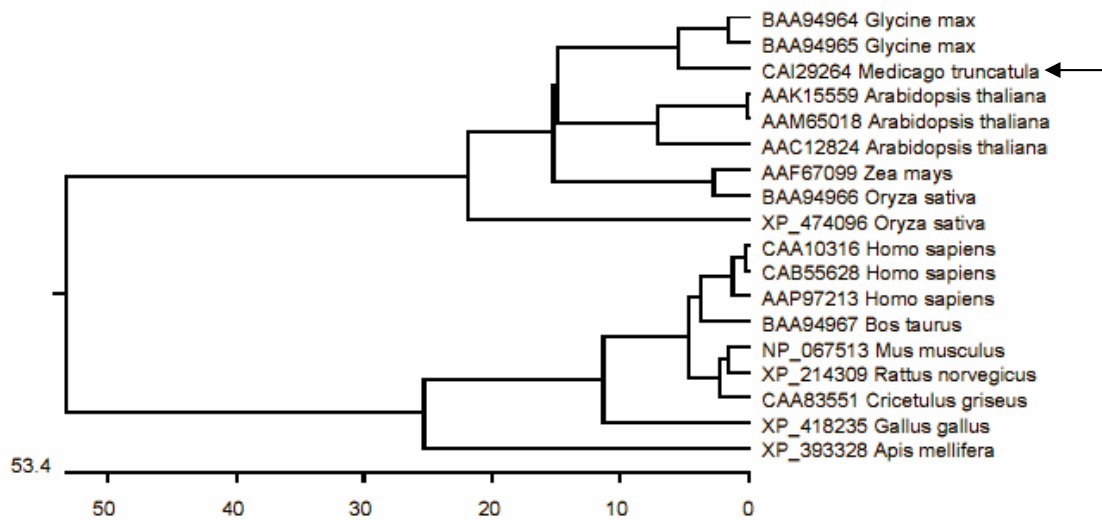


Abb. 4.9. Phylogenetischer Vergleich von Mt ϵ -COP mit bekannten Homologen aus dem pflanzlichen und tierischen System. Die Skala gibt die Anzahl an Austauschen pro 100 Aminosäuren an.

CAI29264 *Medicago truncatula* epsilon-COP, BAA94964 *Glycine max* (Sojabohne) epsilon1-COP, BAA94965 *Glycine max* (Sojabohne) epsilon2-COP, AAK15559 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, epsilon subunit, AAM65018 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) coatomer-like protein, epsilon subunit, AAC12824 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer epsilon subunit, AAF67099 *Zea mays* (Mais) epsilon-COP, BAA94966 *Oryza sativa* (Reis) epsilon1-COP, XP_474096 *Oryza sativa* OSJNBa0033G05.19, CAA10316 *Homo sapiens* (Mensch) Epsilon COP, CAB55628 *Homo sapiens* (Mensch) epsilon-COP, AAP97213 *Homo sapiens* (Mensch) epsilon-COP, BAA94967 *Bos taurus* (Hausrind) epsilon1-COP, NP_067513 *Mus musculus* (Hausmaus) epsilon subunit of coatomer protein complex, XP_214309 *Rattus norvegicus* (Wanderratte) similar to nonclathrin coat protein epsilon-COP, CAA83551 *Cricetulus griseus* (chinesischer Streifenhamster) epsilon-COP, XP_418235 *Gallus gallus* (Huhn) similar to epsilon1-COP, XP_393328 *Apis mellifera* (Honigbiene) coatomer similar to epsilon subunit of coatomer protein complex isoform a; coatomer epsilon subunit.

In den phylogenetischen Analysen (Abb. 4.9. und Abb. 4.10.) zeigten sich die drei Proteine aus *M. truncatula* jeweils am engsten verwandt mit entsprechenden Homologen aus der Leguminose *Glycine max* (Sojabohne). Dabei konnte allerdings ein ganz wesentlicher Unterschied gefunden werden. Es standen Sequenzinformation für jeweils zwei verschiedene Isoformen (ϵ -COP1 und ϵ -COP2, bzw. ζ -COP1 und ζ -COP2) aus *Glycine max* zur Verfügung. Für Mt ϵ -COP betrug die Identität zu den Isoformen ϵ -COP1 und ϵ -COP2 aus *G. max* 90% bzw. 89%, d.h. die beiden Isoformen aus der Sojabohne waren fast identisch. Dementsprechend wurden die drei Proteine einem gemeinsamen Ast des phylogenetischen Baums zugeordnet (Abb. 4.9.). Mt ζ -COP1 hingegen war zu 92% identisch mit der Isoform ζ -COP1 aus *Glycine max*, jedoch nur zu 75% mit der zweiten Isoform ζ -COP2. Umgekehrt war Mt ζ -COP2 zwar zu 87% identisch mit ζ -COP2 aus *G. max*, jedoch nur zu 75% mit der zweiten Isoform ζ -COP1. Die verschiedenen Isoformen wurden daher in der phylogenetischen Analyse auf verschiedenen, weit voneinander entfernten Ästen eingeordnet (Abb. 4.10.). Dabei zeigten die ζ -

COP2-Isoformen eine engere Verwandtschaft mit ζ -COP-Homologen aus dem tierischen System als die ζ -COP1-Isoformen.

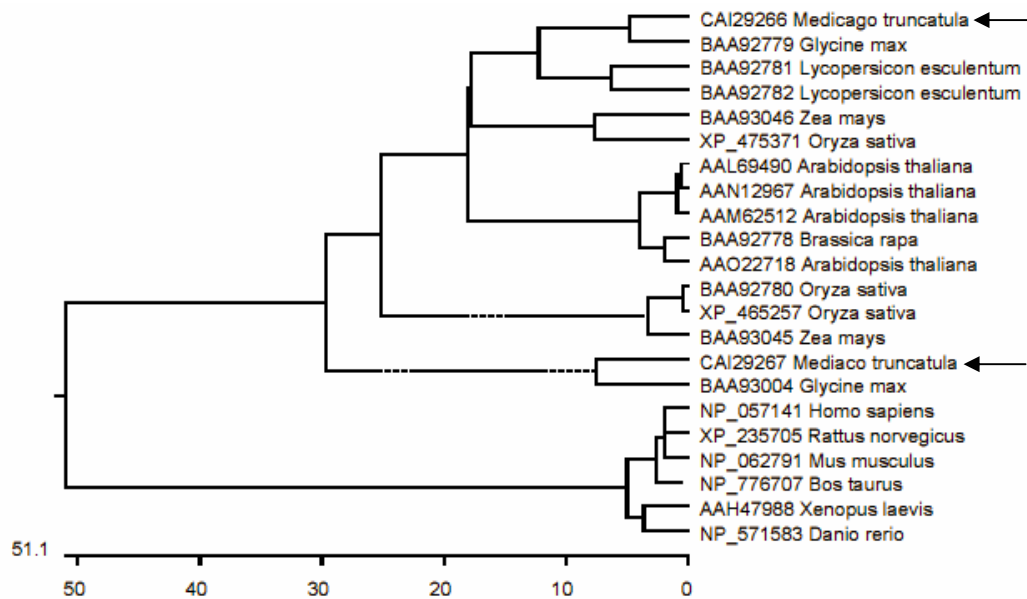


Abb. 4.10. Phylogenetischer Vergleich der Verwandtschaft der beiden Isoformen Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 mit bekannten Homologen aus dem pflanzlichen und tierischen System. Die Skala gibt die Anzahl an Austauschungen pro 100 Aminosäuren an.

CAI29266 *Medicago truncatula* zeta-COP 1, BAA92779 *Glycine max* (Sojabohne) zeta1-COP, BAA92781 *Lycopersicon esculentum* (Petersilie) zeta1-COP, BAA92782 *Lycopersicon esculentum* (Petersilie) zeta2-COP, BAA93046 *Zea mays* (Mais) zeta1-COP, XP_475371 *Oryza sativa* (Reis) zeta1 subunit, AAL69490 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, AAN12967 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, AAM62512 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, BAA92778 *Brassica rapa* (Raps) zeta1-COP, AAO22718 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer zeta subunit, BAA92780 *Oryza sativa* (Reis) zeta2-COP, XP_465257 *Oryza sativa* (Reis) zeta2-COP, BAA93045 *Zea mays* (Mais) zeta2-COP, CAI29267 *Medicago truncatula* zeta-COP 2, BAA93004 *Glycine max* (Sojabohne) zeta2-COP, NP_057141 *Homo sapiens* (Mensch) zeta 1, XP_235705 *Rattus norvegicus* (Wanderratte) zeta-1, NP_062791 *Mus musculus* (Hausmaus) zeta 1, NP_776707 *Bos taurus* (Hausrind) CGI-120 protein, AAH47988 *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) Copz1 protein, NP_571583 *Danio rerio* (Zebrafisch) zeta1-cop. Die beiden Isoformen Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 waren untereinander nur zu 72% identisch. Ein Alignment beider Sequenzen zeigte, daß sich diese hauptsächlich am N- und an zwei Stellen im C-Terminus unterschieden, während ein langer, interner Abschnitt nur wenige Aminosäureaustausche enthielt (Abb. 4.11.).

```

      *           20           *           40           *           60           *           80           *
Zeta_COP1 : M S F S K L E I N P S V K N I L L D S E G R R V A A K Y F S D D W P T N S A K A F E K V F V N K T O K T N A R T E A E I T M E E N N I V V Y K F V Q D L H F F V T G S D D E N E L : 91
Zeta_COP2 : M A S N -- G L C P S I K N I L L D S E G R R V A A K Y Y S D D W P T N S S K L A F E K V F V N K T O K T N A R T E A E I T L E E N N I V V Y K F V Q D L H F F V T G S D D E N E L : 89
      M           L P S 6 K N I L L D S G 4 R V A K Y 5 S D D W P T N S K A F E K V F K T K T N A R T E A E I T 6 E N N I 6 V Y K F V Q D L H F F V T G D D E N E L

      100           *           120           *           140           *           160           *           180
Zeta_COP1 : I L S S V L Q A F F D S V G L L L R C N V D R K E A L E N L D L I L L C I D E I I D A G I I L E T P N T I A C K V G S N S T E S C A P L S E Q T L S Q A L A S A R E H L A R S L L K : 182
Zeta_COP2 : I L S S V L Q C F F D A V T L L L R S N V D R S E A L E N L D L I L L C L D E I V D G G I I L E T N G P L I A K V T S H N M D A D A P L S E Q T L T Q A W A T A R D T E T R T L L T : 180
      I L S S V L Q   F F D   V   L L L R   N V D K   E A L E N L D L I L L C 6 D E I 6 D   G I I L E T           I A   K V   S           A P L S E Q T L 3 Q A   A 3 A R           R 3 L L

```

Abb. 4.11. Alignment der beiden Isoformen Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 auf Basis ihrer Aminosäuresequenzen. Die Sequenzen wurden mittels des Clustal V-Algorithmus im Programm MegAlign™ des DNASTar-Softwarepakets miteinander verglichen.

Trotz der Sequenzunterschiede wurde in einer nachfolgenden Analyse für beide Proteine eine Domänenstruktur prognostiziert, wie sie für die kleine Untereinheit des Clathrin-Adaptor Komplexes (Clat_adaptor_s) typisch ist (vergleiche auch Tab. 4.3.). Ebenso wurde für Mt ϵ -COP eine typische Domäne für Coatomer ϵ -Untereinheiten (Coatomer_E, Tab. 4.3.) detektiert. Aufgrund der gefundenen Sequenzähnlichkeiten und der Voraussage gleicher Domänenstrukturen in den Coatomer-Untereinheiten von *M. truncatula*, konnte daher von funktionellen Homologen ausgegangen werden. Die Sequenzen wurde daraufhin an EMBL gesandt und erhielten folgende Identifikationsnummern: Mt ζ -COP1 AJ866986, Mt ζ -COP2 AJ866987 und Mt ϵ -COP AJ866984.

4.5. Analyse der heterolog exprimierten Proteine MtArf1, MtArf1 T31N, MtArf1 Q71L, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2

4.5.1. Expression und immunologischer Nachweis der nativen und GFP-fusionierten Proteine

Für die nachfolgend beschriebene *in vivo* Lokalisierung (siehe 4.6.) wurden die Proteine MtArf1, MtArf1 T31N, MtArf1 Q71L, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 als interessanteste Kandidaten ausgewählt. Mt ϵ -COP wurde nicht weiter bearbeitet, weil die entsprechende Sequenz ungünstige Restriktionsschnittstellen enthielt, die eine zusätzliche, völlig andere Klonierungsstrategie notwendig gemacht hätte. Bevor allerdings mit der Erstellung von Konstrukten zur Transformation von *Medicago truncatula* begonnen werden konnte, wurden die Proteine mit und ohne GFP-Fusion heterolog in *E. coli* exprimiert. Dieser Versuch diente der funktionellen Überprüfung der verwendeten GFP-Variante mGFP6 (Haselhoff *et al.*, 1997; Haselhoff, 1999), der Prüfung der Stabilität der GFP-fusionierten Proteine und dem Nachweis durch spezifische Antikörper. mGFP6 wurde durch die Arbeitsgruppe um Jim Haselhoff (Universität Cambridge, UK) speziell für die Transformation von Pflanzen optimiert. Durch Einfügen von Mutationen wurde die Aminosäuresequenz des Proteins solange verändert, bis eine möglichst stark fluoreszierende Variante gefunden war. Außerdem wurde eine kryptische Spleißstelle aus der Sequenz entfernt (Haselhoff *et al.*, 1997). Die mRNA des „normalen“ eGFP wird in Pflanzen bevorzugt an einer Stelle inmitten der kodierenden Sequenz gespleißt, so daß die Ausbeute an Fluoreszenz recht gering ist und nur unbefriedigende Ergebnisse bei der Selektion transformierter Pflanzen erzielt werden können.

Die Sequenz für mGFP6 wurde aus dem Vektor GFPm6ABD2 gewonnen, der während dieser Arbeit als positive Kontrolle zur Transformation von *M. truncatula* eingesetzt wurde. Da nur eine Plasmidkarte (Abb. 3.1.) zur Verfügung stand und die Sequenz nicht bekannt war, wurde das mGFP6-Gen zunächst durch *NcoI* und *BamHI* aus GFPm6ABD2 ausgeschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in pET32a(+) kloniert (\Rightarrow pET32a(+)mGFP6 (Tab. 3.4.)). Unter der Verwendung der Primer T7 und T7term wurde das inklonierte Produkt sequenziert und mittels einer Überprüfung durch BlastN sehr hohe Homologien zu bekannten GFP-Genen nachgewiesen.

Zur Erstellung von Expressionsvektoren wurden die Gene *MtArf1*, *MtArf1 T31N*, *MtArf1 Q71L*, *Mt ζ COP1* und *Mt ζ COP1* mit spezifischen Primern amplifiziert, mit deren Hilfe jeweils eine FLAG-codierende Sequenz an den C-Terminus angefügt wurde. Das FLAG-Oktapeptid DYKDDDDK sollte als Epitop zum Nachweis mittels eines anti-FLAG-Antikörpers und zur affinitätschromatographischen

Aufreinigung dienen. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden über *Bam*HI//*Eco*RI in den Expressionsvektor pET24a(+) kloniert (\Rightarrow pET24a(+)MtArf1, pET24a(+)MtArf1 T31N; pET24a(+)MtArf1 Q71L, pET24a(+)Mt ζ -COP1 und pET24a(+)Mt ζ -COP1 (Tab. 3.4.)) und nach *E. coli* DH5 α transformiert. Durch nachfolgende Restriktionsspaltung der pET24a(+)-Plasmide wurden positive Klone identifiziert und die entsprechenden Vektoren doppelsträngig mit den Primern T7 und T7-term sequenziert. Für die nachfolgende Expression wurden die Plasmide pET24a(+)MtArf1, pET24a(+)MtArf1 T31N; pET24a(+)MtArf1 Q71L, pET24a(+)Mt ζ -COP1 und pET24a(+)Mt ζ -COP1 nach *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Der Bakterienstamm ist speziell für die Expression aus pET-Vektoren entwickelt worden. Im Genom der Bakterien ist eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines Lac-Promotors und -Operators kodiert. Nach IPTG-Induktion bindet die Polymerase an eine T7-Promotorsequenz in pET24a(+) und leitet die Transkription der einklonierten Sequenz ein.

Zur Fusion von *MtArf1*, *MtArf1* T31N, *MtArf1* Q71L, *Mt ζ -COP1* und *Mt ζ -COP2* mit GFP wurde die Sequenz für mGFP6 aus pET32a(+) amplifiziert und über *Bam*HI//*Bam*HI ungerichtet in die Plasmide pET24a(+)MtArf1, pET24a(+)MtArf1 T31N; pET24a(+)MtArf1 Q71L, pET24a(+)Mt ζ -COP1 und pET24a(+)Mt ζ -COP1 kloniert (\Rightarrow pET24a(+)MtArf1::mGFP6, pET24a(+)MtArf1 T31N::mGFP6; pET24a(+)MtArf1 Q71L::mGFP6, pET24a(+)Mt ζ -COP1::mGFP6 und pET24a(+)Mt ζ -COP1::mGFP6 (Tab. 3.4.)). Die Ligationsansätze wurden in den *E. coli*-Stamm BL21DE3 transformiert und positive Klone praktischerweise am Leica MZFLIII Fluoreszenzbinokular anhand ihrer GFP-Fluoreszenz selektioniert. Dabei wurde ausgenutzt, daß der T7-Promotor auf dem Plasmid „leaky“ war und die Expression in einem gewissen Umfang schon ohne IPTG-Zugabe einsetzte (Abb. 4.12.).

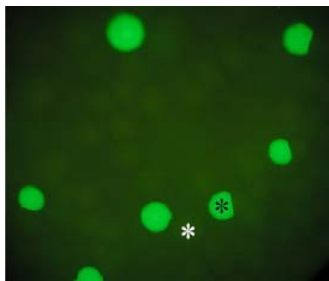


Abb.4.12. Selektion von GFP-exprimierenden Klonen am Fluoreszenzbinokular. Kolonien, die GFP-markierte Proteine exprimierten (leuchtend grün, beispielhaft markiert durch schwarzes Sternchen), unterschieden sich deutlich von Kolonien, die kein GFP exprimierten (schwache grüne Strukturen, beispielhaft markiert durch weißes Sternchen). Die leuchtenden Kolonien waren teilweise nicht vollständig rund, weil in ihrer unmittelbaren Nähe Bakterienkolonien wuchsen, die kein GFP exprimierten.

Zur Expression der nativen und GFP-fusionierten Proteine aus den erstellten pET24a(+)-Plasmiden (siehe oben) wurden Bakterien mit IPTG behandelt und anschließend Gesamtproteinextrakte gewonnen. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 4.13. A).

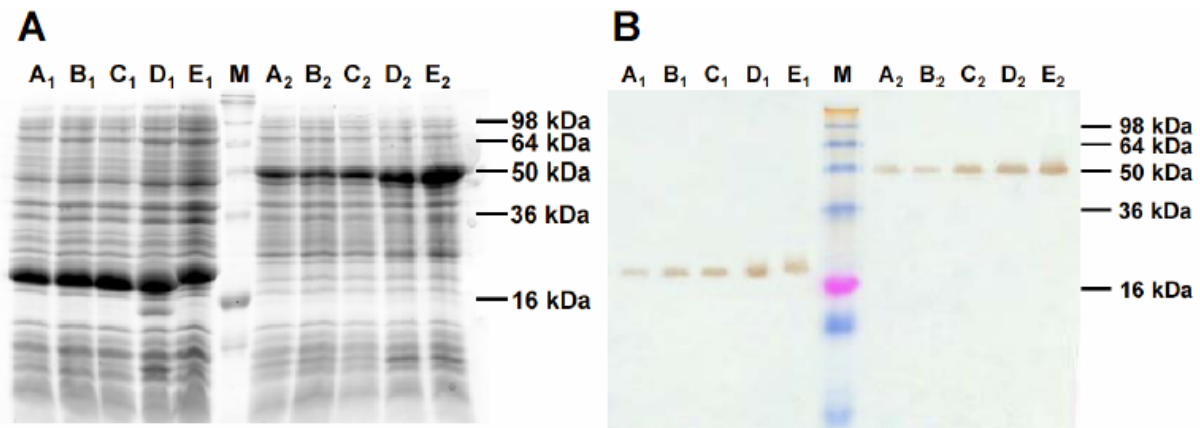


Abb. 4.13.

A. In *E. coli* BL21 DE3 heterolog exprimierte Proteine aufgetrennt per SDS-PAGE.

Die Bakterien wurden 4 h nach IPTG-Induktion geerntet und Gesamtproteinextrakte isoliert. Pro Bahn wurden 20 μ l Extrakt, entsprechend einer Proteinmenge von ca. 40 μ g aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt und eingescannt. A₁ MtArf1, B₁ MtArf1 T31N, C₁ MtArf1 Q71L, D₁ Mt ζ -COP1, E₁ Mt ζ -COP2, A₂ MtArf1::mGFP6, B₂ MtArf1 T31N::mGFP6, C₂ MtArf1 Q71L::mGFP6, D₂ Mt ζ -COP1::mGFP6, E₂ Mt ζ -COP2::mGFP6, M SeeBlue Plus2 Marker (Invitrogen, Kat. Nr. LC5925). Die Bezeichnung folgt der Nomenklatur der im Vektor pET24a(+) erstellten Konstrukte (Tab. 3.4.).

B. Nachweis heterolog exprimierter Proteine per Western-Blot.

5 μ l Gesamtproteinextrakt, entsprechend einer Proteinmenge von je ca. 10 μ g, wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und per Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Detektion der Proteine wurde ein monoklonaler anti-FLAG-Antikörper, gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase, in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet. Der Farbnachweis erfolgte durch Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin). A₁ MtArf1, B₁ MtArf1 T31N, C₁ MtArf1 Q71L, D₁ Mt ζ -COP1, E₁ Mt ζ -COP2, A₂ MtArf1::mGFP6, B₂ MtArf1 T31N::mGFP6, C₂ MtArf1 Q71L::mGFP6, D₂ Mt ζ -COP1::mGFP6, E₂ Mt ζ -COP2::mGFP6, M SeeBlue Plus2 Marker. Die Bezeichnung folgt der Nomenklatur der im Vektor pET24a(+) erstellten Konstrukte (Tab. 3.4.).

In den Proteinextrakten konnten deutlich die Banden der exprimierten Proteine in einem Größenbereich von ca. 23 kDa detektiert werden (A₁-E₁). Diese entsprachen den erwarteten Größen für MtArf1 (20,7 kDa), Mt ζ -COP1 (20 kDa) und Mt ζ -COP2 (20 kDa) mit N-terminal fusioniertem T7-Tag (1,4 kDa) und C-terminalem FLAG-Tag (1,1 kDa). Der T7-Tag stammte aus dem Expressionsvektor pET24a(+). Der Vektor enthält nach seinem Promotor ein Startcodon, gefolgt von der Sequenz für den T7-Tag. Exprimierte Proteine werden daher immer N-terminal mit einer zusätzlichen T7-Sequenz versehen. Mt ζ -COP2 bandierte in dem SDS-Gel etwas höher als Mt ζ -COP1 und MtArf1, obwohl das Protein kleiner sein sollte als MtArf1. Dieser Effekt trat allerdings bei der Auftrennung der GFP-fusionierten Proteine (A₂-E₂) nicht auf. Diese konnten in einem Größenbereich von ca. 50 kDa detektiert werden, was genau den erwarteten Größen für MtArf1::mGFP6 (50,5 kDa), Mt ζ -COP1::mGFP6 (49,8 kDa) und Mt ζ -COP2::mGFP6 (49,9 kDa) entspricht (mGFP6 besitzt eine theoretische Masse von 27,3 kDa).

Zum immunologischen Nachweis der heterolog exprimierten Proteine wurden die Gesamtproteinextrakte aus *E. coli* BL21 DE3 durch SDS-PAGE getrennt, per Western-Blot auf PVDF-Membran geblottet und mit einem anti-FLAG-Antikörper inkubiert. Dabei konnten einzelne Banden entsprechend der Größe der heterolog exprimierten Proteine durch den Antikörper detektiert werden

(Abb. 4.13. B). Beim Vergleich der Daten aus der SDS-PAGE und der Western-Blot Analyse fanden sich keine entscheidenden Hinweise auf eine Degradation der entsprechenden Produkte. Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, daß sich die Proteine erfolgreich mit GFP fusionieren ließen (Abb. 4.12. & 4.13.) und sich die Fusionsprodukte zumindest bei der Expression in *E. coli* als stabil erwiesen.

4.5.2. MALDI-TOF Analyse der heterolog exprimierten Proteine

Die Analyse von *E. coli* Gesamtproteinextrakten per SDS-PAGE und Western-Blot erbrachten eindeutige Hinweise, daß es sich bei den nachgewiesenen Proteinen um die gewünschten Produkte handelte. Um sich der Natur der exprimierten Produkte nochmals zu versichern, wurden diese stichprobenartig einer zusätzlichen Analyse durch MALDI-TOF unterzogen und damit die Ergebnisse doppelt abgesichert. Dazu wurden die heterolog exprimierten Proteine zunächst aus *E. coli* BL21 DE3 Gesamtproteinextrakten durch Affinitätschromatographie an einer anti-FLAG-Matrix aufgereinigt und die eluierten Fraktionen per SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 4.14).

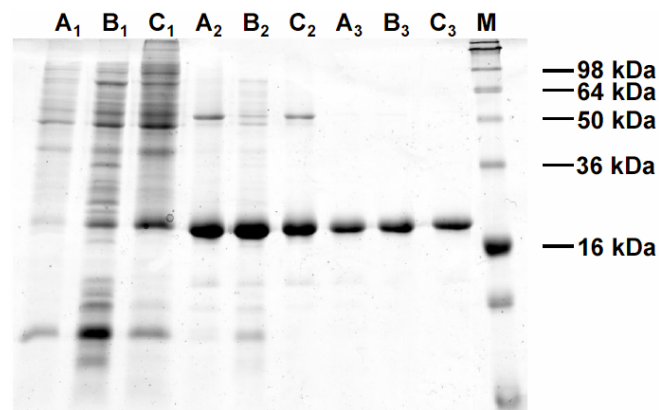


Abb. 4.13. Coomassie Blue gefärbtes SDS-PAGE-Gel von affinitätschromatographisch aufreinigten, heterolog exprimierten Proteinen.

Es wurden Gesamtproteinextrakte aus *E. coli* BL21 DE3 auf eine Säule aus anti-FLAG Agarose gegeben. Die heterolog exprimierten, FLAG-markierten Proteine wurden durch die anti-FLAG Matrix gebunden und mit einem Überschuß an freiem FLAG-Peptid anschließend sequentiell von der Säule eluiert. Gesamtproteinextrakte: A₁ MtArf1, B₁ MtArf1 T31N, C₁ MtArf1 Q71L. Eluierte erste Fraktionen: A₂ MtArf1, B₂ MtArf1 T31N, C₂ MtArf1 Q71L. Eluierte zweite Fraktionen: A₃ MtArf1, B₃ MtArf1 T31N, C₃ MtArf1 Q71L. M SeeBlue Plus2 Marker. Die Bezeichnung folgt der Nomenklatur der im Vektor pET24a(+) erstellten Konstrukte (Tab. 3.4.).

Anschließend wurden Banden aufgereinigter Proteine aus dem Gel ausgestochen und einem Trypsinverdau unterzogen. Die nachfolgende Analyse der Peptide erfolgte mittels Messungen am MALDI-TOF MS. Dabei konnten von der verwendeten Software BioTools bei einer Suche nach Datenbankeinträgen für entsprechende Peptidmuster von Proteinen aus *M. truncatula* keine Hits gefunden werden. Ein Abgleich mit dem bekannten Datenbankbestand blieb also erfolglos. Erst ein Vergleich der Peptidmuster mit selbst assemblierten Sequenzdaten für die entsprechenden Proteine führte zu deren Identifizierung. Dabei konnte mit den ermittelten Peptidmustern die Sequenz der Proteine zu folgenden Prozentsätzen abgedeckt werden:

Protein	Abdeckung der Gesamtsequenz
Mt ζ -COP2	34,80%
Mt ζ -COP1	25,70%
MtArf1	30,80%
MtArf1 Q71L	30,80%
MtArf1 T31N	30,80%
MtArf1::mGFP6	35,50%
Mt ζ -COP2::mGFP6	39,10%

Tab. 4.9.: Zusammenfassung der Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse von Trypsinverdauten, heterolog exprimierten Proteinen. Als Kontrolle wurde parallel ein Stück Gel untersucht, das keine Proteine enthielt. Hierbei konnten keine Peptide ermittelt werden.

Durch die MALDI-TOF MS-Analyse konnte zweifelsfrei belegt werden, daß die in *E.coli* exprimierten Proteine den gewünschten Produkten entsprachen.

4.6. In vivo Lokalisierung der GFP-fusionierten Proteine MtARF1, MtARF1 T31N, MtARF1 Q71L, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 in „hairy root“ transformierten *M. truncatula* Wurzeln

4.6.1. Erstellung von GFP fusionierten Konstrukten im Transformationsvektor pBIN19

Für die *in vivo* Lokalisierung von GFP-Fusionen mußten entsprechende Konstrukte in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert werden. Zur Transformation wurde der Vektor pBIN19 ausgewählt (Abb. 3.2.). pBIN19 kodiert für ein Kanamycin-Resistenzgen zur entsprechenden Selektion in Bakterien und enthält einen pBR322 Origin, so daß das Plasmid in hoher Kopienzahl in *E. coli* vermehrt werden kann. Des weiteren enthält das Plasmid zwischen left- und right border ein Gen für Neomycinphosphotransferase (NPT) unter Kontrolle eines NOS-Promotors und eines NOS-Terminators, das transformierten Pflanzen Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt und eine umfangreiche multiple cloning site (MCS), die das Einklonieren von zu untersuchenden Genen erlaubt. Die MCS in pBIN19 ist allerdings nicht von Promotor/Terminator-Sequenzen flankiert. Um eine konstitutive Expression der Konstrukte zu gewährleisten, müssen die zu untersuchenden Konstrukte daher zusammen mit einem entsprechenden Promotor und einem Terminator einkloniert werden. Eine entsprechende Expressionskassette stand im Vektor p35S-GFP zur Verfügung (Abb. 3.3.). Das Plasmid enthält einen pUC-Origin zur Vermehrung in *E. coli*, ein Gen für Ampicillin-Resistenz (Amp^r), sowie eine 35S-Promotorkassette. Die Kassette umfaßt einen 35S Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus (Cauliflower mosaic virus, CaMV), eine MCS bestehend aus Schnittstellen für *XbaI*, *BamHI* und *BgIII*, ein eGFP-Gen und einen NOS-Terminator. Eine direkte Klonierung der unter 4.5.1. erstellten GFP-Fusionen in den Vektor p35S GFP war aufgrund der begrenzten Auswahl an Schnittstellen nicht möglich. Zudem sollten die Proteine nicht mit dem FLAG-Tag exprimiert werden, um nicht Fehllokalisierungen aufgrund des Tags zu riskieren. Die Strategie zur Erstellung von mGFP6-fusionierten Konstrukten in pBIN19 umfaßte daher folgende Schritte:

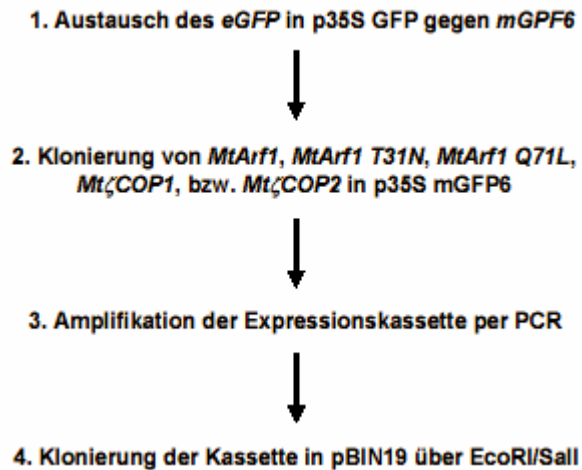


Abb. 4.14. Flußschema der Strategie zur Erstellung von Pflanzentransformationsvektoren mit GFP-Fusionen von *MtArf1*, *MtArf1 T31N*, *MtArf1 Q71L*, *Mtζ-COP1* und *Mtζ-COP2*.

Im ersten Schritt wurde das in p35S GFP enthaltene *eGFP* gegen *mGFP6* (\Rightarrow p35S-mGFP6 (Tab. 3.4.)) ausgetauscht. Dazu wurde die Sequenz für eGFP durch Restriktionsspaltung mit *BamHI/SacI* aus p35S GFP ausgeschnitten und *mGFP6* über dieselben Schnittstellen eingefügt. Die ursprünglich in dem Vektor vorhandene *BglII*-Schnittstelle ging bei dieser Klonierung verloren. Dann wurden die Sequenzen *MtArf1*, *MtArf1 T31N*, *MtArf1 Q71L*, *Mtζ-COP1* und *Mtζ-COP2* mit spezifischen Primern amplifiziert und über *XbaI/BamHI* (für *Mtζ-COP1 XbaI/XbaI*) in p35S mGFP6 kloniert, um sie C-Terminal mit *mGFP6* zu fusionieren (\Rightarrow p35S-MtArf1::mGFP6, p35S-MtArf1 Q71L::mGFP6, p35S-MtArf1 T31N::mGFP6, p35S-Mtζ-COP1::mGFP6 und p35S-Mtζ-COP2::mGFP6 (Tab. 3.4.)). Dadurch ergab sich in dem Vektor jeweils die Anordnung *35S Promotor – Gen – mGFP6 – NOS Terminator*. Diese Expressionskassette wurde jeweils mit den Primern 35S EcoRI up und NOS Sall lo amplifiziert und anschließend über *EcoRI/Sall* in die multiple cloning site von pBIN19 kloniert (\Rightarrow pBin19-MtArf1::mGFP6, pBin19-MtArf1 Q71L::mGFP6, pBin19-MtArf1 T31N::mGFP6, pBin19-Mtζ-COP1::mGFP6 und pBin19-Mtζ-COP2::mGFP6 (Tab. 3.4.)). Für spätere Kontrollexperimente wurde auch eine Kassette ohne inkloniertes Gen, also mit der Struktur *35S Promotor – mGFP6 – NOS Terminator* amplifiziert und nach pBIN19 übertragen (\Rightarrow pBin19-mGFP6 (Tab. 3.4.)). Die erfolgreiche Klonierung der Expressionskassetten konnte durch Sequenzierung von pBIN19 mittels der Primer M13 und M13 rev, die direkt vor und hinter der multiple cloning site binden, bestätigt werden.

Da ab diesem Zeitpunkt eine Unterscheidung zwischen *eGFP* und *mGFP6* nicht mehr notwendig ist, da alle später untersuchten Konstrukte mit *mGFP6* erstellt wurden, wird von jetzt an nur noch der Begriff GFP statt mGFP6 verwendet. Außerdem werden der Einfachheit halber die Konstrukte in pBin19 (Tab. 3.4) nur noch als MtArf::GFP, Mtζ-COP1::GFP, usw. bezeichnet.

4.6.2. Selektion von transgenen, „hairy root“ transformierten *M. truncatula* Wurzeln

Zur Transformation von *Medicago truncatula* wurde der *Agrobacterium rhizogenes* Stamm ArQua1 verwendet (Quandt *et al.*, 1993). *A. rhizogenes* ist ein Gram-negatives, phytopathogenes Bodenbakterium, dessen T-DNA-Genprodukte nach der Übertragung in infizierten Pflanzenzellen durch Veränderung des Hormongleichgewichts (Cytokinine, Giberelline, Abscisinsäure) eine

kontinuierliche Wurzelbildung induzieren (Smith & Townsend 1907, Riker *et al.* 1930). Die T-DNA des in *A. rhizogenes* enthaltenen Ri-Plasmids beinhaltet eine Reihe wichtiger Gene, die für die Bildung und Etablierung der Wurzelhaare verantwortlich sind (Costantino *et al.* 1994, Nilsson *et al.* 1997). Dazu gehören die Gene *rolA*, *rolB*, *rolC* und *rolD*. Diese sind isoliert und in ihrer biologischen Wirkung einzeln oder in verschiedenen Kombinationen in transgenen Pflanzen getestet worden (Nilsson *et al.* 1993, Schmülling *et al.* 1988, Spena *et al.* 1987). Von den verschiedenen *rol*-Genen ist insbesondere das *rolC* Gen dadurch gekennzeichnet, daß das von diesem Gen gebildete Protein ein hormonautotrophes Wurzelwachstum auslöst. Die unter dem Einfluß von *A. rhizogenes* gebildeten Wurzeln verzweigen sich stärker und wachsen schneller als nichttransformiertes Wurzelgewebe. Auch *Medicago truncatula* wird von *A. rhizogenes* zu permanentem Wurzelwachstum angeregt und bildet sogenannte „hairy roots“ aus (Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

Für die Transformation von *M. truncatula* wurden elektrokompetente ArQua1-Zellen mit den unter Punkt 4.6.1. beschriebenen pBIN19-Vektoren transformiert und auf antibiotikahaltigen Medien selektioniert. Der Erfolg der Transformation wurde durch eine Reisolierung der Plasmide aus den Bakterien überprüft. Anschließend wurden *M. truncatula* Pflänzchen mit den Bakterien transformiert (3.9.3) und deren Wurzeln nach drei bis vier Wochen auf die Expression der GFP-Konstrukte gescreent. Die Suche nach transgenen Wurzeln erfolgte dabei an einem Binokular unter Anregung mit Fluoreszenzlicht (3.11.1). Transformierte Wurzeln ließen sich leicht durch ihre eindeutige Grünfluoreszenz von nicht-transgenen Wurzeln unterscheiden (Abb. 4.15.).

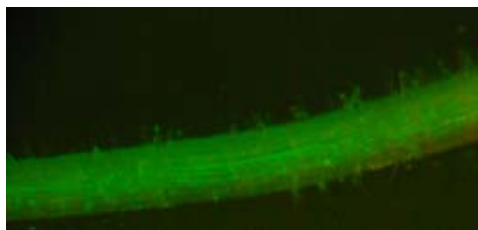


Abb. 4.15. Transgene *M. truncatula* Wurzel unter Anregung mit Fluoreszenzlicht.

Nicht-transformierte Wurzeln wiesen nur Autofluoreszenzen im gelben (Zellwände) und/oder roten Bereich (etiolierte Proplastiden) auf, aber fluoreszierten niemals grün. Transgene Wurzeln wurden anschließend mittels Zwei-Photonen Mikroskopie (3.11.2.) oder konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (3.11.3.) untersucht.

4.6.3. Mikroskopie von transformierten Wurzeln

Bevor mit der Darstellung der eigentlichen Ergebnisse der *in vivo* Lokalisierung begonnen werden kann, soll zum besseren Verständnis eine kurze Erklärung zu den erzielten Aufnahmen gegeben werden.

Alle nachfolgend beschriebenen Aufnahmen wurden mittels Zwei-Photonen Mikroskopie oder konfokaler Laserscanning-Mikroskopie an transformierten *Medicago truncatula* Wurzeln gewonnen. Die Wurzeln wurden dabei stets entlang ihrer Längsachse mikroskopiert. Fluoreszente Strukturen konnten dabei nur im Cytoplasma der Wurzelzellen detektiert werden (Abb. 4.16. A). Dieses macht in ausdifferenzierten Wurzelzellen aber nur einen sehr geringen Teil der Zellen aus, der weitaus größte Teil (ca. 95%) wird immer von der zentralen Vakuole eingenommen (Abb. 4.16. C).

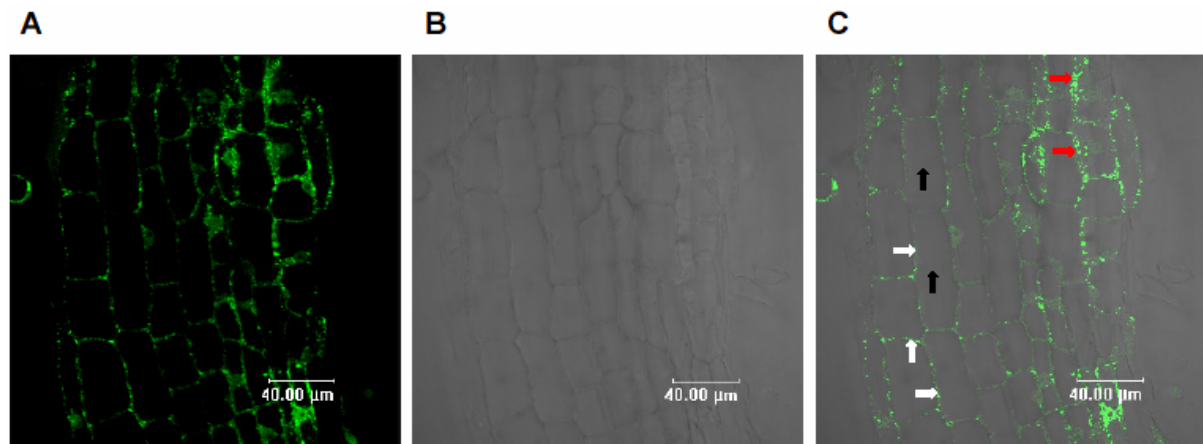


Abb. 4.16. Transgene *M. truncatula* Wurzel transformiert mit *Arf1::GFP*. A. Aufnahme der GFP-Fluoreszenz. B. Durchlichtbild. C. Überlagerung von Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme. Die Wurzelzellen sind von einer großen, zentralen Vakuole ausgefüllt (schwarze Pfeile), während das Cytoplasma nur einen geringen Bereich zwischen Vakuole und Zellwand ausmacht (weiße Pfeile). Je nach der Fokusebene sieht man das Cytoplasma als engen Schlauch (weiße Pfeile) oder in der Aufsicht als durchgehende Struktur (rote Pfeile).

In den meisten Fällen stellte sich das Cytoplasma daher als ein schmales Band (wenige μm) zwischen Zellwand und Vakuole dar. Nur in einer Ebene oberhalb oder unterhalb der Vakuole konnte das Cytoplasma in der vollen Aufsicht mikroskopiert werden. Wenn in einzelnen Aufnahmen fluoreszente Strukturen die gesamte Zelle ausfüllen, wurde daher immer auf eine der beiden Ebenen fokussiert.

Generell wurde in dieser Arbeit auf die Darstellung der korrespondierenden Durchlichtbilder, bzw. Überlagerung von Fluoreszenzaufnahmen mit Durchlichtbildern verzichtet, da mit dieser Art der Darstellung kein zusätzlicher Informationsgewinn verbunden gewesen wäre. Ebenso sind keine langatmigen Bildtafeln erstellt worden, um Bewegungsabläufe zu zeigen. Satt dessen wurden die erzielten Aufnahmen zu Filmen zusammengestellt, die auf der beigefügten CD enthalten sind. Außerdem sind sie auf folgender Homepage abrufbar:

http://www.genetik.uni-bielefeld.de/Genetik/phyto/docs/homepage_live_cell_microscopy/index.htm

Login: holger

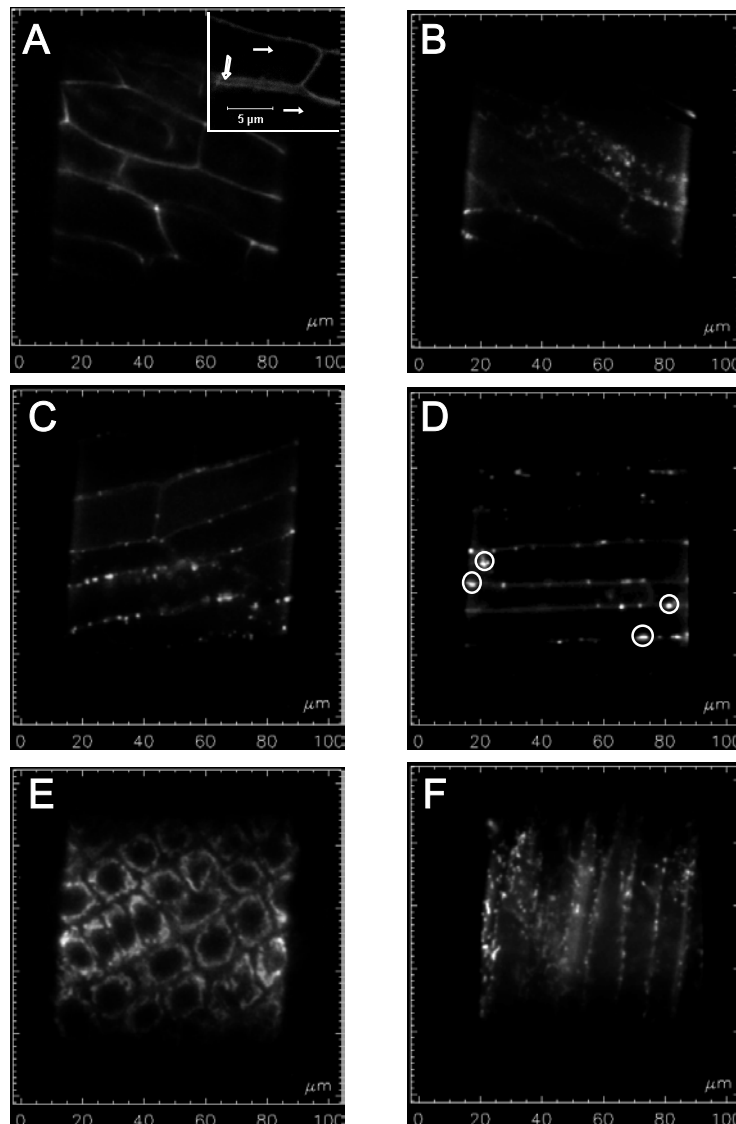
Paßwort: pilze95

Die Internetseite ist für die Betrachtung mit dem Microsoft® Internet Explorer optimiert.

4.6.4. MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ COP2::GFP sind an Strukturen lokalisiert, deren Anzahl pro Zelle vom Differenzierungsgrad der Wurzelzellen abhängt.

Im ersten Schritt zur *in vivo* Lokalisierung wurden zwei verschiedene Kontrollexperimente zur Transformation von *M. truncatula* durchgeführt. Zum einen wurden Pflanzen mit dem ursprünglichen pBIN19 Plasmid transformiert. Bei der nachfolgenden Untersuchung der Wurzeln unter UV-Anregung konnte dabei niemals GFP-Fluoreszenz entdeckt werden. Zum anderen wurden Pflanzen mit einem pBIN19 Vektor transformiert, in den das *GFP* alleine, also ohne Fusion mit einem *M. truncatula* Gen, kloniert worden war. Im Gegensatz zur Nullkontrolle konnten mit diesem Ansatz zahlreiche grün

fluoreszierende Wurzeln entdeckt werden. Bei der nachfolgenden Untersuchung mittels Zwei-Photonen Mikroskopie zeigte sich die GFP-Fluoreszenz gleichmäßig im Cytoplasma der Zellen verteilt (Abb. 4.17. A). Eine Lokalisierung der Fluoreszenz mit spezifischen Strukturen wurde nicht beobachtet. Im Gegensatz zum Cytoplasma konnte weder in der angrenzenden Zellwand noch in der zentralen Vakuole GFP-Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 4.17. A eingefügter Ausschnitt).



4.17. *In vivo* Lokalisation von GFP-fusionierten Komponenten von COPI-coated Vesikeln in *Medicago truncatula* Wurzelzellen. Wurzeln wurden mit den Konstrukten *GFP*, *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* oder *Mt ζ -COP2::GFP* transformiert und mittels Zwei Photonen Mikroskopie untersucht. *GFP* alleine zeigte keine spezifische Lokalisierung (A). Die Fluoreszenz war gleichmäßig im Cytoplasma verteilt, während die Zellwand (offene Pfeile) und die zentrale Vakuole (geschlossene Pfeile) frei von Fluoreszenz waren (eingefügter Ausschnitt). *MtArf1::GFP* (B), *Mt ζ -COP1::GFP* (C) und *Mt ζ -COP2::GFP* (D) lokalisierten in kleinen Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 1 μm . Deren Zahl nahm dabei kontinuierlich von der Wurzelspitze (E) über eine Zone ca. 1 cm hinter der Kalyptra (F) in Richtung älterer Teile der Wurzeln (B, C, D) ab. Einzelne Punkte erschienen durch Überlagerung mehrerer fluoreszenter Strukturen größer (C, weiße Kreise).

Einzelbilder wurden in einem Abstand von 1 sec aufgenommen und zu Videosequenzen mit einer Framerate von 15 fps zusammengefaßt.

Auch *M. truncatula* Wurzeln, die mit den Konstrukten *Arf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* transformiert wurden, entwickelten grüne Fluoreszenz. Die Lokalisation der Fusionen in transgenen Wurzeln wurde daraufhin mittels Zwei-Photonen Mikroskopie untersucht. Wie bei der *GFP*-Kontrolle, wurde auch hier die Fluoreszenz im Cytoplasma der Wurzelzellen detektiert. Im Unterschied zur Kontrolle war die *GFP*-Fluoreszenz allerdings nicht gleichmäßig verteilt, sondern konzentrierte sich in vielen kleinen, punktförmigen Strukturen (Abb.4.17 B, C, D). Diese hatten einen Durchmesser von je ca. 1 μ m und waren wahllos über das gesamte Cytoplasma verstreut. Interessanterweise variierte die Gesamtzahl an fluoreszenten Partikeln, in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad der untersuchten Wurzelzellen, beträchtlich.

An der Wurzelspitze, wo junge Zellen noch klein und plasmareich sind, war fast das gesamte Cytoplasma mit den Strukturen angefüllt (Abb. 4.17. E). Hingegen nahm ihre Anzahl pro Zelle in Richtung älterer Wurzelteile, wo sich Zellen durch Streckungswachstum schon in eine langgezogene Form differenziert hatten und die zentrale Vakuole fast den gesamten Zellinhalt ausmachte, kontinuierlich ab (Abb. 4.17. D). Ungefähr einen Zentimeter hinter der Wurzelspitze, in einer Zone aktiver Differenzierungsprozesse, war die Zahl an fluoreszenten Punkten sehr viel höher als in ausdifferenzierten Wurzelzellen, aber geringer als direkt an der Kalyptra (4.17. F). Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß alle drei Fusionsproteine sich in dem Muster ihrer Lokalisierung sehr stark ähnelten und daß ein Gradient in der Zahl an fluoreszenten Strukturen von der Wurzelspitze in Richtung der älteren Teile der Wurzeln beobachtet werden konnte.

4.6.5. Die fluoreszenten Strukturen strömen in einer ganz spezifischen Weise durch das Cytoplasma der Wurzelzellen

Interessanterweise waren die drei Fusionsproteine *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* nicht nur in ähnlichen Strukturen lokalisiert, bei allen drei Fusionen strömten die markierten Partikel durch das Cytoplasma der Wurzelzellen und zeigten dabei ein sehr spezifisches Bewegungsmuster (Fig. 4.17. B, C, D). Phasen aktiver Bewegung wechselten sich mit Pausen ab, in denen sich die Strukturen nicht von der Stelle bewegten. Während der Pausen zitterten sie hin und her, was prinzipiell an Brownsche Molekularbewegung erinnerte. Allerdings verharrten sie dabei an einem ganz spezifischen Ort, ganz so als ob sie dort in irgendeiner Art und Weise befestigt wären. Die Bewegung schien dabei generell bevorzugt in definierten Positionen unterbrochen zu werden. Oftmals konnten verschiedene, sich bewegende Punkte beobachtet werden, wie sie an exakt der gleichen Position anhielten und dort akkumulierten. In den Aufnahmen waren solche Orte dadurch gekennzeichnet, daß die Punkte heller und größer als der Rest der markierten Strukturen erschienen (Abb. 4.17. D). Nichtsdestotrotz bewahrten sie ihre Individualität und konnten oftmals dabei beobachtet werden, wie sie später in verschiedenen Richtungen wieder auseinander strömten (4.18.).

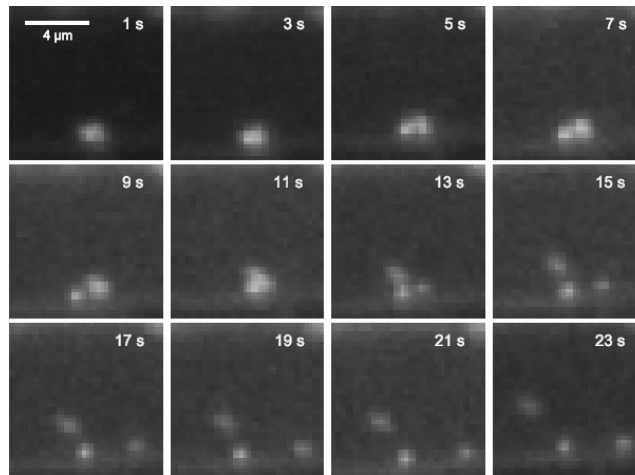


Abb. 4.18. Vergrößerter Ausschnitt einer *M. truncatula* Wurzelzelle transformiert mit *MtζCOP2::GFP*. Bildfolge über einen Zeitraum von 23 Sekunden. Verschiedene fluoreszente Strukturen, die sich in einem Ort angesammelt hatten, strömten in verschiedenen Richtungen wieder auseinander.

Generell fiel auf, daß sich einzelne Strukturen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten fortbewegten. Während manche Partikel nur sehr langsam vorankamen, strömten andere mit einer höheren Geschwindigkeit. Teilweise holten sich die Strukturen dabei gegenseitig ein oder überholten sich sogar. Zur genauen Charakterisierung der Strömungsaktivität wurde die Bewegung einzelner fluoreszenter Strukturen auf ihrem Weg durch das Cytoplasma analysiert. Dazu wurde zunächst nach Partikeln gesucht, die sich zu einem gegebenen Zeitpunkt besonders schnell bewegten, um die maximale Geschwindigkeit bestimmen zu können. Die Bewegung einzelner Strukturen wurde durch Überlagerung von Bildern verfolgt, die zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen worden waren. Die Anfangs- und Endpunkte der jeweils zurückgelegten Strecke wurden markiert und die Entfernung zwischen den Punkten ausgemessen. Die Berechnung der durchschnittlichen Geschwindigkeit während des Beobachtungszeitraums erfolgte mittels der Formel:

$$\bar{v} = \frac{s}{t}$$

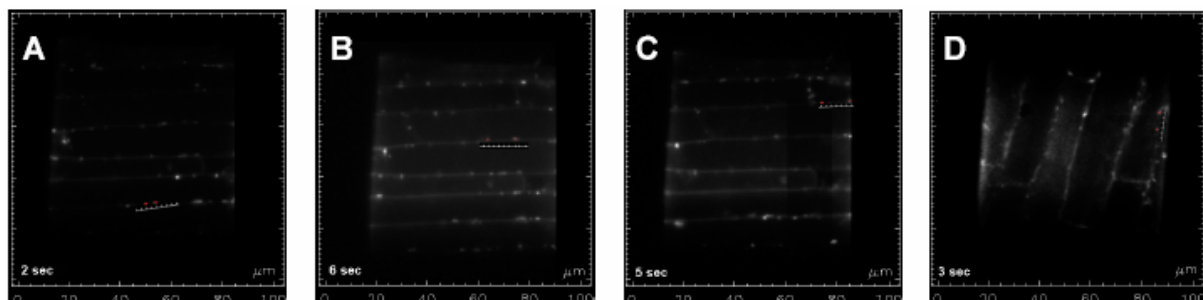
wobei

\bar{v} = durchschnittliche Geschwindigkeit

s = zurückgelegte Strecke

t = Zeitintervall

Die maximale Geschwindigkeit konnte mit dieser Methode auf etwa 2,3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ berechnet werden (Abb. 4.19.).



Quantifizierung	Zeit [sec]	Strecke [μm]	Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{sec}$]
A	2	3,9	1,96
B	6	10,4	1,73
C	5	11,8	2,32
D	3	7	2,33

Abb. 4.19. Quantifizierung der maximalen Geschwindigkeit in der Bewegung fluoreszenter Strukturen. Es wurden verschiedene Zeitpunkte nach Beginn der Aufnahmen zur Auswertung herangezogen: (A) Mt ζ -COP2::GFP (Beginn: 1 Sek., Ende 3 Sek.), (B) Mt ζ -COP2::GFP (Beginn: 26 Sek., Ende 32 Sek.), (C) Mt ζ -COP2::GFP (Beginn: 130 Sek., Ende 135 Sek.), (D) Mt ζ -COP1::GFP (Beginn: 37 Sek., Ende 40 Sek.). Die jeweiligen Start- und Endpunkte der Strecke sind rot markiert. In der Tabelle sind die Zeit in Sekunden, die zum Zurücklegen der jeweiligen Strecke benötigt wurde, die Gesamtstrecke, sowie die errechnete Durchschnittsgeschwindigkeit aufgeführt.

4.6.6. Die Strömungsaktivität unterscheidet sich nicht zwischen MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP

Nur in Ausnahmefällen bewegten sich die fluoreszenten Strukturen mit der Maximalgeschwindigkeit von 2,3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ fort. Die weitaus größte Menge der Partikel strömte weitaus langsamer durch das Cytoplasma. Dabei wechselten sich Phasen der aktiven Bewegung mit Pausen ab, in denen die Partikel an einem Ort verharren und nicht durch das Cytoplasma bewegten. Allein durch die Betrachtung der Filme konnte grob abgeschätzt werden, daß sich zu jedem gegebenen Zeitpunkt die jeweils größte Zahl an Strukturen in einer Ruhephase befand. Außerdem fiel auf, daß sich der Anteil an strömenden Strukturen im Laufe der Beobachtungszeit weiter verringerte und sich diese immer langsamer bewegten. Um nun aber einen genauen Überblick über die Strömungsaktivitäten der verschiedenen Konstrukte zu gewinnen, wurde die Anzahl der sich bewegenden gegen die Anzahl der unbewegten Strukturen in Intervallen von je 20 Sekunden quantifiziert (Abb. 7.5.1.).

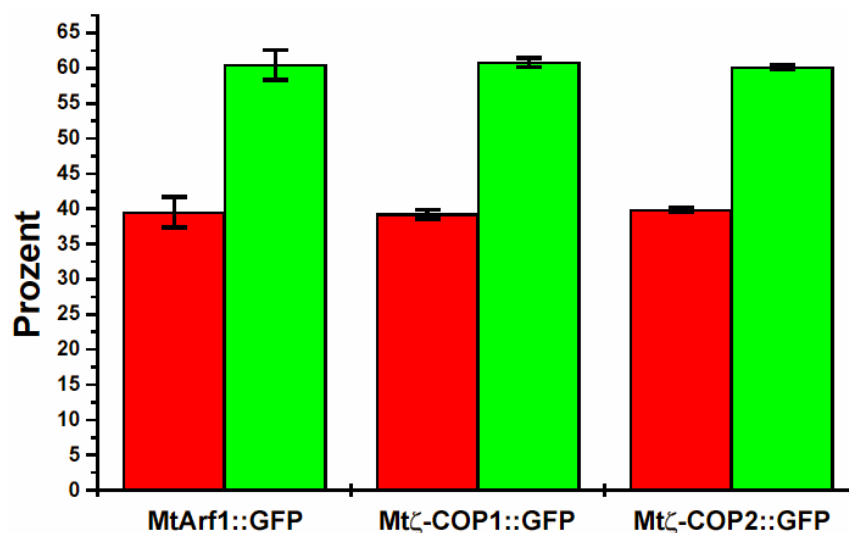


Abb. 4.20. Quantifizierung des Anteils strömender und nichtströmender fluoreszenter Strukturen in *M. truncatula* Wurzelzellen transformiert mit MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP. Die Anzahl bewegter und unbewegter Strukturen wurde über einen Zeitraum von 60 Sekunden nach Beginn der Datenaufnahme in Intervallen von je 20 Sekunden ermittelt. Angegeben sind die Durchschnittswerte an bewegten (rote Balken) und

unbewegten (grüne Balken) Strukturen in Prozent. Die Größe der jeweiligen Standardabweichung ist als Balken am Säulenende dargestellt.

Für die mittels der drei Konstrukte MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierten Strukturen konnte dabei jeweils ein Verhältnis von fast exakt 60% nichtströmenden zu 40% strömenden Partikeln ermittelt werden (Abb. 4.20.). Das Verhältnis blieb während der ersten Minute nach Beginn der Datenerfassung konstant, veränderte sich danach aber zu Ungunsten der bewegten Strukturen. Nach 80 Sekunden befanden sich nur noch etwa 28% und nach 100 Sekunden nur noch 25% der Partikel in Bewegung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es keine Unterschiede in der Strömungsaktivität zwischen den Strukturen gab, die mit den verschiedenen GFP-Fusionen markiert waren. Nach einem Zeitraum, in dem das Verhältnis zwischen bewegten und unbewegten Partikeln konstant blieb, verringerte sich der Anteil an bewegten Strukturen aber über den Beobachtungszeitraum.

4.6.7. Die Strömungsaktivität einzelner fluoreszenter Strukturen folgt keinem regelmäßigen Muster

Die Erkenntnis, daß für alle drei Fusionen das Verhältnis von bewegten zu unbewegten fluoreszenten Strukturen konstant war, warf natürlich die Frage auf, ob die einzelnen Partikel nach einem festgelegten Muster strömten, d.h. ob es definierte Zeiträume des Strömens und der Pausen gab. Wenn ja, hätte man erwarten können, daß der Zeitraum der Pausen jeweils um ein Drittel hätte länger sein müssen als der Zeitraum der Bewegung. Um die Frage beantworten zu können, wurde nach einzelnen Partikeln gesucht, die ein wechselndes Muster aus Aktivität und Passivität zeigten und sich vor allem möglichst lange in der Fokusebene befanden, um ihren Weg durch das Cytoplasma verfolgen zu können. Insgesamt wurde die Bewegungsaktivität von fünf verschiedenen fluoreszenten Strukturen durch Überlagerung von Einzelaufnahmen verfolgt und nachgezeichnet (Abb. 4.21.).

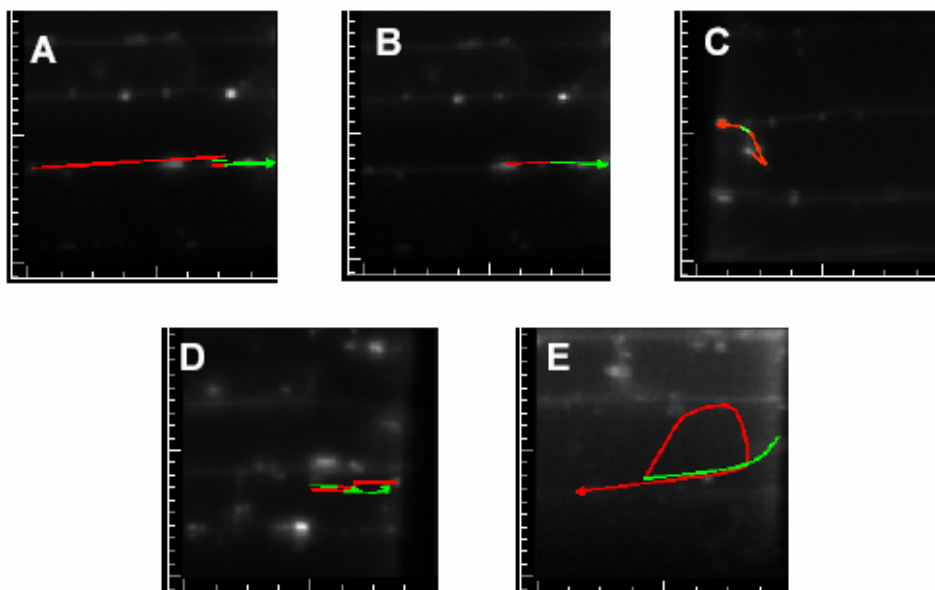


Abb. 4.21. Bewegungsmuster einzelner fluoreszenter Strukturen in *M. truncatula* Wurzelzellen. Einzelne Bewegungsabschnitte wurden alternierend mit roten und grünen Linien nachgezeichnet. Dabei konnten folgende Muster der Strömung gefunden werden:

Quantifizierung A: 24 sec Strömung 28 μm Distanz 1,16 $\mu\text{m/s}$ Geschwindigkeit \Rightarrow 4 sec 1,8 μm 0,45 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 19 sec Stop \Rightarrow 2 sec 1,3 μm 0,65 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 9 sec Stop \Rightarrow 11 sec 7,5 μm 0,68 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 6 sec Stop \Rightarrow 4 sec 1 μm 0,25 $\mu\text{m/s}$.

Quantifizierung B: 9 sec 6 μm 0,67 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 4 sec Stop \Rightarrow 9 sec 8 μm 0,89 $\mu\text{m/s}$.

Quantifizierung C: 9 sec 7,5 μm 0,83 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 65 sec Stop \Rightarrow 7 sec 1,4 μm 0,2 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 7 sec Stop \Rightarrow 9 sec 2,3 μm 0,26 $\mu\text{m/s}$.

Quantifizierung D: 14 sec 6,3 μm 0,45 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 18 sec Stop \Rightarrow 2 sec 0,7 μm 0,35 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 2 sec Stop \Rightarrow 2 sec 2 μm 1 $\mu\text{m/sec}$ \Rightarrow 96 sec Stop \Rightarrow 4 sec 3 μm 0,75 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 16 sec Stop \Rightarrow 15 sec 5,5 μm 0,39 $\mu\text{m/sec}$ \Rightarrow 23 sec Stop \Rightarrow 12 sec 6,7 μm 0,56 $\mu\text{m/sec}$.

Quantifizierung E: 31 sec 19 μm 0,61 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 16 sec Stop \Rightarrow 53 sec 51,1 μm 0,96 $\mu\text{m/s}$ \Rightarrow 127 sec Stop.

Dabei konnten folgende Daten ermittelt werden (Tab. 4.10.):

	Zeitraum [sec]	Bewegung [sec]	Distanz [μm]	durchschnittliche Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]
Quantifizierung A	79	45	39,6	0,88
Quantifizierung B	22	18	14	0,78
Quantifizierung C	97	25	11,2	0,43
Quantifizierung D	204	49	24,2	0,67
Quantifizierung E	227	84	70,1	0,83

Tab. 4.10. Zusammenfassung der Strömungsaktivität einzelner fluoreszenter Strukturen in transgenen Wurzelzellen von *M. truncatula*. Angegeben sind der Beobachtungszeitraum in Sekunden, davon der Zeitraum, in dem sich die Partikel in Bewegung befanden, die dabei insgesamt zurückgelegte Distanz und die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bewegungen.

Es konnte keine lineare Beziehung zwischen dem Zeitraum der Bewegung und dem Zeitraum der Pausen gefunden werden. Während Partikel B länger als 80% während des Beobachtungszeitraumes in Bewegung war, zeigte sich Partikel C zu 74% der untersuchten Zeitspanne unbeweglich. Zudem gab es keine lineare Korrelation zwischen der Zeit der Bewegung und der dabei zurückgelegten Strecke. Während Partikel A in 45 Sekunden insgesamt 39,6 μm mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,88 $\mu\text{m/sec}$ zurücklegte, bewegte sich Partikel C in 25 Sekunden nur 11,2 μm (0,43 $\mu\text{m/sec}$). Auch eine Betrachtung der ermittelten Einzelwerte offenbarte keine konstanten Beziehungen zwischen Strömungs- und Pausenzeiten, zurückgelegten Distanzen und durchschnittlichen Geschwindigkeiten. Die Phasen aktiven Strömens dauerten zwischen 2 sec (D) und 53 sec (E) und die der Pausen zwischen 2 sec (D) und 127 sec (E). Die einzelnen Partikel bewegten sich in unterschiedlichen Phasen mit verschiedenen Geschwindigkeiten fort. Zum Beispiel strömte Partikel A mit Durchschnittsgeschwindigkeiten von 1,16 $\mu\text{m/s}$, 0,45 $\mu\text{m/s}$, 0,65 $\mu\text{m/s}$, 0,68 $\mu\text{m/s}$ und 0,25 $\mu\text{m/s}$ durch das Cytoplasma. Für die anderen fluoreszenten Strukturen waren die Schwankungen ähnlich groß. Eine graphische Darstellung der durchschnittlichen Strömungsgeschwindigkeiten der einzelnen Partikel verdeutlicht dieses (Abb. 4.22.).

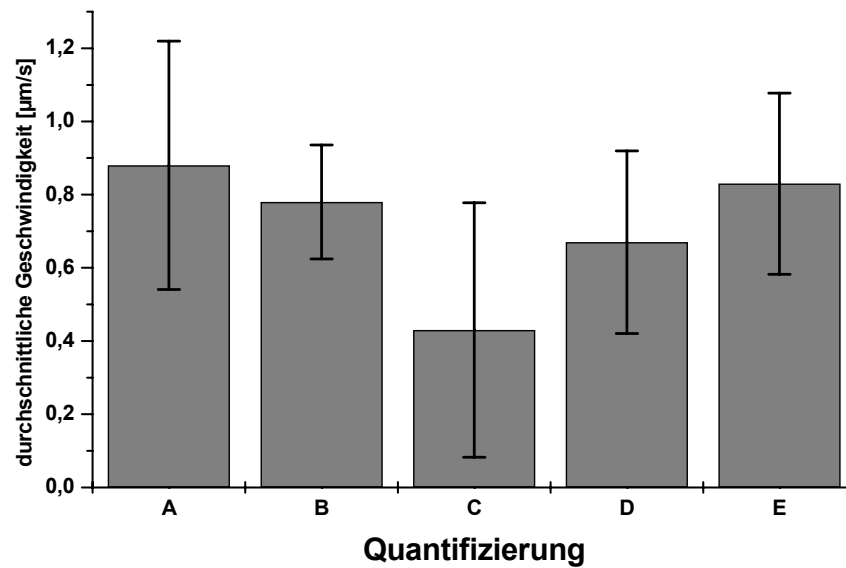


Abb. 4.22. Durchschnittliche Geschwindigkeit der fluoreszenten Strukturen während verschiedener Phasen ihrer Bewegung. Die Fehlerbalken spiegeln die jeweilige Standardabweichung wieder.

Die Werte der durchschnittlichen Geschwindigkeiten schwankte zwischen 0,43 µm/sec (C) und 0,88 µm/sec (A). Die Standardabweichungen sind dabei fast genau so groß wie die Balken selbst, d.h. die Geschwindigkeiten der fluoreszenten Strukturen während ihrer Bewegung unterlagen einer enormen Schwankungsbreite. Die minimale Geschwindigkeit betrug 0,2 µm/sec (C), der Maximalwert 1,16 µm/sec (A).

Die Bewegungsmuster einzelner Partikel folgten keinen Gesetzmäßigkeiten und waren rein zufällig. Das zuvor ermittelte, konstante Verhältnis von 60:40 unbewegten zu bewegten Partikeln spiegelt daher nur die statistische Wahrscheinlichkeit der Strömung einer Struktur wieder, sagt aber nichts über das Strömungsverhalten der einzelnen Partikel aus.

4.6.8. Bei den durch MtArf1::GFP, Mtζ-COP1::GFP und Mtζ-COP2::GFP markierten, fluoreszenten Strukturen handelt es sich um membranumhüllte Kompartimente.

Generell sind alle Kompartimente in Zellen durch Membranen vom umgebenden Cytoplasma getrennt. Um zu überprüfen, ob die durch die verschiedenen Konstrukte markierten Strukturen von einer Membran umgeben sind, wurden transgene Wurzeln mit dem Farbstoff FM4-64[®] inkubiert. FM4-64 lagert sich selektiv in Membranen pflanzlicher Zellen und deren Organellen ein (Bolte *et al.*, 2004). Der Farbstoff emittiert nach entsprechender Anregung rote Fluoreszenz mit einem Maximum bei 640 nm. Die Untersuchungen erfolgten mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie, wobei gleichzeitig auf die Fluoreszenz des Farbstoffs und die GFP-Fluoreszenz angeregt wurde und die entsprechenden Emissionen in zwei verschiedenen Kanälen gemessen wurden (Abb. 4.23.).

Nach kurzzeitiger Inkubation mit FM4-64 waren die Plasmamembranen einiger Wurzelzellen mit dem Farbstoff angefärbt (A, offene weiße Pfeile, untere Hälfte des Bildes). Der Farbstoff hatte allerdings während seiner radialen Diffusion von außen nach innen noch nicht alle Zellen erreicht. Ein Teil der Membranen war noch nicht angefärbt (A, geschlossener weißer Pfeil, Zellen in der Mitte der oberen Hälfte des Bildes). In keiner der Regionen zeigte sich eine signifikante Überlagerung der roten

Fluoreszenz von FM4-64 und der grünen Fluoreszenz der GFP-markierten Strukturen (A, weiße Kreise). Nach langzeitiger Inkubation waren alle Plasmamembranen gleichmäßig durch FM4-64 angefärbt (B). Zudem erschienen einige der zuvor grün fluoreszierenden Strukturen nun gelb (B, weiße Kreise). Der Membranfarbstoff FM4-64 reagierte also mit den fluoreszenten Partikeln, an denen die GFP-markierten Proteine aus *M. truncatula* lokalisiert waren. Die Zellkerne hingegen ließen sich weder nach kurzzeitiger noch langzeitiger Behandlung mit FM4-64 anfärben. Diese erschienen immer grün und zeigten keine Überlagerung mit der Emission des Farbstoffs (A und B).

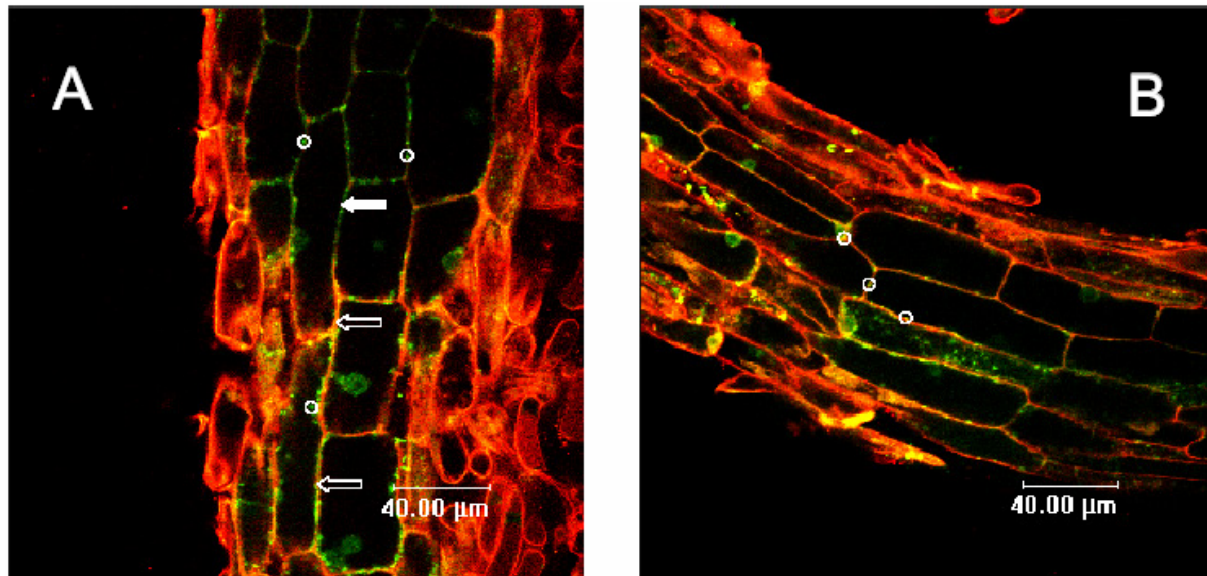


Abb. 4.23. Kolokalisation von fluoreszenten Strukturen und FM4-64 in transgenen *M. truncatula* Wurzeln. Die Pflanzen wurden mit *MtArf1::GFP* transformiert und für 30 min (A) oder 7 h (B) mit FM4-64 inkubiert.

Die Kolokalisierung von FM4-64 und GFP-fluoreszierenden Partikeln wurde als eindeutiger Hinweis gewertet, daß es sich bei den durch *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2* markierten Strukturen um membranumhüllte Kompartimente handelte. Generell war die Beobachtung der durch FM4-64 angefärbten Strukturen durch das schnelle Ausbleichen des Farbstoffs beeinträchtigt. Dieser Effekt konnte gut in den erstellten Filmen beobachtet werden.

4.6.9. Die Bewegung der fluoreszenten Strukturen ist abhängig von Aktin-Filamenten, nicht jedoch von Mikrotubuli.

Die Positionierung und Bewegung von Kompartimenten ist in eukaryontischen Zellen abhängig von Aktin-Filamenten und Mikrotubuli. Dieses Prinzip gilt auch uneingeschränkt für Pflanzenzellen (Wada & Suetsugu, 2004). Die Bewegungen der durch die Konstrukte *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* markierten Strukturen unterschied sich von einfacher Brownscher Molekularbewegung (4.6.5.). Um die Frage zu klären, ob die Bewegung der Partikel entlang von Cytoskelettelementen erfolgt, wurden transgene Wurzeln mit den Inhibitoren Latrunculin B oder Nocodazol behandelt. Latrunculin B ist ein Zellgift, das ursprünglich in dem Meeresschwamm *Latruncula magnifica* entdeckt wurde. Es bindet monomeres G-Aktin im Verhältnis 1:1 und verhindert

die Zusammenlagerung zu F-Aktin-Filamenten. Nocodazol bindet an einen Argininrest in der β -Tubulin Untereinheit und verhindert dadurch die Polymerisation von freiem Tubulin zu Mikrotubuli-Filamenten.

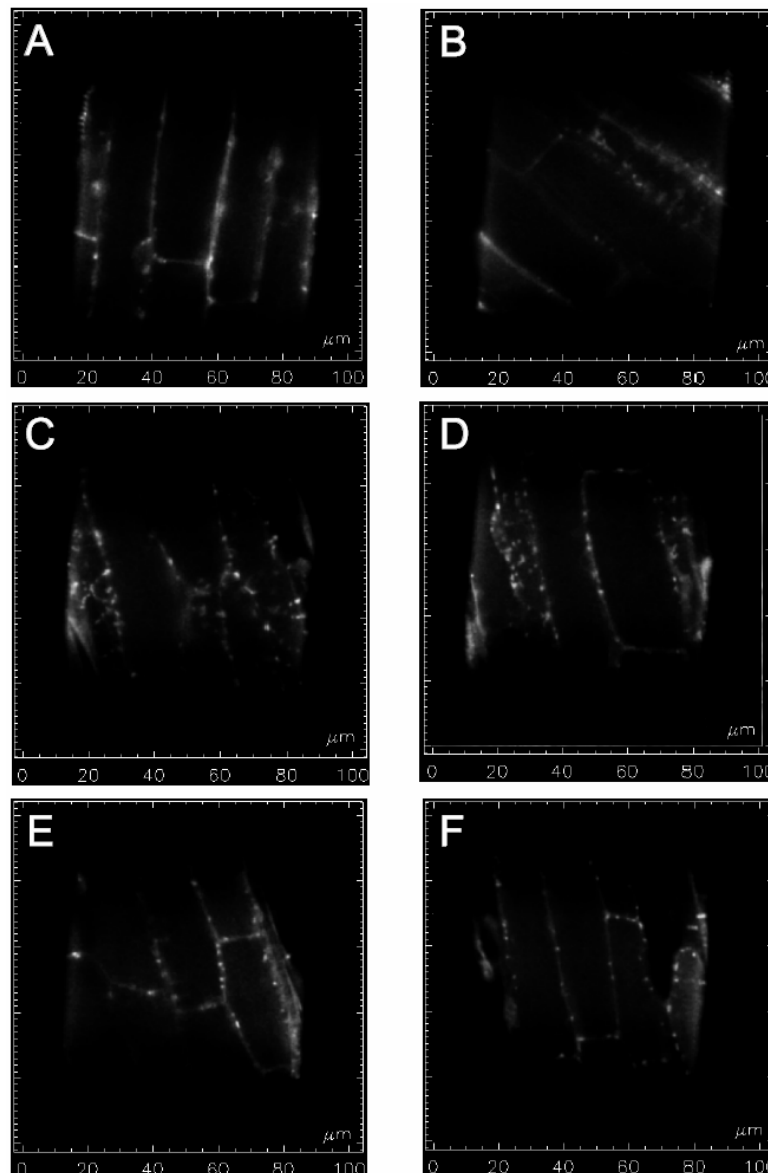


Abb. 4.24. Behandlung transgener *M. truncatula* Wurzeln mit den Inhibitoren Latrunculin B und Nocodazol. (A) Wurzel, transformiert mit *Mt ζ -COP1::GFP*, nach 7 h Inkubation mit Latrunculin B und (B) nach Auswaschen des Inhibitors über Nacht. *Mt ζ -COP1::GFP* (C) und *Mt ζ -COP2::GFP* (D) transformierte Wurzeln nach 7 h Behandlung mit Nocodazol oder DMSO (E, F).

Die Applikation des Aktin-Inhibitors Latrunculin B führte zu einer kompletten Hemmung der Bewegung GFP-fluoreszenter Strukturen in transformierten Wurzeln (Abb. 4.24 A). Die Partikel waren zwar weiterhin im Cytoplasma verteilt, bewegten sich jedoch nicht mehr. Interessanterweise war die Inhibition (zumindest zum Teil) reversibel. Nach Auswaschen des Inhibitors über Nacht setzte die Strömungsaktivität der fluoreszenten Strukturen wieder ein, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie in unbehandelten Zellen (Abb 4.24. B). In den mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Nocodazol behandelten Wurzelzellen hingegen bewegten sich die fluoreszenten Partikel auch weiterhin durch das Cytoplasma (Abb. 4.24. C, D). Allerdings fiel bei der Betrachtung der entsprechenden Filmsequenzen auf, daß die Strukturen nach relativ kurzer Zeit einen Teil ihrer Strömungsaktivität einbüßten und sich das

Verhältnis zwischen bewegten und unbewegten Strukturen zu Gunsten der unbewegten Partikel verschob. Dieser Effekt trat im Gegensatz zu unbehandelten Wurzelzellen (4.6.5.) offensichtlich schon während der ersten 60 Sekunden nach Beginn der Datenerfassung ein. Um einen Überblick über die Strömungsaktivitäten fluoreszenter Strukturen in Nocodazol behandelten Wurzelzellen zu erhalten, wurde die Anzahl der sich bewegenden gegen die Anzahl der unbewegten Strukturen für die Konstrukte *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP*, genau wie schon unter 4.6.5. beschrieben, in Intervallen von je 20 Sekunden quantifiziert (Abb. 7.5.2.).

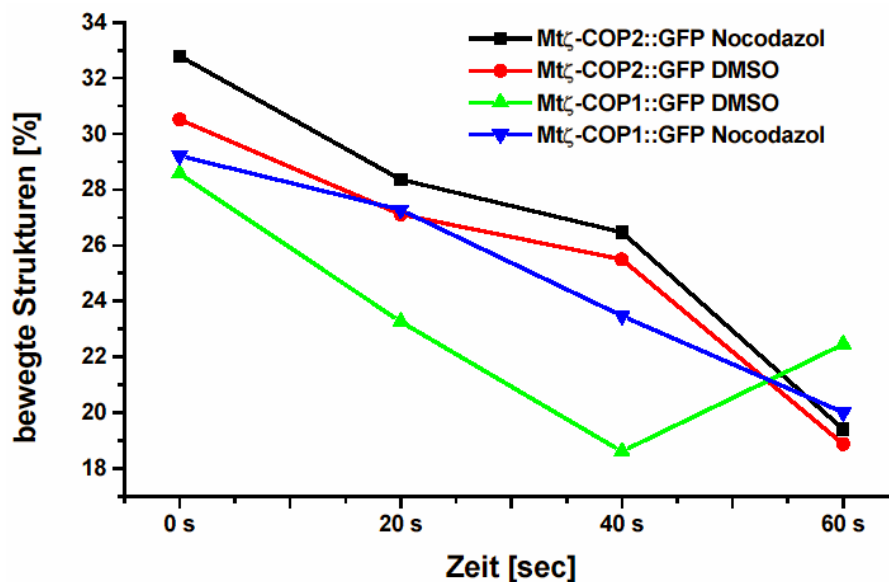


Abb. 4.25. Quantifizierung des Anteils strömender und nichtströmender fluoreszenter Strukturen in *M. truncatula* Wurzelzellen transformiert mit *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* nach Behandlung mit Nocodazol oder DMSO. Die Anzahl bewegter und unbewegter Strukturen wurde über einen Zeitraum von 60 Sekunden nach Beginn der Datenaufnahme in Intervallen von je 20 Sekunden ermittelt.

Die Applikation von Nocodazol inhibierte die Bewegung fluoreszenter Strukturen. Schon zu Beginn der Datenaufnahme waren weniger Partikel in Bewegung (*Mt ζ -COP1::GFP* 29%, *Mt ζ -COP2::GFP* 33%) als in unbehandelten Zellen (40%, siehe 4.6.5.). Ihre Zahl nahm im Verlauf der Messungen stetig ab und erreichte nach 60 Sekunden Werte um 20%.

Zur Kontrolle wurden transgene Wurzeln mit DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt, das als Lösungsmittel für die Inhibitoren diente. Die Anwendung einer adäquaten Menge DMSO hatte exakt die gleichen Auswirkungen auf die Bewegungsaktivität fluoreszenter Strukturen (Abb. 4.24. E, F). Auch hier lag die Zahl der strömenden Partikel schon zu Beginn der Datenerfassung bei Werten zwischen 29% (*Mt ζ -COP1::GFP*) und 31% (*Mt ζ -COP2::GFP*) und fiel während der ersten 60 Sekunden auf Werte zwischen 19% (*Mt ζ -COP1::GFP*) und 22% (*Mt ζ -COP2::GFP*). Das heißt, es machte keinen Unterschied, ob Wurzeln mit DMSO alleine oder DMSO mit Nocodazol behandelt wurden. Der Effekt war in beiden Fällen der gleiche. Die Anwendung von Nocodazol führte nicht zu einer Inhibierung der Strömungsaktivität der Strukturen. Auf eine Wiederholung des Versuches mit *MtArf1::GFP* transformierten Wurzeln wurde daher verzichtet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Inkubation von transgenen Wurzeln mit Nocodazol keine Auswirkungen auf die Bewegungsaktivität fluoreszenter Strukturen hatte. Zwar führte

die Zugabe von Nocodazol zu einer Inhibierung der Bewegungen, dieser Effekt konnte allerdings in genau dem gleichen Ausmaß in Kontrollversuchen mit dem verwendeten Lösungsmittel DMSO erzielt werden. Latrunculin B hingegen inhibierte die Strömungsaktivität fluoreszenter Partikel vollständig. Die Bewegung von Strukturen in transformierten *M. truncatula* Wurzeln konnte daher abhängig von F-Aktin-Filamenten, jedoch nicht von Mikrotubuli gefunden werden.

4.6.10. Bei den fluoreszenten Strukturen handelt es sich nicht um Mitochondrien

Mitochondrien in Pflanzenzellen besitzen eine Größe von ca. 1 μm und werden aktiv entlang F-Aktin und Mikrotubuli transportiert (van Gestel *et al.*, 2002). Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei den durch *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* markierten Strukturen um Mitochondrien handelte, wurden transgene Wurzeln mit MitoTracker Red CMXRos[®] inkubiert. Als Kontrolle wurden zunächst nicht-transformierte Wurzeln mit MitoTracker behandelt. Der Farbstoff emittiert nach entsprechender Anregung rote Fluoreszenz mit einem Maximum bei 600 nm. Die Untersuchungen erfolgten mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie, wobei der Farbstoff und die GFP-Fluoreszenz mittels zwei verschiedener Laserlinien angeregt und die entsprechenden Emissionen in zwei getrennten Kanälen gemessen wurden (Abb. 4.26.).

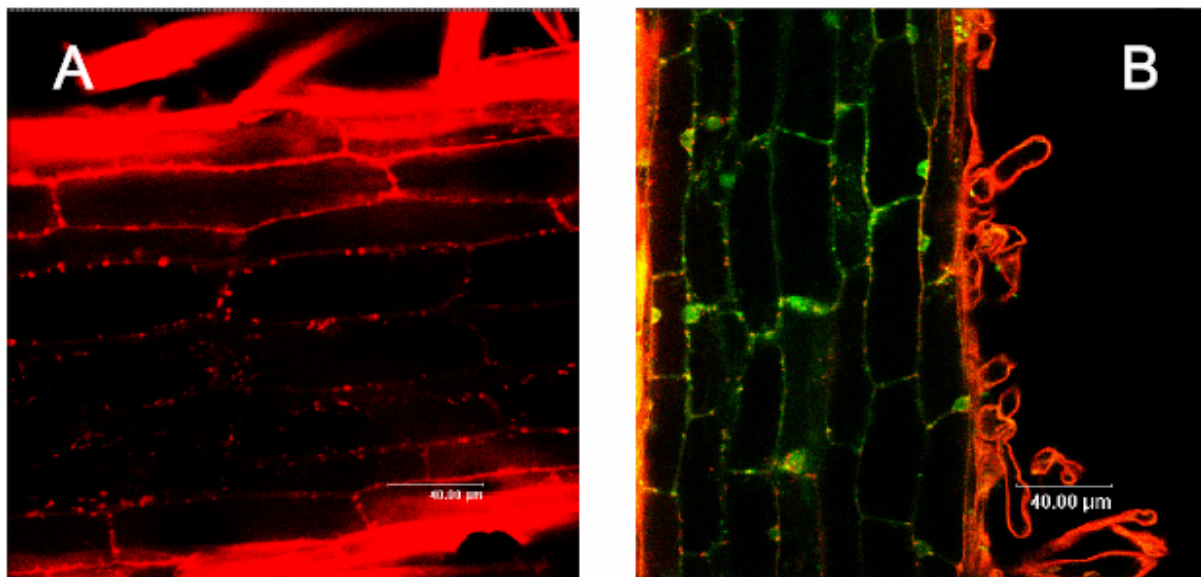


Abb. 4.26. Färbung von Mitochondrien in *M. truncatula* Wurzeln mit MitoTracker Red CMXRos[®]. (A) Nicht transformierte Wurzel gefärbt mit MitoTracker. (B) Transgene Wurzel, transformiert mit *MtArf1::GFP*, gefärbt mit MitoTracker.

Durch die Färbung mit MitoTracker konnten im Cytoplasma von Wurzelzellen zahlreiche Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb 4.26. A). Diese besaßen eine vergleichbare Größe wie die durch die Konstrukte *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* oder *Mt ζ -COP2::GFP* markierte Strukturen und strömten in ähnlicher Art und Weise durch das Cytoplasma. Auch in transgenen Wurzeln führte die Applikation des MitoTrackers zur Anfärbung der mitochondrialen Strukturen, die als rot fluoreszierende Gebilde detektiert werden konnten. Grün und rot fluoreszierende Partikel bewegten sich allerdings getrennt durch das Cytoplasma der Wurzelzellen (Abb. 4.26. B), Eine Kolokalisation, die sich durch gelb fluoreszierende Strukturen hätte äußern müssen, konnte nicht detektiert werden.

MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP konnten daher nicht an Mitochondrien lokalisiert sein.

4.6.11. Die durch *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* markierten Strukturen bewegen sich entlang von ER-Tubuli

Das Endoplasmatische Reticulum erfüllt in Pflanzenzellen viele unterschiedliche Funktionen und ist in strukturell unterscheidbare Subdomänen aufgeteilt (Staehein, 1997). Die funktionelle Diversifikation spiegelt sich auch in einem engen physiologischen Kontakt des ER mit verschiedenen anderen Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Stapeln und Plasmamembran wieder, mit denen das ER regelmäßig Material austauscht (Staehein & Chapman, 1987; Craig & Staehein, 1988; Staehein, 1997; Nebenführ *et al.*, 1999). Um die räumliche Beziehung zwischen den durch die verschiedenen Konstrukte markierten fluoreszenten Strukturen und dem ER zu untersuchen, wurden transgene *M. truncatula* Wurzeln mit DiOC₅ inkubiert. DiOC₅ ist ein sogenannter „ER-Tracker“, mit dem sich selektiv die Struktur des Endoplasmatischen Reticulums anfärben läßt. Der Farbstoff hat ein dem GFP sehr ähnliches Absorptions- und Emissionsspektrum (λ_{Abs} 484 nm, λ_{Em} 500 nm) und kann mit diesem zusammen angeregt und detektiert werden.

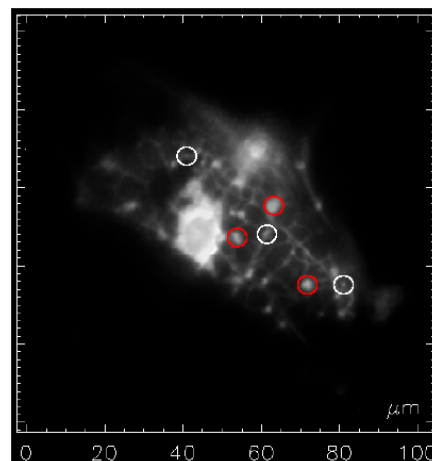


Abb. 4.27. Färbung des Endoplasmatischen Reticulums mit DiOC₅ in einer transgenen *M. truncatula* Wurzelzelle, transformiert mit *Mt ζ -COP1::GFP*. Aufsicht auf den kortikalen Bereich des Cytoplasmas der Zelle.

Mit dem Farbstoff ließ sich das lamellare Endoplasmatische Reticulum rund um den Zellkern und das tubuläre ER im kortikalen Cytoplasma anfärben (Abb. 4.27.). Um den Kern erschien das ER als kompakte Struktur und nahm einen umgebenden Bereich von ca. 2 bis 3 μm ein. Im Cytoplasma hingegen konnten extrem feine ER-Tubuli detektiert werden. Diese standen untereinander in Verbindung und bildeten ein weitmaschiges Netzwerk, das in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran lokalisiert war. Das Netzwerk durchzog, an der Innenseite der Plasmamembran aufgespannt, das gesamte Cytoplasma der Wurzelzellen. Der ER-Tracker färbte auch größere Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 4 μm , die mit den ER-Tubuli in Verbindung zu stehen schienen (Abb. 4.27. rote Kreise). Die Identität dieser Strukturen blieb unklar.

In transformierten *M. truncatula* Wurzelzellen konnten eine Vielzahl von kleinen fluoreszenten Partikeln gefunden werden, die entlang des kortikalen ER strömten (Abb. 4.27, weiße Kreise). Sie folgten während ihrer Bewegungen den ER-Tubuli und nutzten das vorhandene Netzwerk quasi als

vorgeformte Straßen. Die Partikel zeigten wieder das auffällige Strömungsmuster aus alternierenden Phasen aktiver Bewegung und Pausen, wie es für MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierte Strukturen typisch ist (4.6.5.). Dabei gab es einen interessanten Zusammenhang zwischen dem Bewegungsmuster und der ER-Struktur. Entlang der langgestreckten kortikalen ER-Tubuli erfolgte die Strömung zumeist mit gleichmäßig hoher Geschwindigkeit. An Verbindungsstellen jedoch, wo mehrere ER-Tubuli aufeinander trafen, kam die Bewegung der fluoreszenten Strukturen oftmals zum Erliegen und sie legten eine Pause in ihrer Strömungsaktivität ein. Wie im Straßenverkehr bildeten die Kreuzungspunkte Engpässe der Fortbewegung.

Die Bewegung fluoreszenter Strukturen in transgenen Wurzelzellen, transformiert mit MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP, vollzog sich entlang von ER-Tubuli. Das Strömungsmuster der Partikel konnte dabei in Verbindung mit der Struktur des ER gebracht werden.

4.6.12. Brefeldin A verändert die Morphologie der fluoreszenten Strukturen und inhibiert größtenteils ihre Bewegungen

Brefeldin A (BFA) ist ein Gift aus dem Schimmelpilz *Penicillium brefeldianum*, das die Aktivierung des kleinen G-Proteins Arf1 unterbindet. Es bindet an einen Übergangskomplex aus Arf1^{GDP} und Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEFs) und stabilisiert diesen Zustand (Robineau *et al.*, 2000). In dem Komplex aus Arf1^{GDP}-GEF-BFA kann das kleine G-Protein nicht mehr durch einen Austausch von GTP gegen GDP aktiviert werden. Die Folge ist eine Inhibierung der von Arf1 regulierten Vesikeltransportprozesse.

Die Behandlung von transgenen Wurzeln mit Brefeldin A führte zu gravierenden Veränderungen der Morphologie der durch MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierten Strukturen. Beim Vergleich mit unbehandelten, transgenen Wurzelzellen (Abb. 4.17. B, C, D) fiel auf, daß sich generell die Anzahl an fluoreszenten Partikeln nach Inkubation mit Brefeldin A stark verringerte. Statt dessen fanden sich nur wenige fluoreszente Strukturen, die im Durchschnitt allerdings wesentlich größer waren. Während in unbehandelten Zellen die Partikel einen Durchmesser von durchschnittlich etwa 1 μm hatten (Abb. 4.17. B, C, D), wiesen sie unter dem Einfluß des Inhibitors eine Größe von ca. 2 μm bis 4 μm auf (Abb. 4.28).

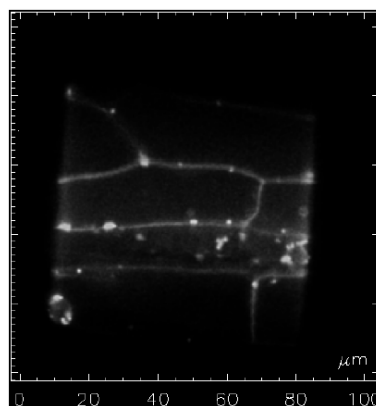


Abb. 4.28. Wirkung von Brefeldin A auf die Morphologie der fluoreszenten Strukturen in transgenen *M. truncatula* Wurzeln transformiert mit Mt ζ -COP1::GFP. Das Bild wurde nach 7 h Inkubation mit dem Inhibitor aufgenommen.

Gleichzeitig veränderte Brefeldin A die Verteilung der Strukturen in der Zelle. Zwar konnten auch hier einige Partikel im Cytoplasma verstreut gefunden werden, im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen aber akkumulierten die Strukturen bevorzugt um den Zellkern herum. Weiterhin zeigte sich die Strömungsaktivität der fluoreszenten Partikel stark eingeschränkt. Sie bewegten sich entweder gar nicht, wie die um die Zellkerne angeordneten Strukturen, oder aber nur kurzzeitig über geringfügige Strecken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Applikation von Brefeldin A zu einer Aggregation einzelner, durch MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP oder Mt ζ -COP2::GFP markierter Strukturen führte und deren Lokalisation in den Zellen zugunsten einer Anhäufung um den Zellkern veränderte. Zudem zeigte sich die Strömungsaktivität der Partikel erheblich eingeschränkt.

4.6.13. Die Lokalisation der „loss of function“ und „gain of function“ Mutante von *MtArf1* unterscheidet sich von der des Wildtyp-Proteins.

MtArf1 als kleines G-Protein unterliegt einem Zyklus von Aktivierung durch GTP-Bindung und Inaktivierung durch GTP-Hydrolyse. Wie unter 4.3.4. beschrieben, wurden durch PCR-Mutagenese zwei Varianten von MtArf1 erzeugt, die spezifische Aminosäureaustausche in den Positionen 31 bzw. 71 enthielten. MtArf1 T31N ist eine dominant inaktive Form des kleinen G-Proteins, die eine reduzierte GTPase-Aktivität aufweist, während MtArf1 Q71L eine dominant aktive Form ist, die die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse verloren hat. Der durch beide Mutanten verursachte Phänotyp sollte durch Lokalisation der GFP-Fusionen in transformierten *M. truncatula* Wurzelzellen überprüft werden.

Die dominant inaktive Form MtArf1 T31N::GFP zeigte keine spezifische Lokalisierung. Die GFP-Fluoreszenz war gleichmäßig über das gesamte Cytoplasma verteilt, ohne daß bestimmte Strukturen markiert waren (Abb. 4.29. A).

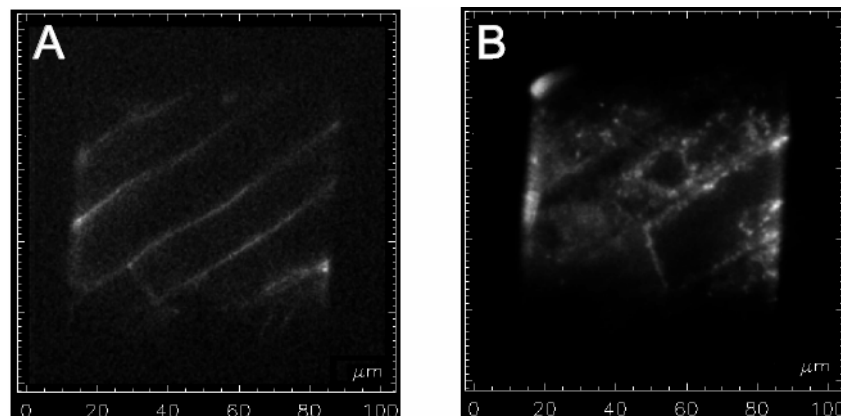


Abb. 4.29. Lokalisation von MtArf1 T31N::GFP (A) und MtArf1 Q71L::GFP (B) in „hairy root“ transformierten *M. truncatula* Wurzelzellen.

Die dominante aktive Variante MtArf1 Q71L::GFP hingegen lokalisierte in zahlreichen fluoreszenten Strukturen, die wahllos über das Cytoplasma verteilt waren. Diese zeigten wie bei MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP (Abb. 4.17. B, C, D) eine rege Strömungsaktivität aus alternierenden Phasen der Bewegung mit dazwischengeschalteten Pausen. Im Unterschied zu den anderen Fusionen war das Cytoplasma zusätzlich noch dicht mit kleinen, granulären Strukturen angefüllt. Diese hatten einen Durchmesser von weniger als 1 μ m konnten als eine Art Hintergrundfluoreszenz

detektiert werden, die das gesamte Cytoplasma ausfüllte und um den Zellkern herum konzentriert auftrat. Ihre Bewegungen folgten allerdings nicht dem typischen Muster aus Strömungen und Pausen, wie sich die größeren Partikel zeigten. Statt dessen oszillierten sie hin und her, wie man es Strukturen kennt, deren Bewegung von der Brownschen Molekularbewegung bestimmt ist.

Die beiden MtArf1-Mutanten zeigten eine grundsätzlich andere Lokalisierung als das Wildtyp-Protein. Die „loss of function“ Mutante MtArf1 T31N::GFP zeigte einen Phänotyp der Lokalisierung, der in jeglicher Hinsicht vergleichbar mit der des unfusionierten GFP war, das in Kontrollexperimenten eingesetzt wurde (Abb. 4.17. A). Für keines der beiden Konstrukte konnte eine Lokalisation in spezifischen Strukturen gefunden werden. Die dominant aktive Form MtArf1 Q71L::GFP führte zu einer Akkumulation von sehr kleinen fluoreszenten Strukturen im Cytoplasma transformierter *M. truncatula* Wurzelzellen. Ein vergleichbarer Phänotyp konnte in Wurzeln transformiert mit *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* (Abb. 4.17. B, C, D) niemals entdeckt werden.

5. Diskussion

5.1. EST-Datenbankanalyse

5.1.1. Die Strategie zur Suche in EST-Datenbanken mußte den erzielten Ergebnissen angepaßt werden.

Generell könnte die hier vorgestellte Strategie zur Identifizierung von *M. truncatula* Coatomerproteinen so oder auch in abgewandelter Form ebenfalls zur Suche nach Sequenzen anderer Komponenten verwendet werden. Der in dieser Arbeit gewählte Weg umfaßte zunächst die Suche nach bekannten Homologen aus Pflanzen. Diese Methode stellt oberflächlich betrachtet natürlich einen gewissen Umweg dar. Die EST-Datenbanken können auch direkt mittels tierischer Proteinsequenzen nach entsprechenden Homologen durchsucht werden. Die entsprechende Suchfunktion tBlastx vergleicht dabei in allen sechs Frames translatierte EST-Sequenzen mit der eingegebenen Proteinsequenz (Gish & States, 1993). Dabei ist allerdings zu bedenken, daß mit der Standard-Suchmatrix BLOSUM62 nur solche EST-Sequenzen gefunden werden, die nach Translation eine recht hohe Homologie zum Template zeigen. Sollten die Homologien hingegen nur schwach ausgeprägt sein, muß eine andere Suchmatrix wie beispielsweise BLOSUM40 verwendet werden. Dadurch wird das Ausschlußkriterium herabgesetzt, mit dem Sequenzen untereinander als homolog erkannt werden (Henikoff & Henikoff, 1992). Auch die Suche nach *M. truncatula* Coatomerproteinen hätte mittels tBlastx zur Identifizierung homologer EST-Sequenzen geführt. Es gab allerdings einen guten Grund diese Funktion nicht zu verwenden. tBlastx liefert nur dann optimale Ergebnisse, wenn die EST-Sequenzen „sauber“ sequenziert sind und eine gute Qualität aufweisen. Dieses ist allerdings nur selten der Fall. Zumeist werden ESTs im Hochdurchsatz sequenziert (Delseny *et al.*, 1997; Yamamoto & Sasaki, 1997) und ohne Kontrolle ihrer Qualität veröffentlicht (Lindlof, 2003). Sobald aber zusätzliche Basen in der Nukleotidsequenz vorhanden sind oder Basen fehlen und sich dadurch das Leseraster verschiebt, können die Sequenzen kaum mehr über tBlastx identifiziert werden. Eine Analyse der EST-Datenbanken mittels Proteinsequenzen aus dem tierischen System führte zwar zu Treffern, ein Großteil der vorhandenen, homologen EST-Sequenzen aber wurde unter Verwendung dieser Suchoption nicht gefunden. Generell ist daher immer ein Vergleich auf Basis der Nukleotidsequenzen vorzuziehen, weil dabei Sequenzvariationen, die zu einer Änderung der translatierten Aminosäuresequenz führen, nicht ins Gewicht fallen. Ein direkter Vergleich zwischen tierischen und pflanzlichen Nukleotidsequenzen wird allerdings in sehr vielen Fällen mangels genügend hoher Homologien erfolglos bleiben. Selbst für die relativ konservierten Coatomerproteine konnten bei Verwendung der Suchmatrix BLOSUM62 mittels BlastN nur sehr wenige homologe EST-Sequenzen gefunden werden. Wurde hingegen BLOSUM40 verwendet, war zwar die Zahl an gefundenen ESTs höher, allerdings ergab eine nachfolgende Auswertung, daß die Mehrzahl der Sequenzen nicht für Coatomerproteine codierte. Als sinnvollste Strategie zur Analyse von EST-Datenbanken erwies sich die Verwendung von entsprechenden pflanzlichen Nukleotidsequenzen. Mit dieser Methode konnten die am weitaus meisten homologen EST-Sequenzen identifiziert werden. Außerdem bot diese Strategie noch den weiteren Vorteil, daß mittels der translatierten Sequenzen die Domänenstrukturen zwischen pflanzlichen und tierischen Coatomerproteinen verglichen werden

konnten. Generell läßt sich die hier gewählte Strategie gut bei der Suche nach Proteinen anwenden, die zwischen Tieren und Pflanzen konserviert sind. Sie eignet sich aber nur sehr eingeschränkt zum Auffinden von Proteinen mit nur schwachen Homologien. Hier kann eine Identifizierung nur über einzelne konservierte Domänen oder Muster in der Aminosäuresequenz erfolgen.

5.1.2. COPI-coated Vesikel kommen vermutlich in allen Pflanzen vor

Durch die Analyse von *M. truncatula* EST-Datenbanken konnten zahlreiche homologe EST-Sequenzen für alle der sieben bekannten Coatomerproteine identifiziert werden (4.1.2.). Zusammen mit der regulatorischen GTPase MtArf1 (4.3.3.) steht der Pflanze damit das komplette Set an Proteinen zur Verfügung, die grundsätzlich zur Bildung von COPI-coated Vesikeln benötigt werden. In Verbindung mit Daten aus zahlreichen anderen Publikationen ergeben sich dadurch eindeutige Hinweise darauf, daß sich Pflanzen der gleichen zellulären Maschinerie zum Transport von Material zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER bedienen wie tierische Zellen und Hefen. So wurden in zahlreichen pflanzlichen Organismen Homologe des kleinen G-Proteins Arf1 identifiziert (Memon *et al.*, 1993; Regad *et al.*, 1993; Szopa & Müller-Röber, 1994). Weiterhin konnten Andreeva *et al.* (1998) durch Homologievergleiche partielle EST-Sequenzen für insgesamt 21 Proteine in verschiedenen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Brassica rapa*, *Solanum tuberosum* und *Rhizinus communis* nachgewiesen, die im tierischen System in den Membrantransport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat involviert sind. Weitere Hinweise auf die Existenz von COPI-abhängigen Transportprozessen in Pflanzen stammen aus mikroskopischen und biochemischen Beobachtungen. In unmittelbarer Nähe von Golgi-Stapeln konnten Vesikel entdeckt werden, die von einer Proteinhülle umgeben sind, sich aber klar von Clathrin-coated Vesikeln unterscheiden (Satiat-Jeunemaitre *et al.*, 1996). Außerdem konnten mit Antikörpern, die gegen Coatomerproteine des tierischen Systems gerichtet waren, Kreuzreaktivität mit entsprechenden Homologen in verschiedenen Pflanzen gezeigt werden (Movafeghi *et al.*, 1999; Pimpl *et al.*, 2000; Contreras *et al.*, 2000; Ritzenthaler *et al.*, 2002; Couchy *et al.*, 2003). Auch eine erfolgreiche *in vitro* Induktion von COPI-Vesikeln wurde von Pimpl *et al.*, (2000) demonstriert. Dazu wurde Cytosol, angereichert mit COPI-Bestandteilen, aus Zellen des Blumenkohls isoliert und mit einer Mischung aus isolierten ER- und Golgi-Membranen in Gegenwart von GTP γ S versetzt. GTP γ S ist ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analog, das zur dauerhaften Aktivierung von kleinen G-Proteinen führt. Mittels dieser Methode ließen sich zahlreiche proteinumhüllte Vesikel erzeugen, deren Bestandteile mit Antikörpern reagierten, die gegen verschiedene Bestandteile von COPI-coated Vesikeln gerichtet waren.

5.1.3. Der Vesikeltransport muß sich in allen Eukaryonten früh entwickelt haben.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von McMahon und Mills (2004) wurde die Struktur verschiedener Vesikeltypen miteinander verglichen. Ein Vergleich vieler Literaturdaten führte zu dem Ergebnis, daß COPI-coated Vesikel strukturell eng mit Clathrin-coated Vesikeln verwandt sein müssen (Abb. 5.1.). Für COPII-coated Vesikel wurden ebenfalls einige Ähnlichkeiten zu COPI-coated und Clathrin-coated Vesikeln gefunden, allerdings erwies sich der Grad an strukturellen Homologien als geringer. Die Autoren formulierten als Resümee, daß sich alle Vesikeltypen aus einem gemeinsamen

Ursprung entwickelt haben müssen. Die Hypothese basierte allerdings ausschließlich auf einem Vergleich zwischen den im tierischen System und in Hefen beteiligten Strukturen.

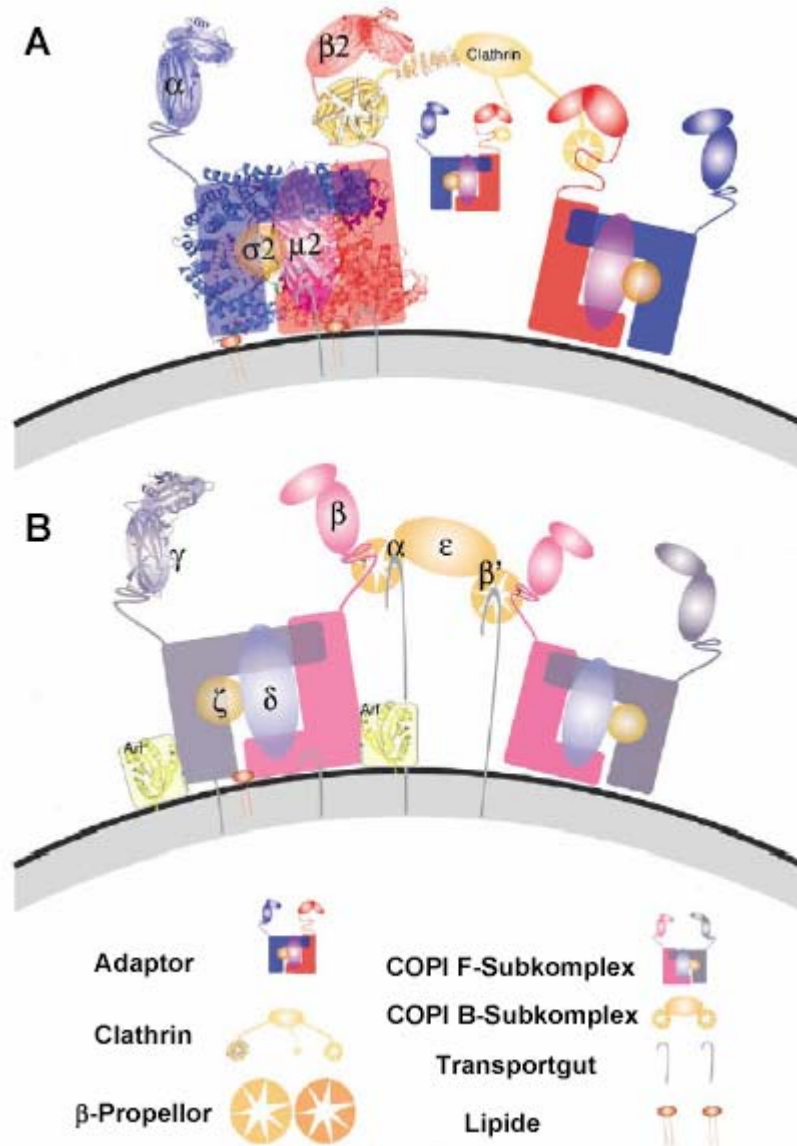


Abb. 5.1. Strukturelle Verwandtschaft zwischen Clathrin-coated Vesikeln (A) und COPI-coated Vesikeln (B). Der Clathrin-Adaptor-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten α , β , σ und μ -Adaptin, ist eng mit dem COPI-F-Subkomplex (Coatomeruntereinheiten β , δ , γ und ζ (Faulstich *et al.*, 1996)) und Clathrin mit dem COPI-B-Subkomplex (Coatomeruntereinheiten α , β' und ϵ (Faulstich *et al.*, 1996)) verwandt. Abbildung modifiziert nach McMahon & Mills (2004).

Hinweise auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von COPI-Coatomeruntereinheiten und Clathrin-Proteinen in Pflanzen wurden durch Schledzewski *et al.* (1999) beschrieben. In der Arbeit wurde eine cDNA-Sequenz der Clathrin-Untereinheit γ -Adaptin aus *A. thaliana* gewonnen und in einer anschließenden phylogenetischen Analyse mit bekannten Homologen verglichen. Dabei konnte eine Verwandtschaft zwischen Clathrin-Adaptorproteinen und dem COPI-F Subkomplex (Faulstich *et al.*, 1996), bestehend aus den Untereinheiten β -COP, δ -COP, γ -COP und ζ -COP, ermittelt werden. Auch die im Rahmen dieser Arbeit für die EST-Sequenzen ermittelten Domänenstrukturen (Tab. 4.5.) sprechen für eine enge Verwandtschaft zwischen den *M. truncatula* Coatomerprotein-Untereinheiten und Clathrin-Proteinen. So konnten für die EST-Sequenzen TC78999 und TC81826, die den N-

terminalen Teil der α -COP Coatomeruntereinheit repräsentieren, durch Homologievergleiche WD40-Motive identifiziert werden (Tab. 4.5.). Der WD40 Domäne folgt eine WD-assoziierte Domäne (WDAD). Das entsprechende Sequenzmotiv wurde in der EST-Sequenz TC82848 identifiziert, die den mittleren Teil des Proteins repräsentiert. Am C-Terminus von α -COP befindet sich eine COPI_C-Domäne, die in den ESTs TC78999 und TC81826 gefunden wurde. Zusammengenommen besitzt die α -COP Untereinheit damit die gleiche dreigeteilte Struktur wie das strukturell eng verwandte Clathrin (Miele *et al.*, 2004). WD40-Motive konnten auch in EST-Sequenzen (NF009E04 bis TC82717) identifiziert werden, die den N-Terminus der β -COP Untereinheit repräsentieren. Von WD40 Sequenzmotiven ist bekannt, daß sie β -Propeller-Strukturen formen, die multiple Proteininteraktionen erlauben und direkt oder indirekt via Adaptormolekülen mit Transportgut wechselwirken (Stenbeck *et al.*, 1993; Eugster *et al.*, 2004). Sowohl α -COP als auch β -COP rekrutieren über diese Strukturen Transportgut, das typische Sequenzmotive wie KKxx oder KxKxx enthält (Cosson & Letourneur, 1994). Die N-terminalen Domänen beider Proteine sind damit funktionell und strukturell Komponenten anderer Vesikeltypen sehr ähnlich (Serafini *et al.*, 1991b; Schledzewski *et al.*, 1999). WD40 Domänen sind auch ein typisches Merkmal der schweren Kette des Clathrins (Miele *et al.*, 2004) und von Sec13p und Sec31p, die Komponenten von COPII-coated Vesikeln sind (Barlowe, 1995).

Auch die Untereinheiten β -COP and γ -COP zeigen strukturelle Verwandtschaft zu Bestandteilen von Clathrin-coated Vesikeln (Duden *et al.*, 1991). Für beide Proteine konnte ein Adaptin N-Sequenzmotiv am N-terminus ermittelt werden (EST-Sequenzen TC89513 und AL358347 für β -COP und AW691305 bis TC77875 für γ -COP, Tab. 4.5.). Das Adaptin N-Motiv ist auch in der N-terminalen Region verschiedener α -, β - und γ -Untereinheiten der Clathrin Adaptor-Komplexe AP1, AP2 und AP3 zu finden (Wong & Brodsky, 1992; Takatsu *et al.*, 2001). Der C-Terminus beider Proteine hingegen enthält eine konservierte „Appendage“-Domäne, die auch in den Untereinheiten α , β_2 , γ und ε von Clathrin Adaptor-Komplexen enthalten ist (Hoffman *et al.*, 2003; McMahon & Mills, 2004). Über die Appendage-Domäne rekrutieren die beiden Proteine Rezeptoren für Transportgut und regulatorische Faktoren. Interessanterweise bindet β -COP dabei das regulatorische Protein Arf1 (Zhao *et al.* 1997), das die Bildung von COPI-coated Vesikeln initiiert, während γ -COP mit Arf1GAP in Wechselwirkung tritt, das die GTP-Hydrolyse in Arf1 stimuliert (Watson *et al.*, 2004). In gleicher Art und Weise treten in Clathrin-coated Vesikeln die γ -Adaptin-Untereinheit des AP1-Komplexes (Mattera *et al.*, 2004), die ε -Adaptin Untereinheit des AP4-Komplexes (Boehm *et al.*, 2004) oder GGA-Proteine (Golgi-localized, gamma ear-containing, Arf-binding proteins) (Bowman *et al.*, 2000; Bomann, 2001; Ghosh & Kornfeld, 2004) über ihre Appendage-Domäne mit Arf-Proteinen in Wechselwirkung.

Für die EST-Sequenzen TC86025 bis NF102H06 (Tab. 4.5.), die den N-Terminus der δ -COP Untereinheit repräsentieren, wurde ein Sequenzmotiv (Adap_comp_sub) gefunden, das auch in mittelgroßen Einheiten von Clathrin Adaptor-Komplexen (μ -Adaptinen) enthalten ist (Cosson *et al.*, 1996; Mullins *et al.*, 1999). Sowohl die δ -COP Untereinheit, als auch die μ -Adaptine treten mit Proteinen in Wechselwirkung, die typische hydrophobe Sequenzabschnitte beinhalten. δ -COP erkennt das Sequenzmotiv WxxxW (Andag & Schmitt, 2003), während μ -Adaptine die Aminosäuresequenz YXXO (O ist eine Aminosäure mit hydrophober Seitenkette wie Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin oder Valin) binden (Ohno *et al.*, 1998). Für ζ -COP1 (TC87228) und ζ -COP2 (TC79711)

wurde eine Domäne (Clat_adaptor_s, Tab. 4.5.) identifiziert, wie sie auch in der kleinen Untereinheit (σ -Adaptin) von Clathrin Adaptorkomplexen vorkommt (Cosson *et al.*, 1996). In beiden Vesikeltypen spielen diese kleinsten Proteine der Vesikelhülle eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Interaktionen zwischen größeren Untereinheiten. So reguliert ζ -COP die Wechselwirkung von β -COP mit γ -COP in COPI-coated Vesikeln und σ -Adaptine die Wechselwirkung von β -Adaptinen mit γ -Adaptinen in Clathrin Adaptorkomplexen (Takatsu *et al.*, 2001). Nur für die ε -COP Untereinheit konnten keine Homologien zu Clathrin-Proteinen ermittelt werden. ε -COP wird als letztes Protein in den Coatmerkomplex integriert (Lowe & Kreis, 1996) und stabilisiert dessen Struktur (Duden *et al.*, 1998). Es nimmt damit eine gleiche Funktion wie Clathrin war, unterscheidet sich aber strukturell von diesem.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Bestandteile von COPI-coated Vesikeln aus *M. truncatula* eine enge strukturelle Verwandtschaft zu Untereinheiten von Clathrin-coated Vesikeln aufweisen. Das von McMahon und Mills (2004) aufgestellte Modell (Abb. 4.5.) trifft daher uneingeschränkt auch auf Pflanzen zu. Im Vergleich der Organismen untereinander bleibt festzustellen, daß COPI-coated Vesikel und Clathrin-coated Vesikel in allen eukaryontischen Organismen von Pflanzen (Pimpl *et al.*, 2000; Holstein, 2002; Neumann *et al.*, 2003) über Tiere (Schmid, 1997; Duden, 2003; Owen *et al.*, 2004) bis hin zu Hefen (Gaynor *et al.*, 1998; Baggett & Wendland, 2001; Boehm & Bonifacino, 2002) vorkommen. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, daß sich der Vesikeltransport von Zellen relativ frühzeitig in der Entwicklungsgeschichte, noch vor der Aufspaltung der Eukaryonten in verschiedene Reiche, entwickelt haben muß.

5.2. MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 sind am Golgi-Apparat lokalisiert

Die Untersuchung transgener *Medicago truncatula* Wurzeln gliederte sich in verschiedene, aufeinander aufbauende Abschnitte. Einer allgemeinen mikroskopischen Untersuchung folgten verschiedene Versuche mit Inhibitoren und Farbstoffen. Insgesamt dienten alle Versuche dem Ziel einer Charakterisierung der durch die verschiedenen Konstrukte markierten Strukturen. Es konnten eine Fülle von Daten gewonnen werden, die im Vergleich mit Literaturdaten zusammengenommen zu dem Ergebnis führen, daß die GFP-fusionierten Proteine am Golgi-Apparat lokalisiert sind.

5.2.1. Die Verteilung der fluoreszenten Strukturen in transgenen *M. truncatula* Wurzeln ist typisch für die von Golgi-Stapeln

Die Verteilung der fluoreszenten Strukturen in „hairy root“ transformierten *M. truncatula* Wurzeln spricht für eine Lokalisation der Konstrukte am Golgi-Apparat. Die Zahl an fluoreszenten Partikeln variierte in einem Gradienten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Wurzelzellen. An der Wurzelspitze, wo sich junge, noch undifferenzierte Zellen befanden, füllten sie fast das gesamte Cytoplasma aus (Abb. 4.17. E). In Richtung älterer Zonen der Wurzel hingegen, wo sich Zellen bereits durch Streckungswachstum differenziert hatten, war ihre Anzahl weitaus geringer (Abb. 4.17 D). Generell ist bekannt, daß sich in Pflanzen die Zahl an Golgi-Stapeln pro Zelle und deren Lokalisierung in Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen verändert (Iijama & Kono, 1992). Golgi-Stapel können sich in spezifischen subzellulären Regionen konzentrieren, die durch ein Wachstum der

Zellwand oder eine intensive Sekretion gekennzeichnet sind. In Wurzelhaaren oder an Pollenschläuchen zum Beispiel sind Golgi-Stapel stets in der Nähe des Wachstumspols an der Spitze zu finden (Schnepf, 1986; Ridge, 1988; Sherrier & VandenBosch, 1994). Bei der Zellteilung assoziieren Golgi-Stapel in der Nähe des Phragmoplasten (Whaley & Mollenhauer, 1963; Hepler, 1982; Couchy *et al.*, 2003). Während der Mitose kommt es zu einer intensiven Sekretion von Golgi-synthetisierten Polysacchariden, die zur Ausbildung der neuen Zellwand benötigt werden. Der Phragmoplast enthält dazu Mikrofilamente und Mikrotubuli, die die sich neu bildende Zellwand orientieren und positionieren und sekretorische Vesikel zur Zellplatte leiten (Schopfer & Hepler, 1991). Doch nicht nur die Lokalisation der Golgi-Stapel ändert sich während des Zellzyklus, auch deren Anzahl unterliegt wesentlichen Schwankungen. Vor und im Verlauf der Mitose nimmt die Zahl an Golgi-Strukturen als Antwort auf die erhöhte sekretorische Aktivität der Zelle beträchtlich zu (Zhang & Staehelin, 1992). Die Golgi-Stapel vermehren sich dabei durch einfache Zweiteilung. Sie teilen sich entlang ihrer Längsachse in cis-trans-Richtung wodurch als Produkte zwei neue Golgi-Stapel entstehen (Hirose & Komamine, 1989). So kann ihre Zahl der erhöhten sekretorischen Aktivität der Zelle angepaßt werden.

Auch in Pflanzenwurzeln werden entsprechende Regulationsmechanismen zur Kontrolle der Zahl an Golgi-Stapeln benötigt. Wurzeln gliedern sich generell in verschiedene funktionelle Abschnitte. In der Wurzelspitze befindet sich ein Meristem mit wenigen, sich ständig teilenden Zellen (Hochholdinger *et al.*, 2004). Die Zellen in diesem Bereich zeichnen durch eine sehr hohe sekretorische Aktivität aus. Dementsprechend ist die Zahl an Golgi-Stapeln hoch. So konnten in der Spitze von Maiswurzeln etwa 300 bis 600 Golgi-Stapel pro Zelle gezählt werden (Mollenhauer & Morré, 1994). Die Zellen sekretieren große Mengen an Mucopolysacchariden, die die Wurzelspitze während ihres Wachstums durch die Erde vor Verletzungen schützen sollen. Die Polysaccharide werden im Golgi-Apparat synthetisiert und durch Exocytose aus den Zellen ausgeschleust. Ähnliche Resultate wurden für meristematische Zellen in der Wurzelspitze von Tabak und *Arabidopsis* erhalten (Staehelin *et al.*, 1990). Auch in *Medicago truncatula* Wurzeln, transformiert mit den verschiedenen Konstrukten, war die Zahl an fluoreszenten Strukturen in der Wurzelspitze am höchsten (Abb. 4.17 E). Nach der Wurzelspitze folgt eine Zone, in der aktive Wachstums- und Differenzierungsprozesse stattfinden. Zellen unterliegen hier einem Streckungswachstum, wobei große Mengen an Zellwandmaterial synthetisiert werden müssen (Reiter, 2002; Ueda *et al.*, 2005). Ein Großteil des benötigten Materials, wie Pektine und Hemicellulosen, wird davon im Golgi-Apparat gebildet und durch Vesikel zur Zelloberfläche sekretiert (Gibeaut & Carpita, 1994; Brett & Waldron, 1996). Es kann daher angenommen werden, daß die Anzahl an Golgi-Stapeln in der Differenzierungs- und Wachstumszone als Antwort auf den hohen Bedarf an sekretorischem Material hoch, aber geringer als in Zellen direkt an der Wurzelspitze ist. In transformierten *M. truncatula* Wurzeln verringerte sich in einem Abstand von 0,5 cm bis 1,0 cm von der Wurzelspitze die Zahl an fluoreszenten Strukturen entsprechend. Gleichzeitig setzte in diesem Bereich eine aktive Strömung der Partikel durch das Cytoplasma ein (Abb. 4.17. F). Der größte Teil einer Pflanzenwurzel besteht allerdings meistens aus Zellen, die bereits vollständig differenziert sind und nur wenig Material sekretieren. Aufgrund der geringen sekretorischen Aktivität werden nur wenige Golgi-Stapel benötigt. Entsprechend verringerte sich die

Zahl an fluoreszenten Strukturen in transformierten *M. truncatula* Wurzeln pro Zelle mit zunehmendem Abstand von der Wurzelspitze (Abb. 4.17. B, C, D).

5.2.2. Das Muster der Lokalisierung von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 spricht ebenfalls für eine Assoziation der Proteine mit Golgi-Stapeln

Nach der „hairy root“ Transformation konnten MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 in transgenen *Medicago truncatula* Wurzeln in fluoreszenten Strukturen konzentriert gefunden werden, die sich in einer sehr auffälligen Art und Weise durch das Cytoplasma der Zellen bewegten (Abb. 4.17. B, C, D). Vergleichbare Resultate wurden durch die Untersuchung GFP-markierter, Golgi-lokalisierter Enzyme erzielt. Nebenführ *et al.* (1999) hatten das Enzym α -1,2-Mannosidase aus Sojabohne (*G. max*) mit GFP fusioniert und in Tabak Suspensionskulturzellen untersucht. Das Enzym entfernt im Golgi-Apparat Mannosereste von N-glykosylierten Proteinen. Mittels eines anti-GFP-Antikörpers konnte das Fusionsprotein in den cis-Zisternen von Golgi-Stapeln lokalisiert werden. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde das Konstrukt in kleinen Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 1 μ m nachgewiesen, die sich in einem charakteristischen „stop and go“ Muster durch das Cytoplasma der Zellen bewegten. Phasen aktiver Strömung wechselten sich dabei mit Pausen ab. Eine Quantifizierung der Bewegungen ergab, daß sich verschiedene Golgi-Stapel zu gegebenen Zeitpunkten unterschiedlich schnell bewegten und daß gleiche Golgi-Stapel zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit verschiedenen Geschwindigkeiten unterwegs waren. Vergleichbare Resultate konnten durch Boevink *et al.* (1998) durch die Lokalisation einer Fusion aus GFP und einer Signalsequenz für Sialyltransferase aus Ratte (ST-GFP) in *Nicotiana clevelandii* Blattzellen erzielt werden. Die Signalsequenz des Proteins sorgt für den Import der Fusion in das ER, den Weitertransport in den Golgi und dort für die Verankerung in der Membran von cis-Golgi Zisternen. Das Konstrukt konnte ebenfalls in kleinen Strukturen lokalisiert werden, die ein alternierendes Muster aus Strömung und eingeschobenen Pausen zeigten. Die maximale Geschwindigkeit der Bewegungen wurde mit 2,2 μ m/sec quantifiziert. Das Muster der Verteilung der GFP-Fluoreszenz von MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP in *M. truncatula* Wurzelzellen zeigte damit auffällige Gemeinsamkeiten mit der Lokalisierung der GFP-fusionierten Golgi-Proteine α -1,2-Mannosidase und Sialyltransferase. Sowohl die Strömungsmuster der fluoreszenten Strukturen aus alternierenden Phasen der Bewegung und eingelegten Pausen, als auch die maximale Geschwindigkeit der Strömung von 2,2 μ m/sec entsprachen den durch Nebenführ *et al.* (1999) und Boevink *et al.* (1998) geschilderten Beobachtungen. Die Verteilung und das Bewegungsmuster der durch die Konstrukte MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierten Strukturen deuten daher ebenfalls auf eine Lokalisierung an Golgi-Stapeln hin.

Allein durch mikroskopische Beobachtung der Verteilung und der Bewegungsaktivität kann allerdings keine sichere Unterscheidung zwischen den verschiedenen pflanzlichen Organellen getroffen werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß (mindestens) Mitochondrien und Peroxisomen eine vergleichbare Größe besitzen (ca. 1 μ m) und gleichartige Strömungsmuster zeigen (van Gestel *et al.*, 2002; Jedd & Chua, 2002). Zur Klärung der Identität der durch die Konstrukte MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP markierten Strukturen, mußten daher weitere Nachweise geführt werden. Leider ist in Pflanzenzellen ein direkter Nachweis durch Färbung von Golgi-Strukturen nicht möglich. Zwar sind

generell Farbstoffe (BIDOPY-Ceramide) bekannt, mit denen sich der Golgi-Apparat selektiv markieren läßt, diese jedoch sind für Pflanzenzellen ungeeignet (Hawes & Satiat-Jeunemaitre, 2001). Sie akkumulieren in der pflanzlichen Zellwand und können nicht in das Zellinnere diffundieren. Zur Beantwortung der Frage, ob die Konstrukte wirklich am Golgi-Apparat lokalisieren, konnten daher nur indirekte Nachweise durch Behandlung transgener Wurzeln mit verschiedenen Farbstoffen und Inhibitoren geführt werden.

5.2.3. Die Abhängigkeit der Bewegung fluoreszenter Strukturen von Aktin-Filamenten könnte ein Hinweis für ihre Lokalisierung an Golgi-Strukturen sein

Zunächst wurden transgene Wurzeln mit Inhibitoren des Aktin-Cytoskeletts und mit einem Farbstoff zur Markierung von Mitochondrien behandelt. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Bewegung von Golgi-Strukturen in Pflanzenzellen abhängig von Aktin-Filamenten ist, Mikrotubuli jedoch keine Rolle bei der Strömungsaktivität spielen. In den Arbeiten ist eine Hemmung der Bewegung von Golgi-Stapeln nach Behandlung mit den Aktin-depolymerisierenden Substanzen Cytochalasin D, Latrunculin A oder Latrunculin B beschrieben (Nebenführ *et al.*, 1999; Boevink *et al.*, 1998, Brandizzi *et al.*, 2002, Saint-Jore *et al.*, 2002). Die Strömungsaktivität der Organellen konnte durch den Einsatz der Inhibitoren komplett inhibiert werden. Im Gegensatz dazu ließ sich die Strömung der Golgi-Strukturen nicht mit Mikrotubuli-Inhibitoren wie Nocodazol, Colchizin oder Propyzamid hemmen (Nebenführ *et al.*, 1999, Brandizzi *et al.*, 2002). Durch Behandlung transgener *M. truncatula* Wurzeln konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die Applikation von Latrunculin B inhibierte die Bewegung der durch *MtArf::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* markierten fluoreszenten Strukturen komplett und reversibel, während Nocodazol keine Auswirkung auf die Strömungsaktivität hatte (4.6.9). Die Abhängigkeit der Bewegungsaktivität der fluoreszenten Strukturen von Aktin-Filamenten könnte daher für eine Lokalisierung der Proteine am Golgi-Apparat sprechen. Allerdings stehen in Pflanzenzellen generell alle Kompartimente mit dem Cytoskelett in Verbindung (Wada & Suetsugu, 2004). So ist bekannt, daß die Bewegung verschiedener pflanzlicher Organellen wie Golgi-Stapel (Boevink *et al.*, 1998; Nebenführ *et al.*, 1999), ER (Liebe & Menzel, 1995; Hawes *et al.*, 2000), Plastiden (Liebe & Menzel, 1995), Mitochondrien (Kachar & Reese, 1988; Nebenführ *et al.*, 1999), prävakuoläre Kompartimente (Tse *et al.*, 2004) und Peroxisomen (Jedd & Chua, 2002) von Aktin-Filamenten abhängig ist. Ein Teil von ihnen, wie beispielsweise Mitochondrien (van Gestel *et al.*, 2002), Peroxisomen (Jedd & Chua, 2002) und Golgi-Stapel (Nebenführ *et al.*, 1999), wird dabei durch Myosin-Motorproteine aktiv entlang der Aktin-Filamente bewegt (Kohno & Schimmen, 1988; Shimmen & Yokota, 1994). Eine Lokalisierung von *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* an Peroxisomen oder Mitochondrien kann daher durch die Inhibitorstudien nicht ausgeschlossen werden. Ob die Bewegung der Strukturen von Myosin-Motorproteinen abhängt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft. Dazu hätten sich Inhibitoren wie beispielsweise 2,3-Butandion Monoxim (BDM) angeboten. BDM ist in tierischen Zellen als Hemmstoff der ATPase-Aktivität von Myosin II des Skelettmuskels (Herrmann *et al.*, 1992) und in Pflanzen erfolgreich zur Inhibition der Bewegung von Golgi-Stapeln eingesetzt worden (Nebenführ *et al.*, 1999). Durch Färbungen mit MitoTracker konnte aber nachgewiesen werden, daß es sich bei den durch die Konstrukte *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* markierten Strukturen nicht um Mitochondrien handelt (4.6.10.).

5.2.4. Die Färbung von transgenen Wurzeln mit FM4-64 und DiOC₅ deutet ebenfalls auf eine Golgi-Lokalisierung der Konstrukte hin

Mit dem Farbstoff FM4-64 ließen sich die durch *MtArf::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* und *Mt ζ -COP2::GFP* markierten Strukturen nach Langzeitinkubation anfärben (4.6.8). Aus Untersuchungen von Bolte *et al.* (2004) ist bekannt, daß FM4-64 verschiedene Organellen in Pflanzenzellen zeitabhängig anfärbt. Der Farbstoff markiert zunächst die Plasmamembran (Murphy *et al.*, 2005), gelangt dann durch Endocytose in das endosomale System (Ueda *et al.*, 2001; Geldner *et al.*, 2003) und wird von dort aus zum Golgi-Apparat (Bolte *et al.*, 2004) oder über prävakuoläre Strukturen (Bolte *et al.*, 2004b, Tse *et al.*, 2004) zur Vakuole (Kutusuna *et al.*, 2003) transportiert. Er gelangt allerdings nicht in alle Kompartimente. Mitochondrien, Chloroplasten, ER, Zellkern (Bolte *et al.*, 2004) und Peroxisomen (Sakai *et al.*, 1998; Nazarko *et al.*, 2005) bleiben von der Färbung ausgespart. Damit bestätigte sich das Ergebnis der Behandlung transgener Wurzeln mit MitoTracker. Mitochondrien wären von FM4-64 nicht angefärbt worden. Weiterhin konnte mit der Färbung durch FM4-64 eine Lokalisation der Konstrukte an der Vakuole oder den Peroxisomen ausgeschlossen werden. Die Vakuole unterliegt in Pflanzenzellen keiner aktiven Bewegung während Peroxisomen nicht von dem Farbstoff markiert werden. Hingegen konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Konstrukte an prävakuolären Kompartimenten (PVC) lokalisierten. Wie Tse *et al.* (2004) in Tabak BY2-Zellen zeigen konnten, bewegen sich PVC aktiv durch das Cytoplasma und werden durch FM4-64 angefärbt. Prävakuoläre Kompartimente sind allerdings im Gegensatz zum Golgi-Apparat insensitiv gegenüber dem Inhibitor Brefeldin A (5.2.5.). Auch wenn immer noch nicht vollständig geklärt ist, welche Strukturen in Pflanzenzellen (diese Feststellung betrifft vor allem das endosomale System) alle durch FM4-64 markiert werden (Bolte *et al.*, 2004), deutet das Ergebnis eindeutig auf eine Lokalisation der Konstrukte an Golgi-Stapeln oder prävakuolären Kompartimenten hin.

Durch die Anwendung des ER-Trackers DiOC₅ konnte gezeigt werden, daß sich in transgenen Wurzeln kleine fluoreszente Strukturen entlang von ER-Tubuli bewegten (4.6.11). Der Farbstoff färbt allerdings nicht ausschließlich ER-Strukturen. DiOC₅ und der strukturell sehr ähnliche Farbstoff DiOC₆ färben sowohl das ER als auch Mitochondrien (Herzberg *et al.*, 1993; Oparka & Read, 1994; Sabnis *et al.*, 1997). Mitochondrien bewegen sich in Pflanzenzellen entlang des kortikalen Endoplasmatischen Reticulums (van Gestel *et al.*, 2002). Dieses gilt aber in uneingeschränktem Maße auch für Golgi-Strukturen. So ist aus Arbeiten von Boevink *et al.* (1998) und Saint-Jore *et al.* (2002) zur *in vivo* Lokalisierung eines HDEL-Rezeptor-Homologs (ERD2) bekannt, daß sich Golgi-Stapel in Pflanzenzellen immer in unmittelbarer Nähe des kortikalen ER befinden und an ihm entlangströmen. Der HDEL-Rezeptor zirkuliert zwischen dem ER und dem Golgi und markiert beide Kompartimente. Aufgrund der Ausstattung des Zwei-Photonen-Mikroskops war eine Unterscheidung zwischen der GFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz des Farbstoffs nicht möglich. Die Emissions- und Absorptionsspektren von DiOC₅ (λ_{Abs} 484 nm, λ_{Em} 500 nm) und GFP (λ_{Abs} 488 nm λ_{Em} 507 nm) sind fast identisch. Nur durch eine geeignete Filterkombination wäre eine Abgrenzung der jeweiligen Fluoreszenz möglich gewesen. Solche standen aber nicht zur Verfügung. Es konnte daher nicht unterschieden werden, ob es sich bei den entlang des ER strömenden Partikeln um die durch die verschiedenen Konstrukte GFP-markierten Strukturen oder um die durch den Farbstoff markierten Mitochondrien handelte. In Kontrollversuchen, bei denen nicht-transgene Wurzeln mit Farbstoff

behandelt wurden, konnte ebenfalls eine Strömung von Strukturen entlang des ER beobachtet werden. Deren Anzahl war allerdings weitaus geringer als in transgenen Wurzeln. Die Behandlung transgener Wurzeln mit DiCO₅ zieht daher vermutlich eine Überlagerung von Strömungen der durch die Konstrukte markierten Strukturen und der durch DiOC₅ markierten Mitochondrien entlang des kortikalen ER nach sich (Abb. 4.27).

5.2.5. Der Inhibitor Brefeldin A verändert die Morphologie des Golgi-Apparates

Brefeldin A (BFA) inhibiert durch Arf-Proteine regulierte Vesikeltransportprozesse und führt zu dramatischen Veränderungen der Morphologie des Golgi-Apparates im tierischen und pflanzlichen System (Nebenführ *et al.*, 2002). BFA gilt daher als ein typischer Golgi-Inhibitor. Nach Inkubation transgener Wurzeln mit BFA konnte eine Aggregation von fluoreszenten Strukturen im Cytoplasma, deren Akkumulation um den Zellkern herum und eine partielle Inhibition der Bewegung der Partikel beobachtet werden (Abb. 4.28.). Während einige, aggregierte Strukturen sich kaum mehr bewegten, strömten andere noch durch das Cytoplasma. Eine gewisse Variabilität der morphologischen Veränderungen individueller Golgi-Stapel nach Applikation von BFA konnte auch von Ritzenthaler *et al.* (2002) beobachtet werden. In der entsprechenden Publikation ist beschrieben, daß die Rate, mit der einzelne Golgi-Stapel die morphologischen Veränderungen durchlaufen, von Zelle zu Zelle und auch innerhalb einzelner Zellen variierte. Ritzenthaler *et al.* (2002) haben dabei mit Tabak BY2 Suspensionskulturzellen gearbeitet, die relativ schnell und gleichmäßig von dem Inhibitor penetriert werden dürften. In Wurzeln hingegen ist die Situation nochmals komplizierter, weil der Inhibitor in einem Gradienten von außen nach innen diffundiert, was *per se* schon unterschiedliche Auswirkungen auf einzelne Zellen impliziert. Die Applikation von BFA führte zu eindeutigen morphologischen Veränderungen der durch die verschiedenen Konstrukte markierten Strukturen. Dieser Befund lieferte einen eindeutigen Hinweis dafür, daß diese an Golgi-Stapeln lokalisiert sind.

5.2.6. Die *in vivo* Lokalisierung von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 entspricht den Erwartungen

Zusammengenommen ergibt sich aus der Kombination der einzelnen Beobachtungen, daß die Proteine MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 am Golgi-Apparat lokalisiert sind. Dieses Bild wird durch bekannte *in vivo* und *in situ* Daten zur Verteilung von Arf1 und Coatomerproteinen in pflanzlichen Zellen gestützt. Durch Arbeiten zur Lokalisation des kleinen G-Proteins Arf1 konnte von Takeuchi *et al.* (2002) gezeigt werden, daß GFP-markiertes Arf1 aus *Arabidopsis thaliana in vivo* in *Arabidopsis* Protoplasten und Tabak BY2 Suspensionskulturzellen in kleinen, punktförmigen Strukturen lokalisiert ist. Eine Strömungsaktivität der fluoreszenten Strukturen wurde von den Autoren allerdings nicht beschrieben. Pimpl *et al.* (2000) und Ritzenthaler *et al.* (2002) konnten mittels eines Antikörpers gegen *Arabidopsis thaliana* Arf1 das Protein *in situ* an den cis-Zisternen bzw. in der Peripherie von Golgi-Stapeln in Wurzelzellen von Mais bzw. Tabak BY2-Zellen nachweisen. Auch die Lokalisation von Coatomerproteinen am pflanzlichen Golgi-Apparat konnte *in situ* durch Verwendung verschiedener Antikörper nachgewiesen werden. Couchy *et al.* (2003) und Ritzenthaler *et al.* (2002) demonstrierten Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen die humanen Coatomeruntereinheiten β -COP

und β -COP und gegen *Arabidopsis thaliana* γ -COP mit entsprechenden Epitopen am Golgi-Apparat. Pimpl *et al.* (2000) konnten mit Antikörpern gegen *Arabidopsis thaliana* γ -COP, *Zea mays* δ -COP und *Zea mays* ε -COP zeigen, daß hauptsächlich cis-Golgi-Stapel in Wurzelzellen von Mais und *Arabidopsis* markiert wurden. Die Beobachtung der Lokalisation von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 in *M. truncatula* Wurzelzellen an Golgi-Stapeln deckt sich auch mit den aus dem tierischen System gewonnenen Daten. In tierischen Zellen wurde eine temporäre Lokalisation von Arf1 und Coatomeruntereinheiten an der Golgi-Membran nach Aktivierung des kleinen G-Proteins durch Bindung von GTP nachgewiesen (Donaldson *et al.*, 1992b; Palmer *et al.*, 1993; Aoe *et al.*, 1998). Die Dynamik der Assoziation der Proteine mit Golgi-Membranen konnte *in vivo* durch Verwendung GFP-markierter Komponenten von COPI-coated Vesikeln demonstriert werden (Presley *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005).

Der Befund der Lokalisation von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 am Golgi-Apparat entspricht also den Erwartungen. Eines aber hätte man darüber hinaus noch annehmen können: Mit der Lokalisierung von Mt ζ -COP und Mt ζ -COP2, also Untereinheiten der Coatomerhülle von COPI-coated Vesikeln, hätte man eigentlich erwartet, neben Golgi-Stapeln auch Vesikel detektieren zu können. Auch wenn diese mit einem Durchmesser von ca. 70 nm zu klein sind, um direkt durch 2-Photonen Mikroskopie aufgelöst zu werden, so hätte sich zumindest irgendeine Art von fluoreszente Hintergrund um die Golgi-Stapel herum finden müssen. In keiner der Aufnahmen aber ergaben sich derartige Hinweise, die auf COPI-coated Vesikel hingedeutet hätten. Wenn überhaupt, waren sie nur in solch geringen Mengen vorhanden, daß ihre Detektion unmöglich war. Aus diesem Grunde wurden zusätzlich noch die „loss of function“ Mutante MtArf1 T31N und die „gain of function“ Mutante MtArf1 Q71L erstellt und *in vivo* als GFP-Fusionen lokalisiert.

5.3. Lokalisierung der „loss of function“ und „gain of function“ Mutante von MtArf1

5.3.1. Die dominant aktive Mutante MtArf1 Q71L führt zu einer Akkumulation von kleinen fluoreszenten Strukturen, die als COPI-coated Vesikel interpretiert werden können

Die dominant inaktive GTPase MtArf1 T31N::GFP zeigte keine spezifische Lokalisation in transgenen *M. truncatula* Wurzelzellen (Abb. 4.29. A). Die GFP-Fluoreszenz war vollkommen gleichmäßig im Cytoplasma der Zellen verteilt. Diese Beobachtung spricht für eine Störung des Proteins in der Assoziation mit Golgi-Membranen. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß Arf-Proteine nach ihrer Aktivierung an Membranen binden (Regazzi *et al.*, 1991; Houle *et al.*, 1995; Cavenagh *et al.*, 1996). Die Interaktion ist dabei abhängig von einer strukturellen Transition, die durch Bindung von GTP ausgelöst wird (Pasqualato *et al.*, 2003) und zur Exposition des terminalen Myristoylrests führt (Goldberg, 1998). Über den Myristoylrest lagern sich Arf-Proteine in Membranen (Antonny *et al.*, 1997). MtArf1 T31N ist also unspezifisch im Cytoplasma verteilt, weil es sich mangels der Möglichkeit zur Aktivierung nicht an die Golgi-Membran anlagern kann. Ein vergleichbares Ergebnis konnte durch Vasudevan *et al.* (1998) bei der Lokalisation von T31N-ARF1-GFP in HIRcB Zellen (HIRcB Zellen sind Fibroblasten aus Ratten, die einen humanen Insulinrezeptor überexprimieren) erzielt werden. Auch

hier zeigte sich die dominant inaktive GTPase über das gesamte Cytoplasma verstreut und nicht in spezifischen Strukturen lokalisiert.

Die dominant aktive GTPase MtArf Q71L::GFP zeigte in *Medicago* Wurzeln einen komplett anderen Phänotyp in der Verteilung der GFP-Fluoreszenz. Wie das „Wildtyp“ Protein MtArf1::GFP lokalisierte ebenfalls an Golgi-Stapeln, zusätzlich konnte aber ein massiver Hintergrund kleiner, granulärer Strukturen im Cytosol detektiert werden (Abb. 4.29. B). Es kann spekuliert werden, daß diese COPI-coated Vesikel repräsentierten. Die Inaktivierung von Arf1^{GTP} durch GTP-Hydrolyse ist eine wesentliche Voraussetzung für die Fusion der Vesikel mit dem ER. Durch die Inaktivierung von Arf1 verliert die Coatomerhülle ihre Stabilität und fällt von den Vesikeln ab (Reinhardt *et al.*, 2003). Dieses leitet deren Fusion mit der Zielmembran über v-SNARE/t-SNARE-Interaktionen ein (Nickel & Wieland, 1997). Daher verlieren COPI-coated Vesikel, die sich in Anwesenheit der dominant aktiven Form Arf1 Q71L abschnüren, ihre Proteinhülle nicht und können nicht mit der ER-Membran verschmelzen (Pepperkok *et al.*, 2000). Auch aus dem tierischen System ist bekannt, daß Arf1 Q71L zu einer Veränderung der Morphologie des Golgi-Apparates und der Akkumulation von COPI-coated Vesikeln im Cytoplasma von Zellen führt (Tanigawa *et al.*, 1993; Pepperkok *et al.*, 2000).

Yang *et al.* (2005) konnten in Tabak BY2-Zellen bei der Lokalisierung von Komponenten von COPII-coated Vesikeln einen Hintergrund von diffuser Fluoreszenz in der den Zellkern umgebenden Matrix ausmachen. Auch in dieser Veröffentlichung wird spekuliert, daß diese Hintergrundfluoreszenz COPII-coated Vesikel repräsentieren könnte.

5.4. Die Beobachtungen zur Lokalisation von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 unterscheiden sich in einigen Punkten von bekannten Literaturdaten.

Das in den vorausgehenden Abschnitten präsentierte Gesamtbild zur Lokalisation von MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 ergab sich durch die vielen einzelnen Ergebnisse. Dieses ist insbesondere vor dem Hintergrund zu sehen, daß einige Beobachtungen nicht mit den aus der Literatur bekannten Daten übereinstimmten. So deuten einige Ergebnisse zum Beispiel auf Unterschiede in der Morphologie von Golgi-Stapeln in verschiedenen Pflanzengeweben oder auf andere Mechanismen der Rekrutierung von Coatomeruntereinheiten an die Golgi-Membran als im tierischen System hin. Diese sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

5.4.1. Die beiden Isoformen Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 unterscheiden sich nicht in ihrer Lokalisation

Die beiden Isoformen Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP zeigten ein identisches Muster in ihrer Verteilung (Abb. 4.17. C, D). Dieser Befund ist überraschend, da die beiden Proteine nur zu etwa 72 % zueinander identisch sind (Abb. 4.11.) und daher eine verschiedenartige Lokalisation, insbesondere vor dem Hintergrund von Daten aus dem tierischen System, erwartet werden konnte. Durch eine Arbeit von Wegmann *et al.* (2004) ist bekannt, daß im Cytosol von Leberzellen zwei ζ -COP und zwei γ -COP Isoformen in drei verschiedenen Subkomplexen miteinander in Wechselwirkung treten können. So konnten die Kombinationen γ -COP1/ ζ -COP1, γ -COP1/ ζ -COP2 und γ -COP2/ ζ -COP1 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1:2 detektiert werden. Durch immunologische Nachweise wurden

die drei verschiedenen Formen in Hepatozyten von Ratten in individuellen Typen von COPI-coated Vesikeln detektiert, die eine unterschiedliche Verteilung im Cytoplasma zeigten. Für *M. truncatula* kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Lokalisierung der beiden ζ -COP Isoformen unter spezifischen Bedingungen oder in einzelnen Zelltypen unterscheiden könnte. Zum Beispiel führte eine Immunodetektion der β -COP Untereinheit in sich teilenden Zellen von Maiswurzeln zu einer Markierung des Phragmoplasten (Couchy *et al.*, 2003). Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Yang *et al.* (2005) bei der Lokalisierung von Sec13::GFP, einer Komponente von COPII-coated Vesikeln, in Tabak BY2-Zellen erzielt. In *M. truncatula* Wurzeln waren *in vivo* Beobachtungen zur Lokalisation der Konstrukte in sich teilenden Zellen leider nicht möglich. Erstens sind nur sehr wenige teilungsaktive Zellen in einem Meristem an der Wurzelspitze vorhanden und zweitens zeigen diese einen sehr hohen Hintergrund an Autofluoreszenz. Zellen in der Kalyptra von *M. truncatula* sekretieren große Mengen verschiedener, autofluoreszenter Mucopolysaccharide, die eine mikroskopische Analyse der Lokalisation GFP-markierter Proteine in diesem Bereich unmöglich machen.

5.4.2. Die Golgi-Stapel müssen sich in verschiedenen pflanzlichen Geweben oder zwischen verschiedenen Pflanzen voneinander unterscheiden.

In Veröffentlichungen von Boevink *et al.* (1998) und Nebenführ *et al.* (1999) wurden mit verschiedenen GFP-Fusionen markierte Golgi-Stapel als Ring- oder „Doughnut“-Strukturen beobachtet. Die GFP-markierte Signalsequenz der Sialyltransferase (ST-GFP) bzw. GFP-fusionierte α -1,2-Mannosidase I lokalisieren an den terminalen Enden der Golgi-Zisternen, während der zentrale Bereich der Golgi-Stapel frei von Fluoreszenz bleibt. Durch diese asymmetrische Verteilung der Fluoreszenz erscheinen die Strukturen daher bei mikroskopischen Untersuchungen in der Frontalansicht scheibenförmig und in der Aufsicht ringförmig. Dieses Resultat konnte durch Ritzenthaler *et al.* (2002) in einer nachfolgenden Studie durch *in situ* Untersuchungen mittels Antikörpern gegen *Arabidopsis thaliana* Arf1 und γ -COP in Tabak-Suspensionskulturzellen nochmals bestätigt werden. Für die verschiedenen GFP-markierten Proteine aus *M. truncatula* hingegen konnte niemals eine Organisation in ringförmigen Strukturen beobachtet werden. Die fluoreszenten Partikel erschienen immer als kompakte Strukturen mit einer gleichmäßigen Verteilung der GFP-Fluoreszenz. Auch das als Transformationskontrolle verwendete ST-GFP Konstrukt zeigte ein gleichartiges Muster der GFP-Lokalisation. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Couchy *et al.* (2003) bei der *in situ* Lokalisierung der β -Coatomer Untereinheit in Wurzelzellen von Mais erzielt. Mittels eines anti- β -COP Antikörpers konnten die Golgi-Stapel ebenfalls als punktförmige, nicht aber als ringförmige Strukturen dargestellt werden.

Die unterschiedlichen Beobachtungen könnten auf morphologischen Unterschieden von Golgi-Stapeln in verschiedenen Zelltypen oder Pflanzen beruhen. In allen Arbeiten, in denen die Lokalisierung von Proteinen an Golgi-Stapeln als ringförmig verteilt beschrieben wurde, wurden Tabak-Suspensionskulturzellen bzw. Tabak-Blattzellen als Untersuchungsobjekte verwendet (Boevink *et al.*, 1998; Nebenführ *et al.*, 1999; Ritzenthaler *et al.*, 2002). Aus der Literatur ist bekannt, daß sich die Morphologie von Golgi-Stapeln in verschiedenen Zelltypen (Moore & Staehelin, 1988; Staehelin *et al.*, 1990; Zhang & Staehelin, 1992) oder unter geänderten physiologischen Bedingungen verändert (Iijima & Kono, 1992). Generell nimmt die Anzahl an Zisternen mit erhöhter sekretorischer Aktivität von

Zellen zu (Schnepf & Busch, 1976; Staehelin *et al.*, 1990). Außerdem verändert sich die Morphologie der Zisternen. In Schleim-sekretierenden Zellen von Mais-Wurzelspitzen sind zum Beispiel die trans-Zisternen der Golgi-Stapel erheblich erweitert (Schnepf, 1993). An ihnen schnüren sich große Vesikel ab, die das Material zur Zelloberfläche transportieren. Ähnliche Differenzierungen in der Golgi-Morphologie konnten in Zellen der Wurzelspitzen von Tabak und *Arabidopsis* gefunden werden (Staehelin *et al.*, 1990). So ist es durchaus denkbar, daß Golgi-Stapel in Wurzel- und Blattzellen oder verschiedenen Pflanzen unterschiedliche morphologische Ausprägungen besitzen, die zu einem veränderten Muster der Lokalisation gleicher Konstrukte und unterschiedlichen Antworten auf eine Behandlung mit Brefeldin A führen. Aus den derzeit vorhandenen Literaturdaten ergibt sich allerdings kein Anhaltspunkt, worin der Unterschied zwischen Golgi-Stapeln in Blättern und Wurzeln oder verschiedenen Pflanzen bestehen könnte.

5.4.3. Unterschiedliche Beobachtungen der Wirkung von Brefeldin A auf pflanzliche Gewebe sind vermutlich abhängig von der Lokalisierung der Proteine, die zur Markierung der Golgi-Stapel verwendet wurden.

Für das tierische System ist beschrieben, daß die Behandlung von Zellen mit Brefeldin A zu einem Zerfall des Golgi-Apparates führt, was die Resorption von cis-Zisternen in das Endoplasmatische Reticulum und eine Fusion von trans-Zisternen zu einem sogenannten „BFA-Kompartiment“ nach sich zieht (Klausner *et al.*, 1992). In dieser Arbeit hingegen konnte nach Applikation von Brefeldin A zu transgenen Wurzelzellen keine Fusion von Golgi-Stapeln mit dem ER beobachtet werden (Abb. 4.28). Es bildeten sich große BFA-Kompartimente im Cytosol und um den Zellkern herum, die als große fluoreszente Strukturen detektiert werden konnten. Eine ähnliche Situation nach Inkubation mit BFA wurde von Couchy *et al.* (2003) für Wurzelzellen von Mais beschrieben. In den Zellen fanden sich Aggregate von Golgi-Stapeln im Cytosol, die durch Antikörper gegen Arf1p, β -COP und γ -COP markiert werden konnten. Die Antikörper reagierten aber nicht mit ER-Strukturen. Die Bildung von BFA-Kompartimenten ist auch aus anderen Publikationen bekannt, die sich mit den Effekten von Brefeldin A auf den Golgi-Apparat in Wurzelzellen beschäftigten, die mit Golgi-Markern transformiert waren (Wee *et al.*, 1998, Baldwin *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001, Tse *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde durch Boevink *et al.* (1998), Saint-Jore *et al.* (2002), Brandizzi *et al.* (2002) und Takeuchi *et al.* (2002) die Bildung eines ER-Golgi-Hybrids nach Inkubation transformierter Pflanzenzellen mit BFA beschrieben. Spezifische Golgi-Marker gelangten nach Applikation von Brefeldin A in das ER und verteilten sich dort gleichmäßig. Die Autoren konnten allerdings keine BFA-Kompartimente in den behandelten Zellen entdecken. Die Inhibition der Struktur von Golgi-Stapeln in pflanzlichen Zellen mit Brefeldin A führt also zu widersprüchlichen Beobachtungen.

Es ist bekannt, daß Brefeldin A vergleichbare Auswirkungen auf die Morphologie pflanzlicher Golgi-Stapel hat, wie sie auch für das tierische System beschrieben wurden. Auch hier kommt es zu einem graduellen Verlust von cis-Zisternen und der Bildung von BFA-Kompartimenten, die nicht mit dem ER fusionieren (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Die unterschiedlichen Reaktionen von Pflanzenzellen auf die Applikation von Brefeldin A sind daher nicht mit einem unterschiedlichen Wirkungsmechanismus in Pflanzen begründbar. Statt dessen kann angenommen werden, daß die verschiedenen Beobachtungen auf einer unterschiedlichen Lokalisation von Markerproteinen an den Golgi-Stapeln

beruhen, die in den verschiedenen Studien verwendet wurden. Die GFP-markierte Signalsequenz der Sialyltransferase (ST-GFP) (Boevink *et al.*, 1998; Saint-Jore *et al.*, 2002; Brandizzi *et al.*, 2002), das HDEL-Rezeptor Homolog ERD2 (Boevink *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 2002; Brandizzi *et al.*, 2002) und α -1,2 Mannosidase I (Ritzenthaler *et al.*, 2002) lokalisieren alle in den cis-Zisternen der Golgi-Stapel und gelangen nach BFA-Behandlung in das ER. Im Gegensatz dazu befinden sich eine myc-markierte Sialyltransferase (Wee *et al.*, 1998) und die Proteine ADL6 (Jin *et al.*, 2001) und GONST1 (Baldwin *et al.*, 2001; Tse *et al.*, 2004) in den trans-Golgi-Zisternen oder dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und konzentrieren sich nach Zugabe von Brefeldin A in BFA-Kompartimenten. Durch die Lokalisierung der Konstrukte entweder im cis- oder trans-Golgi kann nur die Bildung des ER-Golgi-Hybrids oder von BFA-Kompartimenten verfolgt werden. Der jeweils komplementäre Teil (BFA-Kompartimente oder das ER-Golgi-Hybrid) der Strukturen ist zwar vorhanden, kann aber nicht detektiert werden.

Aufgrund der Beobachtung, daß MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP nach Behandlung der Zellen mit Brefeldin A in BFA-Kompartimenten konzentriert sind, könnte die erste Schlußfolgerung demnach sein, daß die Proteine ausschließlich an den trans-Zisternen der Golgi-Stapel lokalisieren. Dieses befände sich allerdings im Widerspruch zu *in situ* Nachweisen von COPI-coated Vesikeln in Pflanzenzellen. Durch Antikörper gegen *Arabidopsis thaliana* γ -COP, *Zea mays* δ -COP und *Zea mays* ε -COP konnte gezeigt werden, daß COPI-Coatomeruntereinheiten und Arf1p hauptsächlich in den cis-Zisternen von Golgi-Stapeln in Mais und *Arabidopsis* Wurzelzellen lokalisiert sind (Pimpl *et al.*, 2000). Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Ritzenthaler *et al.* (2002) in Tabak BY2-Zellen bei der *in situ* Lokalisation der Coatomeruntereinheit γ -COP und Arf1 mittels spezifischer Antikörper erzielt. Generell kann daher angenommen werden, daß die Proteine MtArf1, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 sowohl an cis- als auch an trans-Zisternen von Golgi-Stapeln lokalisieren (In geringem Ausmaß konnten COPI-Coatomeruntereinheiten und Arf1p auch an trans-Zisternen detektiert werden (Pimpl *et al.*, 2000)). Im Unterschied zu den Proteinen Sialyltransferase, ERD2, α -1,2 Mannosidase I und GONST1 sind MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP aber nicht fest in die Golgi-Membran integriert, sondern nur mit dieser nach Aktivierung von Arf1 assoziiert (Lowe & Kreis, 1996; Antony *et al.*, 1997). Die Verteilung der Proteine nach Inkubation mit Brefeldin A kann daher wie folgt erklärt werden: Nach Behandlung transgener *M. truncatula* Wurzelzellen mit BFA verschmelzen die cis-Zisternen der Golgi-Stapel vermutlich mit dem Endoplasmatischen Reticulum zu einem ER-Golgi-Hybrid. Dafür spricht insbesondere die Akkumulation von BFA-Kompartimenten um den Zellkern herum, der bekanntlich vom ER umgeben ist (Abb. 4.28). Die Proteine MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP aber dissoziieren von der Golgi-Membran ab und können nicht an der Hybridstruktur detektiert werden. Im Gegensatz dazu gelangen integrale Proteine der cis-Golgi-Stapel wie Sialyltransferase, ERD2, α -1,2 Mannosidase I und GONST1 mit der Verschmelzung der beiden Kompartimente in das ER-Golgi-Hybrid, so daß dieses von ihnen markiert wird. Die trans-Zisternen wiederum formen nach Behandlung mit Brefeldin A ein BFA-Kompartiment, das durch MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP weiterhin markiert bleibt, da die Proteine hier nicht in das Cytosol dissoziieren. Dieser Punkt wird in Abschnitt 5.4.4. ausführlich diskutiert.

5.4.4. Die Retention von MtArf1 und Coatomeruntereinheiten an BFA-Kompartimenten setzt einen spezifischen, bislang unbekanntem Mechanismus voraus

Als einer der ersten Effekte der Wirkung von Brefeldin A setzt in tierischen Zellen und Hefen ein vollständiges Verschwinden von COPI-Proteinen und Arf1 vom Golgi-Apparat ein (Donaldson *et al.*, 1991; Vogel *et al.*, 1993; Kreis *et al.*, 1995). So konnte zum Beispiel in LdlF-Zellen (eine spezielle Linie von CHO-Zellen, die eine temperatursensitive Mutation in ϵ -COP tragen) innerhalb von 15-30 Sekunden nach Zugabe von BFA eine komplette Dissoziation von Arf1-CFP und ϵ COP-YFP vom Golgi-Apparat in das Cytosol beobachtet werden (Presley *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu lokalisierten die Coatomer-Untereinheiten Mt ζ -COP1 and Mt ζ -COP2 und das Regulatorprotein MtArf1 auch nach Behandlung der Wurzeln mit Brefeldin A an den gebildeten BFA-Kompartimenten. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Couchy *et al.* (2003) in Wurzelzellen von Mais erzielt, als der Effekt von Brefeldin A auf die Lokalisation von Arf1p und die Coatomer-Untereinheiten β -COP, β' -COP and γ -COP untersucht wurde. Die Proteine blieben ebenfalls an BFA-Kompartimenten lokalisiert und diffundierten nicht in das Cytosol. Wenn das unter 5.4.3. vorgestellte Arbeitsmodell für die von Brefeldin A in transgenen *M. truncatula* Wurzeln hervorgerufenen Effekte stimmen sollte, so dissoziiert nur der Teil der Proteine MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP ins Cytosol, der an den cis-Zisternen lokalisiert ist. Der andere, an den trans-Zisternen lokalisierte Teil, bleibt hingegen mit den sich bildenden BFA-Kompartimenten in Verbindung.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu der generellen Modellvorstellung der Rekrutierung von Arf1 und Coatomerproteinen an die Golgi-Membran. Nach dieser lagern sich die verschiedenen Bestandteile der Coatomerhülle erst nach Aktivierung von Arf1 durch Bindung von GTP an die Membran an. Aktiviertes Arf1^{GTP} rekrutiert dabei präformierte, cytosolische Coatomer-Komplexe und leitet die Bildung eines COPI-coated Vesikels ein (Lowe & Kreis, 1996). Insgesamt betrachtet gibt es in diesem Prozeß einen ständigen Austausch zwischen einem Pool membrangebundener Proteine und einem größeren Pool cytosolischer Proteine (Ward *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2005). Wenn nun aber die Aktivierung von Arf1 durch Brefeldin A inhibiert ist, sollte dieser Austausch zum Erliegen kommen und sämtliche Proteine sollten sich im cytosolischen Pool sammeln. Genau dieses geschieht in tierischen Zellen und Hefen (Donaldson *et al.*, 1991; Presley *et al.*, 2002). In den mit Brefeldin A behandelten, transgenen *M. truncatula* Wurzelzellen hingegen bleiben die Proteine an BFA-Kompartimenten lokalisiert. D.h. es muß einen Mechanismus geben, der die Proteine in der unmittelbaren Umgebung dieser Struktur zurückhält.

Als Rezeptor von Arf1^{GDP} an der Golgi-Membran konnte ein p23 Typ I Transmembranprotein identifiziert werden (Gommel *et al.*, 2001; Abb. 2.9.). Durch Majoul *et al.* (2001) konnte über FRET (fluorescence resonance energy transfer)-Messungen eine direkte Interaktion zwischen p23-CFP und YFP-markiertem Arf1^{GDP} demonstriert werden. Auch für ein p23 Homolog aus *A. thaliana* (Atp24) wurde eine Wechselwirkung mit Arf1^{GDP} gezeigt (Contreras *et al.*, 2004). Interessanterweise erhöhte sich die Bindung von Arf1^{GDP} an p23 nach Zugabe von BFA um den Faktor zwei (Contreras *et al.*, 2004). Atp24 wechselwirkt nicht nur mit Arf1, sondern auch mit Coatomerproteinen. Allerdings ist diese Interaktion abhängig von einer vorausgehenden Aktivierung von Arf1 durch GTP-Bindung (Contreras *et al.*, 2004). Wenn überhaupt, kann also nur die Bindung von MtArf1^{GDP} an BFA-

Kompartimente durch p23-Proteine begründet werden. Bei der Retention der Coatomerproteine an BFA-Kompartimenten müssen also andere Mechanismen beteiligt sein, als eine Bindung an p23-Rezeptoren.

Um den Golgi-Apparat herum gibt es eine Zone, die völlig frei von Ribosomen ist (Staehein & Moore, 1995). Aus dieser mikroskopischen Beobachtung konnte geschlossen werden, daß der Golgi in eine Art Matrix eingebettet sein muß. In der Tat konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die als eine Art Gerüst die Struktur der Zisternen unterstützen (Klumperman, 2000; Ward *et al.*, 2001). Diese, unter dem Sammelbegriff Golgin versammelten Proteine, spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Interaktionen mit dem Cytoskelett (Murshid & Presley, 2004) und im Prozeß der Fusion von Vesikeln (Barr & Short, 2003). Auch in Pflanzenzellen sind Golgi-Stapel in eine Matrix eingebettet. So können häufig kompakte Strukturen zwischen den trans-Zisternen beobachtet werden (Staehein *et al.*, 1990; Andreeva *et al.*, 1998b; Ritzenthaler *et al.*, 2002) (Abb. 5.2.).

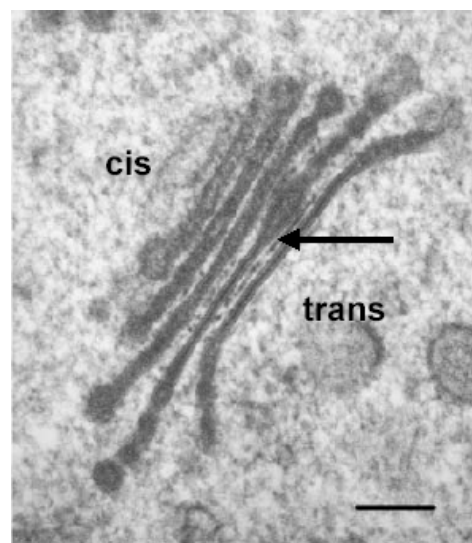


Abb. 5.2.: Matrixstruktur zwischen trans-Zisternen in einem Golgi-Stapel in Tabak BY2-Zellen. Abbildung entnommen aus Hawes (2005) und durch entsprechende Beschriftung modifiziert. Der Maßstab entspricht einem Abstand von 100 nm.

Matrixproteine pflanzlicher Golgi-Strukturen sind bisher so gut wie nicht untersucht (Hawes, 2005). Generell wäre aber denkbar, daß auch nach Behandlung mit Brefeldin A Elemente der Matrixstruktur zwischen trans-Zisternen intakt bleiben und entweder selbst mit Bestandteilen der Hülle von COPI-coated Vesikeln interagieren oder aber Interaktionen mit Cytoskelettelementen vermitteln. Handfeste Beweise für die These können allerdings nicht vorgebracht werden. In den Literaturdaten sind derartige Wechselwirkungen bisher nicht beschrieben.

5.5. Modell der Funktion von COPI-coated Vesikeln in Pflanzen.

Die mikroskopische Untersuchung von *M. truncatula* Wurzeln transformiert mit MtArf1::GFP, Mt ζ -COP1::GFP und Mt ζ -COP2::GFP führte zwar zu der Erkenntnis, daß die Proteine an Golgi-Stapeln lokalisiert sind, erbrachte aber keine Hinweise auf die Anwesenheit von COPI-coated Vesikeln. Erst nach Transformation von Wurzeln mit einer dominant aktiven Mutante des Regulatorproteins MtArf1, konnte ein Hintergrund an granulären Strukturen beobachtet werden, der als Ansammlung von COPI-coated Vesikeln im Cytosol gedeutet werden kann (5.3.1.). Auch bei *in situ* Lokalisierungen wurden in

Pflanzen stets nur sehr wenige COPI-coated Vesikel in der Peripherie von Golgi-Zisternen detektiert (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Die Tatsache, daß in Pflanzenzellen nur wenige COPI-coated Vesikel detektiert werden können, läßt sich durch verschiedene Möglichkeiten erklären, die sich nicht gegenseitig ausschließen müssen, sondern sich im Gegenteil ergänzen können:

1. Der Raum zwischen den Golgi-Stapeln und dem ER wird vermutlich sehr schnell von den Vesikeln überquert. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich pflanzliche Golgi-Stapel immer in enger räumlicher Nähe zum ER befinden und der Abstand zwischen den Organellen weniger als 1 µm beträgt (Dupree & Sherrier, 1998; Brandizzi *et al.*, 2002). Auch wenn der Transport zwischen beiden Kompartimenten unabhängig von Cytoskelettelementen ist (Brandizzi *et al.*, 2002), können die Vesikel die schmale Lücke wahrscheinlich schnell überbrücken, so daß nicht genügend Zeit für ihre *in vivo* Beobachtung verbleibt.

2. Einem schnellen „Uncoating“-Prozeß (Abfallen der Proteinhülle) von COPI-coated Vesikeln. In einer *in vitro* Studie an Liposomen konnte demonstriert werden, daß tierische Coatomeruntereinheiten nach ihrer Bindung für etwa 120 Sekunden auf der Oberfläche von Membranen verbleiben (Bigay *et al.*, 2003). Informationen über die Kinetik des Zerfalls der Proteinhülle *in vivo* aber fehlen. Die Halbwertszeit von 2 Minuten vorausgesetzt, sollte diese Zeitspanne eigentlich ausreichen, um COPI-coated Vesikel in transformierten *M. truncatula* Wurzeln detektieren zu können. Es ist aber fraglich, ob die *in vitro* ermittelten Daten auch auf die *in vivo* Situation, insbesondere in Pflanzenzellen, zutreffen. So könnte es durchaus sein, daß die Proteinuntereinheiten sehr schnell von den Vesikeln abfallen und diese dann mangels entsprechender Markierung nicht mehr durch Fluoreszenzanregung detektiert werden können.

3. Der Transport zwischen den Golgi-Stapeln und dem ER könnte über direkte Verbindungen zwischen den beiden Kompartimenten verlaufen. Brandizzi *et al.* (2002) konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß pflanzliche Golgi-Stapel teilweise mit dem ER durch feine tubuläre Strukturen verbunden sind. Es ist aber unklar, ob diese physiologischen Kontakte dauerhafter Natur sind oder nur vorübergehend ausgebildet werden. Aufgrund vergleichbarer Resultate postulierten Presley *et al.* (2002) daraufhin ein alternatives Modell für den Transport zwischen dem Golgi und dem ER. Nach dieser Theorie kommt es durch einen ständigen Zyklus zwischen Bindung und Verlust von COPI-Bestandteilen an der Golgi-Membran zur Ausbildung spezialisierter Transportdomänen, die in Richtung des ER auswachsen. Die Domänen reifen im weiteren Verlauf dann zu Fortsätzen der cis-Golgi-Stapel, die mit Material gefüllt sind, das für den retrograden Transport bestimmt ist. Dieses Modell schließt nicht zwangsläufig die Entstehung von COPI-coated Vesikeln aus, aber es läßt die Möglichkeit offen, daß der Transport zwischen Golgi-Stapeln und dem ER auch ohne Vesikel, nur über diese spezialisierten Ausformungen verlaufen kann.

4. Die Fusion von COPI-Vesikeln am ER könnte an spezialisierten Domänen erfolgen, die in Verbindung mit den Golgi-Stapeln stehen müssen. Für anterograde Transportprozesse aus dem ER in den Golgi-Apparat konnte gezeigt werden, daß sich spezifische ER-Domänen, sogenannte ER-Export-Sites (ERES), zusammen mit den Golgi-Stapeln bewegen (daSilva *et al.*, 2004). An den ERES schnüren sich kontinuierlich COPII-coated Vesikel ab, die sekretorisches Material zum Golgi-Apparat transportieren. Für die Fusion von COPI-coated Vesikeln kann daher das umgekehrte Szenario angenommen werden. So ist es denkbar, daß es auch ER-Import-Sites gibt, in denen Komponenten

zur Fusion von COPI-Vesikeln konzentriert sind, die den Golgi-Stapeln direkt gegenüberliegen und sich mit ihnen zusammen entlang des ER bewegen. Eventuell handelt es sich bei ER-Export-Sites und ER-Import-Sites sogar um dieselbe Struktur.

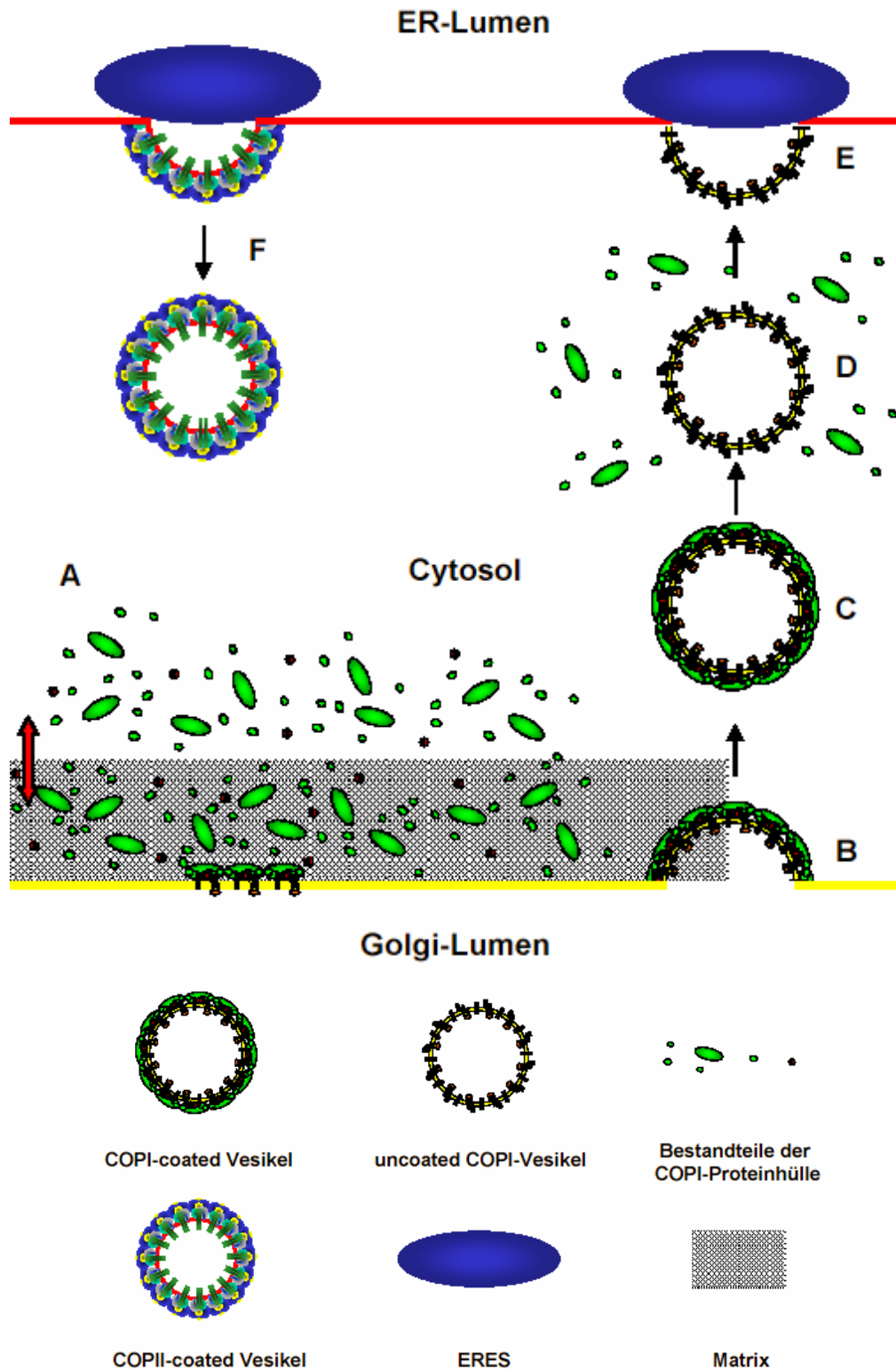


Abb. 5.3. Arbeitsmodell für COPI-coated Vesikel in Pflanzen. A. Bestandteile der COPI-Proteinhülle werden kontinuierlich zwischen dem Cytosol oder der Golgi-Matrix und der Golgi-Membran ausgetauscht. B. Abknospung eines COPI-coated Vesikels von der Golgi-Membran. C. Vollständiges COPI-coated Vesikel im Cytosol. D. Abfallen der äußeren Proteinhülle des Vesikels (Uncoating). E. Verschmelzen eines COPI-Vesikels mit der ER-Membran. F. Abschnüren eines COPII-coated Vesikels an ER-Export-Sites (ERES) von der ER-Membran.

Aber auch wenn der Transport von COPI-coated Vesikeln in Pflanzen im Detail anders organisiert sein mag als in tierischen Zellen oder Hefen, kann trotzdem davon ausgegangen werden, daß dabei vergleichbare Mechanismen zum Tragen kommen wie in den beiden zuvor genannten Systemen. Insbesondere die hohen Homologien und strukturellen Ähnlichkeiten von Komponenten der COPI-Vesikelhülle aus *M. truncatula* (4.3.3. und 4.4.) mit vergleichbaren Homologen aus Tieren und Hefen legen diesen Schluß nahe. Durch eine Kombination der in dieser Arbeit erzielten Daten mit allgemein anerkannten Fakten zum COPI-vermittelten Vesikeltransport aus dem tierischen System und Hefen wurde eine Arbeitshypothese für COPI-coated Vesikel in Pflanzen erstellt (Abb. 5.3.).

Der Transport von COPI-coated Vesikeln gliedert sich demnach in mehrere aufeinander folgende Schritte (Abb. 5.3.). A. Arf1 und Präkomplexe aus mehreren Untereinheiten von Coatomerproteinen (Lowe & Kreis, 1996) diffundieren frei zwischen dem Cytosol und der Golgi-Matrix (5.4.4.). Nach Aktivierung von Arf1 durch Bindung von GTP lagern sich die verschiedenen Bestandteile der späteren Coatomerhülle an der Golgi-Membran an. B. Durch die Anlagerung der Coatomerproteine wird die Golgi-Membran verformt (Lippincott-Schwartz & Liu, 2003) und es setzt ein Prozeß der Abschnürung eines COPI-coated Vesikels ein. C. Nach der Abknospung diffundiert das COPI-coated Vesikel in dem kleinen Spalt zwischen Golgi-Stapel und ER in Richtung des Endoplasmatischen Reticulums. D. In der Zwischenzeit kommt es zum Abfallen der äußeren Proteinhülle des Vesikels, wobei Arf1 und Coatomerproteine in das Cytosol entlassen werden (= Uncoating). E. Durch v-SNARE/t-SNARE-Interaktion wird die Verschmelzung mit der ER-Membran eingeleitet (Rothman, 1996; Shorter *et al.*, 2002). Dieser Prozeß findet eventuell an sogenannten ER-Export-Sites (ERES) statt, mit denen pflanzliche Golgi-Stapel in Kontakt stehen. F. An ER-Export Sites (daSilva *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005) werden COPII-coated Vesikel gebildet, die Material zum Golgi-Apparat transportieren (Uncoating und Verschmelzen mit der Golgi-Membran sind nicht skizziert).

5.6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die *in vivo* Lokalisierung von COPI-coated Vesikeln in Pflanzen. Durch eine Kombination aus zwei Photonen Mikroskopie und konfokaler Lasermikroskopie in Verbindung mit Inhibitorstudien und der Anwendung verschiedener Farbstoffe konnte erstmals demonstriert werden, daß Coatomerproteine *in vivo* an Golgi-Stapeln lokalisieren. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Expression einer dominant aktiven Mutante von MtArf1 zu einer Akkumulation von fluoreszenten Strukturen im Cytosol führt, die vermutlich COPI-coated Vesikel repräsentierten. Generell war die Untersuchung des pflanzlichen Vesikeltransports lange dadurch gehemmt, daß für die beteiligten Proteine keine Sequenzdaten zur Verfügung standen. Erst mit der Veröffentlichung des Genoms von *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) und später von Teilen des Genoms von Reis (Feng *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2002), bot sich die Möglichkeit, am Vesikeltransport beteiligte Proteine zu identifizieren, mit GFP zu fusionieren und im lebenden System zu untersuchen. Entsprechend gering ist bis dato die Anzahl an Publikationen auf diesem Gebiet. Über diese Arbeit hinaus liegen nur zwei weitere Veröffentlichungen zur *in vivo* Lokalisation von COPII-coated Vesikeln in Pflanzen vor (daSilva *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005).

Der Transport von COPI-coated Vesikeln ist zwar im tierischen System und Hefen seit längerem Gegenstand von Untersuchungen, bietet aber Anlaß zu zahlreichen Diskussionen. In dieser Arbeit

wurde zur Vereinfachung immer beschrieben, daß COPI-coated Vesikel den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER organisieren. Darüber hinaus aber spielen COPI-coated Vesikel vermutlich auch beim Transport zwischen einzelnen Golgi-Zisternen eine entscheidende Rolle. Es ist allerdings höchst umstritten in welcher Richtung dieses geschieht. So gibt es eine große Menge an Publikationen, die einen Transport von COPI-coated Vesikeln in anterograder Richtung postulieren (Melançon *et al.*, 1987; Malhotra *et al.*, 1989; Serafini *et al.*, 1991b; Stenbeck *et al.*, 1992; Ostermann *et al.*, 1993; Bednarek *et al.*, 1995; Kweon *et al.*, 2004), während dagegen eine genauso große Anzahl einen Transport in retrograder Richtung zum Dogma erklärt (Cosson & Letourneur, 1994; Griffiths *et al.*, 1994; Letourneur *et al.*, 1994; Sönnichsen *et al.*, 1996; Malsam *et al.*, 2005). So steht auch mehr als 100 Jahre nach der Entdeckung des Golgi-Apparates durch Camillo Golgi (1898) immer noch nicht fest, wie Transportprozesse am Golgi exakt verlaufen. Derzeit gibt es mindestens drei konkurrierende Modelle, die den Transport von Material durch den Golgi-Apparat erklären sollen:

1. „cisternal maturation model“

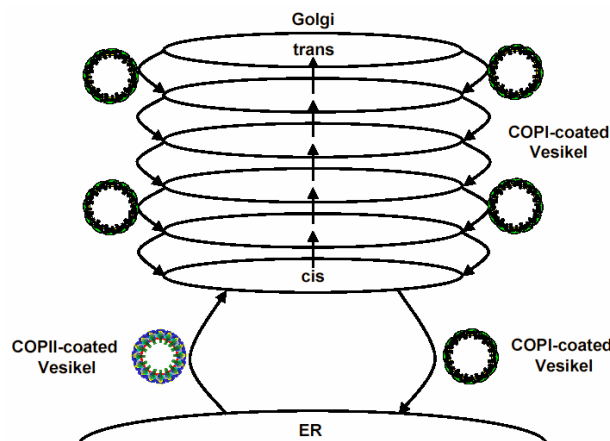


Abb. 5.4. Skizze zur Beschreibung des „cisternal maturation“ Modells.

Aufgrund elektronenmikroskopischer Daten wurde das „cisternal maturation“ Modell formuliert (Grassé, 1957). Nach diesem formen sich an der cis-Seite des Golgi ständig neue Zisternen aus neu ankommendem Material aus dem ER, entwickeln sich sukzessive von cis zu trans Zisternen fort und entlassen prozessiertes Material im trans-Golgi-Netzwerk. Die einzelnen Zisternen unterliegen in diesem Modell einem kontinuierlichen Reifungsprozeß. Enzyme, die zur Modifikation sekretorischen Materials benötigt werden, werden durch retrograden Transport von COPI-coated Vesikeln aus „alten“ Zisternen zurück in „junge“ Zisternen gebracht (Abb. 5.4.).

2. „vesicular transport model“

Das „vesicular transport“ Modell wurde ebenfalls aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen entwickelt, die in der Umgebung von Golgi-Zisternen zur Entdeckung von Vesikeln führten (Palade, 1959). Nach diesem Szenario sind die einzelnen Golgi-Zisternen statische Elemente, die im Gegensatz zum „cisternal maturation“ Modell keinerlei Reifung unterliegen. Statt dessen wird sekretorisches Material ausschließlich durch den anterograden Transport von COPI-coated Vesikeln zwischen den verschiedenen Zisternen ausgetauscht (Abb. 5.5.)

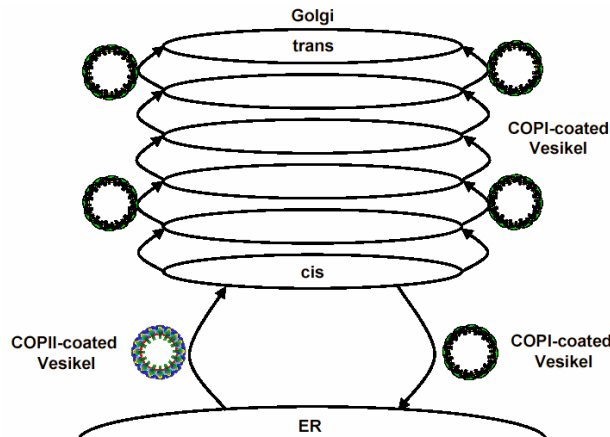


Abb. 5.5. Skizze zur Beschreibung des „vesicular transport“ Modells.

3. „dynamic steady-state model“

Das „dynamic steady-state“ Modell setzt eine physikalische Kontinuität vom ER bis hin zum trans-Golgi-Netzwerk voraus (Griffiths, 2000). Demnach sind das ER mit den cis-Zisternen und die einzelnen Golgi-Zisternen untereinander über physikalische Kontakte miteinander verbunden (Griffiths, 1996). Am Übergang zwischen dem ER und dem cis-Golgi, sowie zwischen den trans-Zisternen und dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN), soll es spezielle Verbindungen geben, an denen der Transport von sekretorischem Material entweder über die physikalischen Kontakte oder Vesikel erfolgen kann. COPII-Vesikel übernehmen dabei den anterograden, COPI-coated Vesikel den retrograden Transport. Diese speziellen Übergänge nehmen danach eine wichtige Rolle zur Qualitätskontrolle des Transportguts wahr. Physikalische Verbindungen des cis-Golgi mit dem ER (Brandizzi *et al.*, 2002) sowie zwischen den Golgi-Zisternen wurden vereinzelt auch für pflanzliche Golgi-Stapel beschrieben (Juniper *et al.*, 1982; Harris & Oparka, 1983; Lockhausen *et al.*, 1990).

Das Ziel dieser Arbeit bestand natürlich nicht in der Erstellung einer allgemein gültigen, vereinheitlichenden Hypothese für die Funktion des pflanzlichen Golgi-Apparats. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Konstrukte bieten aber exzellente Möglichkeiten zu weiterführenden Studien, mit denen einzelne Aspekte der Lokalisation von Golgi-Stapeln und des Transports von COPI-coated Vesikeln untersucht werden können. Besondere Beachtung sollte dabei eine Untersuchung der Lokalisation der verschiedenen Konstrukte in symbiontischen Geweben finden. *Medicago truncatula* bieten sich dazu als ideales Studienobjekt an. Die Pflanze kann sowohl mit stickstofffixierenden Bodenbakterien, als auch Mykorrhizapilzen symbiontische Beziehungen eingehen. Ein gemeinsames Merkmal der Knöllchen- und Mykorrhizasymbiose ist, daß die symbiontischen Strukturen in den Wirtszellen jeweils von einer ausgedehnten Membran pflanzlichen Ursprungs, der Peribakteroid- bzw. periarbuskulären Membran, umgeben sind (Verma & Hong, 1996; Strack *et al.*, 2003). Es wird besonders interessant sein, die Rolle des Golgi-Apparates und insbesondere von COPI-coated Vesikeln während der Kolonisierung der Pflanzenzellen zu untersuchen. Es ist bekannt, daß es bei der Ausbildung von Arbuskeln zu einer starken Vermehrung von Organellen und zu einem erhöhten Vesikeltransport im Cytoplasma der Pflanzenzelle kommt (Bonfante & Perotto, 1995). Dabei wird in hohem Umfang Membranmaterial zur periarbuskulären Membran transportiert (Alexander *et al.* 1989). Außerdem konnten im periarbuskulären Raum (Der Raum zwischen pflanzlicher Membran und Pilzmembran) charakteristische Proteine wie hydroxyprolinreiche Glykoproteine (HPGP) und

Arabinogalaktanproteine (AGP) gefunden werden, die ihren Ursprung im Golgi-Apparat haben müssen (van Buuren *et al.*, 1999). Eine wesentliche Beteiligung des Golgi-Apparats wird auch bei der Ausbildung des Infektionsschlauches und der Peribakteroidmembran angenommen (Robertson *et al.*, 1978; Roth & Stacey, 1989). Zur Lokalisation von Golgi-Stapeln in Zellen mit symbiontischen Strukturen würden sich „hairy root“ transformierte *M. truncatula* Wurzeln als Studienobjekte bestens eignen (Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

Für weitergehende Untersuchungen des Transports von COPI-coated Vesikeln hingegen wäre die Erstellung von stabil transgenen *Medicago truncatula* Pflanzen wünschenswert. Stabil transgene Pflanzen böten optimale Voraussetzungen zur Untersuchung der *in vivo* Lokalisation der Bestandteile von COPI-coated Vesikeln in allen Geweben. Damit ließe sich insbesondere der Frage nachgehen, ob sich die Lokalisation der beiden Isoformen Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 unter spezifischen Bedingungen oder verschiedenen Geweben unterscheidet. Zur Überprüfung der Richtung des Transports von COPI-coated Vesikeln müßten Pflanzen doppelt transformiert werden. Neben eines GFP-markierten Bestandteils der Proteinhülle der Vesikel müßten sie noch zusätzlich ein zweites, andersfarbig markiertes Protein exprimieren, daß über COPI-coated Vesikel transportiert wird (oder werden könnte). Hierzu bieten sich Proteine an, die

1. zwischen dem ER-Golgi zirkulieren, wie das HDEL-Rezeptor Homolog ERD2 (Denecke *et al.*, 1992; Napier *et al.*, 1992)
2. in anterograder Richtung zwischen Golgi-Zisternen transportiert werden, wie α -Amylase oder Phytpepsin (Pimpl *et al.*, 2003)
3. oder in retrograder Richtung zwischen Golgi-Zisternen transportiert werden, wie α -1,2-Mannosidase (Nebenführ *et al.*, 1999).

Für die stabile Transformation von *M. truncatula* muß allerdings bedacht werden, daß ein ausreichend großes Zeitfenster zur Verfügung stehen muß. Auch wenn schon das Gegenteil behauptet wurde (Trieu *et al.*, 2000), ist die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *M. truncatula* im Vergleich zu *A. thaliana* aber nicht durch einfache Methoden wie Vakuuminfiltration (Bechthold & Pelletier, 1998) oder „floral dip“ (Clough & Bent, 1998) möglich. Stabil transgene *M. truncatula* Pflanzen können nur über die arbeits- und zeitintensive Methode der somatischen Embryogenese erstellt werden (Hohnjec *et al.*, 2003). Dieses war der Hauptgrund dafür, im Rahmen dieser Arbeit Pflanzen ausschließlich nach der „hairy root“ Methode transient zu transformieren und zu untersuchen.

Die Aufklärung der exakten Lokalisation der verschiedenen Konstrukte kann nur durch elektronenmikroskopische Untersuchungen in Verbindung mit *in situ* Nachweisen geführt werden. Hierzu sollte transgenes Gewebe durch moderne Methoden zur Strukturierung wie Hochdruck-Kryofixierung (Walther, 2003) mit nachfolgender Gefriersubstitution (Ridge, 1988; Hippe-Sanwald, 1993) behandelt werden. Durch die Verwendung von anti-GFP-Antikörpern oder eines im Rahmen dieser Arbeit erstellten, peptidspezifischen Antikörpers gegen Mt ζ -COP1 könnte anschließend ein *in situ* Nachweis von Komponenten des COPI-Vesikeltransports in transformierten *M. truncatula* Wurzeln erfolgen und deren exakte Lokalisation ermittelt werden. Gleichzeitig könnte mit dieser Methode generell der Frage nachgegangen werden, ob sich Golgi-Stapel in verschiedenen pflanzlichen Geweben oder verschiedenen Pflanzen in ihrer Morphologie unterscheiden.

6. Literatur

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D.** (1995) Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, VCH Verlag, Weinheim
- Alexander T., Toth R., Meier R. and Weber H.C.** (1989) Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Can. J. Bot.* **67**, 2505-2513
- Altan-Bonnet N., Sougrat R. and Lippincott-Schwartz J.** (2004) Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 364-372
- Altschul S.F., Gish W., Myers E.W. and Lipman D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **108**, 259-264
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Andag U. and Schmitt H.D.** (2003) Dsl1p, an essential component of the Golgi-endoplasmic reticulum retrieval in yeast, uses the same sequence motif to interact with different subunits of the COPI vesicle coat. *J. Biol. Chem.* **278**, 51722-51734
- Andreeva A.V., Kutuzov A., Evans D.E. and Hawes C.** (1998) Proteins involved in membrane transport between the ER and the Golgi apparatus: 21 putative plant homologues revealed by dbEST searching. *Cell Biol. Int.* **22** (2), 145-160
- Andreeva A.V., Kutuzov M.A., Evans D.E. and Hawes C.R.** (1998b) The structure and function of the Golgi apparatus: a hundred years of questions. *J. Exp. Bot.* **49**, 1281-1291
- Antony B., Béraud-Dufour S., Chardin P. and Chabre M.** (1997) N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675-4684
- Antony B. and Schekman R.** (2001) ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 438-443
- Antony B., Madden D., Hamamoto S., Orci L. and Schekman R.** (2001) Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat. Cell Biol.* **3**, 531-537
- Antony B., Gounon P., Schekman R. and Orci L.** (2003) Self-assembly of minimal COPII cages. *EMBO Reports* **4**, 419-424
- Aoe T., Lee A.J., van Donselaar E., Peters P.J. and Hsu V.W.** (1998) Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(4), 1624-1629.
- Aoe T., Huber I., Vasudevan C., Watkins S.C., Romero G., Cassel D. and Hsu V.W.** (1999) The KDEL receptor regulates a GTPase-activity protein for ADP-ribosylation factor 1 by interaction with its non-catalytic domain. *J. Cell Biol.* **274**, 20545-20549
- Aridor M., Weissman J., Bannykh S., Nuoffer C. and Balch W.E.** (1998) Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J. Cell Biol.* **141**, 61-70
- Aridor M., Fish K.N., Bannykh S., Weissman J., Roberts T.H., Lippincott-Schwartz J. and Balch W.E.** (2001) The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J. Cell Biol.* **152**, 213-229
- Baggett J.J. and Wendland B.** (2001) Clathrin function in yeast endocytosis. *Traffic* **2**(5), 297-302
- Baker D., Hicke L., Rexach M., Schleyer M. and Schekman R.** (1988) Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* **54**, 335-344
- Baker E.K., Colley N.J. and Zucker C.S.** (1994) The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex *in vivo* with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* **13**, 4886-4895
-

- Baker A., Kaplan C.P. and Pool M.R.** (1996) Protein targeting and translocation; a comparative survey. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **71**(4), 637-702
- Baldwin T.C., Handford M.G., Yuseff M.I., Oorellana A. and Dupree P.** (2001) Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2283-2295
- Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C. and Barker D.G.** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**(6), 695-700
- Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Flament P., Gallusci P. Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Dénarié J. and Huguet T.** (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **8**, 40-49
- Barlowe C., d'Enfert C. and 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. and Schekman R.** (1993) SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**, 347-349
- Barlowe C., Orci L., Yeung T., Hosobuchi M., Hamamoto S., Salama N., Rexach M.F., Ravazzola M., Amherdt M. and Schekman R.** (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907
- Barlowe C.** (1995) COPII: a membrane coat that forms endoplasmic reticulum-derived vesicles. *FEBS letters* **369**, 93-96
- Barlowe C.** (1998) COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**, 67-76
- Barlowe C.** (2000) Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**, 371-377
- Barlowe C.** (2002) COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 417-422
- Barlowe C.** (2003) Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* **13**, 295-300
- Bar-Peled M., Bassham D.C. and Raikhel N.V.** (1996) Transport of proteins in eukaryotic cells: more questions ahead. *Plant Mol. Biol.* **32**, 223-249
- Bar-Peled M. and Raikhel N.V.** (1997) Characterization of AtSec12 and AtSar1, proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol.* **114**, 315-324
- Barr F.A. and Short B.** (2003) Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 405-413
- Bechtold N. and Pelletier G.** (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.* **82**, 259-266
- Bednarek S.Y., Ravazzola M., Hosobuchi M., Amherdt M., Perrelet A., Schekman R. and Orci L.** (1995) COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* **83**, 1183-1196
- Belden W.J. and Barlowe C.** (1996) Erv 25p, a component of COP II-coated vesicles, forms a complex with Emp24 that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.* **71**, 26939-26946
- Belden W.J. and Barlowe C.** (2001) Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* **294**, 1528-1531
- Benghezal M., Wasteneys G.O. and Jones D.A.** (2000) The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. (2000) *Plant Cell* **12**, 1179-1201
- Bhamidipati A., Lewis S.A. and Cowan N.J.** (2000) ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J. Cell Biol.* **149**, 1087-1096
-

- Bi X., Corpina R.A. and Goldberg J.** (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* **419**, 271-277
- Black S.M., Harikrishna J.A., Szklarz G.D. and Miller W.** (1994) The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{sc}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7247-7251
- Bigay J., Gounon P., Robineau S. and Antony B.** (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563-566
- Bock J.B., Matern H.T., Peden A.A. and Scheller R.H.** (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839-841
- Boehm M., Aguilar R.C. and Bonifacino J.S.** (2001) Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J.* **20**, 6265-6276
- Boehm M. and Bonifacino J.S.** (2002) Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene* **286(2)**, 175-186
- Boevink P., Oparka K., Santa-Cruz S. Martin B., Betteridge A. and Hawes C.** (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* **15**, 441-447
- Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D. and Satiat-Jeuemaitre B.** (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.* **214**, 159-173
- Bolte S., Brown S. and Satiat-Jeuemaitre B.** (2004b) The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rab_{mc} is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. *J. Cell Sci.* **117**, 943-954
- Bonfante P. and Perotto S.** (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* **130**, 3-21
- Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C. and Barker D.G.** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14(6)**, 695-700
- Bowman A.L., Zhang C.-J., Zhu X. and Kahn R.A.** (2000) A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1241-1255
- Bowman A.L.** (2001) GGA proteins: new players in the sorting game. *J. Cell Sci.* **114**, 3413-3418
- Boston R.S., Viitanen P.V. and Vierling E.** (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant. Mol. Biol.* **32(1-2)**, 191-222
- Bourne H.R., Sanders D.A. and McCormick F.** (1991) The GTPase superfamily conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127
- Brandizzi F., Snapp E.L., Roberts A.G., Lippincott-Schwartz J. and Hawes C.** (2002) Membrane transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: Evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* **14**, 1293-1309
- Brandt D.R. and Ross E.M.** (1985) GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. *J. Biol. Chem.* **260**, 266-272
- Brandt D.R. and Ross E.M.** (1986) Catecholamine-stimulated GTPase cycle. Multiple sites of regulation by beta-adrenergic receptor and Mg²⁺ studied in reconstituted receptor-Gs vesicles. *J. Biol. Chem.* **261**, 1656-1664
- Bremser M., Nickel W., Schweikert M., Ravazzola M., Amherdt M., Hughes C.A., Söllner T.H., Rothman J.E. and Wieland F.T.** (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* **96**, 495-506
- Brett C. and Waldron K.** (1996) Physiology and biochemistry of plant cells walls. 2nd edn., *Chapman and Hall*, London
- Brown H.A., Gutowski S., Moornaw C.R., Slaughter C. and Sternweis P.C.** (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144
-

- Browse J. and Sommerville C.** (1991) Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 467-506
- Bullock W.C., Fernandez J.M. and Short J.M.** (1987) A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection, *BioTechniques* **8**, 376-379
- Cao X. and Barlowe C.** (2000) Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J. Cell Biol.* **149(1)**, 55-65
- Casse F., Boucher C., Juliot S. and Denarie J.** (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose-gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 229-242
- Cavenagh M.M., Whitney J.A., Carrol K., Zhang C., Bomann A.L., Rosenwald A.G., Mellman T. and Kahn R.A.** (1996) Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 21767-21774
- Chabaud M., de Carvalho-Niebel F. and Barker D.G.** (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep.* **22(1)**, 46-51
- Chappel J.** (1995) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 521-547
- Chardin P., Paris S., Antony B., Robineau S., Beraud-Dufour C.L., Charbe M. and Charbe A.** (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7 and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-484
- Chavrier P. and Goud B.** (1999) The role of ARF and rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 466-475
- Chevrier V., Komesli S., Schmit A.-C., Vantard M., Lambert, A.-M. and Job D.** (1992) A monoclonal antibody, raised against mammalian centrosomes and screened by recognition of plant microtubule organizing centers, identifies a pericentriolar component in different cell types. *J. Cell. Sci.* **101**, 823-835
- Chittenden K., Gowda K., Black S.D. and Zwieb C.** (1997) Interaction of rice and human SRP19 polypeptides with signal recognition particle RNA. *Plant Mol. Biol.* **34(3)**, 507-515
- Clough S.J. and Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16(6)**, 735-743
- Cole N.B., Smith C.L., Sciaky N., Terasaki M., Edidin M. and Lippincott-Schwartz J.** (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* **273**, 797-801
- Combet C., Jambon M., Deléage G. and Geourjon C.** (2002) Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* **18**, 213-214
- Contreras I., Ortiz-Zapater E., Castilho L.M. and Aniento F.** (2000) Characterization of Cop I coat proteins in plant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273(1)**, 176-82
- Contreras I., Ortiz-Zapater E. and Aniento F.** (2004) Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant Arf1 and coatomer. *Plant J.* **38**, 685-698
- Cook, D.** (1999): *Medicago truncatula* -a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 301-304
- Cosson P. and Letourneur F.** (1994) Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-1631
- Cosson P., Demolliere C., Hennecke S., Duden R. and Letourneur F.** (1996) δ - and ζ -COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J.* **15(8)**, 1792-1798
- Cosson P., Lefkir Y., Démollière C. and Letourneur F.** (1998) New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J.* **17**, 6863-6870
- Costantino P., Capone I., Cardarelli M., De Paolis A., Mauro M.L. and Trovato M.** (1994) Bacterial plant oncogenes: the *rol* genes' saga. *Genetica* **94**, 203-211
- Couchy I., Bolte S., Crosnier M.T., Brown S. and Satiat-Jeuneumaitre B.** (2003) Identification and localization of a β -COP-like protein involved in the morphodynamics of the plant Golgi apparatus. *J. Exp. Bot.* **54**, 2053-2063
-

- Craig S. and Staehelin L.A.** (1988) High pressure freezing of intact plant tissues. Evaluation and characterization of novel features of the endoplasmic reticulum and associated membrane systems. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 80-93
- Crofts A.J., Washida H., Okita T.W., Ogawa M., Kumamaru T. and Satoh H.** (2004) Targeting of proteins to endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. The importance of RNA localization. *Plant Physiol.* **136**(3), 3414-3419.
- Dansako H., Ishimaru F., Takai Y., Tornoda J., Nakase K., Fuji K., Ogama Y., Kozuka T., Sezaki N., Honda K. and Harada M.** (2001) Molecular characterization of the ERGIC-53 gene in two Japanese patients with combined factor V-factor VIII deficiency. *Ann. Hematol.* **80**, 292-294
- Dascher C. and Balch W.E.** (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **269**, 1437-1448
- daSilva L.L.P., Snapp E.L., Denecke J., Lippincott-Schwartz J., Hawes C.R. and Brandizzi F.** (2004) ER export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell* **16**, 1753-1771
- Davies C.** (1994) Cloning and characterization of a tomato GTPase-like gene to yeast and *Arabidopsis* genes involved in vesicular transport. *Plant Mol. Biol.* **24**, 525-531
- Delseny M., Cooke R., Raynal M. and Grellet F.** (1997) The *Arabidopsis thaliana* cDNA sequencing projects. *FEBS Lett.* **403**(3), 221-224
- Denecke J., De Rycke R. and Botterman J.** (1992) Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* **11**, 2345-2355
- Denecke J.** (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.-I., Nakano A. and Schekman R.** (1991) Structural and functional dissection of membrane glycoprotein required for vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5727-5734
- d'Enfert C., Gensse N. and Gaillardin C.** (1992). Fission yeast and a plant have functional homologs of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. *EMBO J.* **11**, 4205-4211
- Denk W., Strickler J.H., Webb W.W.** (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73-76
- Denzel A., Otto F., Girod A., Pepperkok R., Watson R., Rosewell I., Bergerson J., Solari R.C. and Owen M.J.** (2000) The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr. Biol.* **10**, 55-58
- Doblin M.S., Kurek I., Jacob-Wilk D. and Delmer D.P.** (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**(12), 1407-1420.
- Dolinski K. and Heitman J.** (1997) Peptidyl-prolyl isomerases. Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts. Sambrook J. and Tooze S, eds. *Oxford University Press*, London, 359-369
- Dominguez M., Dejgaard K., Füllekrug J., Dahan S., Fazel A., Paccaud J.P., Thomas D.Y., Bergeron J.J. and Nilsson T.** (1998) gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COPI and II coatomer. *J. Cell Biol.* **140**, 751-765
- Domozych D.S.** (1991) The Golgi apparatus and membrane trafficking in green algae. *Int. Rev. Cytol.* **131**, 213-253
- Donaldson J.G., Kahn R.A., Lippincott-Schwartz J. and Klausner R.D.** (1991) Binding of ARF and β -COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein. *Science* **254**, 1197-1199
- Donaldson J.G., Finazzi D. and Klausner R.D.** (1992a) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-352
- Donaldson J.G., Cassel D., Kahn R.A. and Klausner R.D.** (1992b) ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding the coatomer protein β -COP to Golgi membranes. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6408-6412
-

- Donaldson J.G. & Jackson C.L. (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 475-482
- Downward J., Riehl R., Wu L. and Weinberg R.A. (1990) Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(15)**, 5998-6002
- Duden R., Griffiths G., Frank R., Argos P. and Kreis T.E. (1991) β -COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to β -adaptin. *Cell* **64(3)**, 649-665
- Duden R., Kajikawa L., Wuestehube L. and Schekman R. (1998) ϵ -COP is a structural component of coatamer that functions to stabilize α -COP. *EMBO J.* **17**, 985-995
- Duden R. (2003) ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol. Membr. Biol.* **20(3)**, 197-207
- Dupree P. and Sherrier D.J. (1998) The plant Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**, 259-270
- Eakle K.A., Berstein M. and Emr S.D. (1988) Characterization of a component of the yeast secretion machinery: Identification of the SEC18 gene product. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4098-4109
- Eccleston J.F., Moore K.J., Morgan L., Skinner R.H. and Lowe P.N. (1993) Kinetics of interaction between normal and proline 12 Ras and the GTPase-activating proteins, p120-GAP and neurofibromin. The significance of the intrinsic GTPase rate in determining the transforming ability of ras. *J. Biol. Chem.* **268(36)**, 27012-27019.
- Emery G., Rojo J. and Gruenberg J. (1999) The p24 family of transmembrane proteins at the interface between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Protoplasma* **207**, 24-30
- Emery G., Rojo M. and Gruenberg J. (2000) Coupled transport of p24 family members. *J. Cell Sci.* **113**, 2507-2516
- Eugster A., Frigerio G., Dale M. and Duden R. (2004) The α - and β -COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol. Cell.* **15(3)**, 1011-23
- Evans E.A., Gilmore R. and Blobel G. (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83(3)**, 581-585
- Faulstich D., Auerbach S., Orci L., Ravazzola M., Wegehangel S., Lottspeich F., Stenbeck G., Harter C., Wieland F. T. and Tschochner H. (1996) Architecture of coatamer: molecular characterization of δ -COP and protein interactions within the complex *J. Cell Biol.* **135**, 53-61
- Feng Q., Zhang Y., Hao P., Wang S., Fu G., Huang Y., Li Y., Zhu J., Liu Y., Hu X., Jia P., Zhang Y., Zhao Q., Ying K., Yu S., Tang Y., Weng Q., Zhang L., Lu Y., Mu J., Lu Y., Zhang L.S., Yu Z., Fan D., Liu X., Lu T., Li C., Wu Y., Sun T., Lei H., Li T., Hu H., Guan J., Wu M., Zhang R., Zhou B., Chen Z., Chen L., Jin Z., Wang R., Yin H., Cai Z., Ren S., Lv G., Gu W., Zhu G., Tu Y., Jia J., Zhang Y., Chen J., Kang H., Chen X., Shao C., Sun Y., Hu Q., Zhang X., Zhang W., Wang L., Ding C., Sheng H., Gu J., Chen S., Ni L., Zhu F., Chen W., Lan L., Lai Y., Cheng Z., Gu M., Jiang J., Li J., Hong G., Xue Y. and Han B. (2002) Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature* **420**, 316-320
- Feng Y., Yu S., Lasell T.K., Jadhav A.P., Macia E., Chardin P., Melancon P., Roth M., Mitchison T. and Kirchhausen T. (2003) Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6469-6474
- Fernandez D.E. and Staehelin L.A. (1987) Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells? *Plant Physiol.* **85**, 487-496
- Florio V.A. and Sternweis P.C. (1985) Reconstitution of resolved muscarinic cholinergic receptors with purified GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **260**, 3477-3483
- Fiedler K., Veit M., Stamnes M.A. and Rothman J.E. (1996) Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396-1399
- Foucher F. and Kondorosi E. (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol. Biol.* **43(5-6)**, 773-86
- Franco M., Chardin P., Chabre M. and Paris S. (1996) Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg^{2+} -levels. *J. Biol. Chem.* **270**, 1337-1341
-

- Franco M., Boretto J., Robineau S., Monier S., Goud B., Chardin P. and Chavrier P.** (1998) ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl. Acad. Sci USA* **95**, 9926-9931
- Füllekrug J., Sukanuma T., Tang B.L., Hong W., Storrie B. and Nilsson T.** (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24 γ 3): complex formation with other p24 family members. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1939-1955
- Gage D.J.** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68(2)**, 280-300
- Gallagher K.L. and Benfey P.N.** (2005) Not just another hole in the wall: understanding intercellular protein trafficking. *Genes Dev.* **19(2)**, 189-195.
- Galili G., Sengupta-Gopalan C. and Cerinoti 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
- Gange A.C., Bower E., Stagg P.G., Aplin D.M., Gillam A.E. and Bracken M.** (1999) A comparison of visualization techniques for recording arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytol.* **142**, 123-132
- Garcia-Herdugo G., Gonzales-Reyes J.A., Garcia-Navaro F. and Navas P.** (1988) Growth kinetics of the Golgi apparatus during the cell cycle in onion root meristems. *Planta* **175**, 305-312
- Gardiner M.C. and Chrispeels M.J.** (1975) Involvement of the Golgi apparatus in the synthesis and secretion of hydroxyproline-rich cell wall glycoproteins. *Plant Physiol.* **55**, 536-541
- Gaynor E.C., Graham T.R. and Emr S.D.** (1998) COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim. Biophys. Acta.* **1404(1-2)**, 33-51
- Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A and Jurgens G.** (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230
- Georgatos S.D., Meier J. and Simos G.** (1994) Lamins and lamin-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 347-353
- Ghosh P. and Kornfeld S.** (2004) The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur. J. Cell Biol.* **83(6)**, 257-262
- Gibbs J.B., Sigal I.S., Poe V. and Scolnick E.M.** (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5704-5708
- Gibeaut D.M. and Carpita N.C.** (1993) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* **8(12)**, 904-915
- Gish W. and States D.J.** (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3(3)**, 266-272
- Glaser E., Sjolting S., Tanudji M. and Whelan J.** (1998) Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol Biol.* **38**, 311-338
- Glick B.R. and Thompson J.E.** (1993) *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- Göppert-Mayer M.** (1929). Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt. *Naturwissenschaften* **17**, 932.
- Goldberg J.** (1998) Structural basis for activation of ARF GTPases: Mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-Myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-248
- Goldberg J.** (1999) Structural and functional analysis of the ARF1 ARF/GAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**, 893-902
- Goldberg J.** (2000) Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell* **100**, 671-679
- Golgi C.** (1898) Sur la structure de cellules nerveuses. *Arch. Ital. Biol.* **30**, 60-71
- Gommel D., Orci L., Emig E.M., Hannah M.J., Ravazzola M., Nickel W., Helms J.B., Wieland F.T. and 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
- Gommel D.U., Memon A.R., Heiss A., Lottspeich F., Pfannstiel J., Lechner J., Reinhard C., Helms B.J., Nickel W. and Wieland F.T.** (2001) Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J.* **20**, 6751-6760
- Gormord V. and Faye L.** (1996) Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 165-181
- Grabski S., de Feijter A.W. and Schindler M.** (1993) Endoplasmic reticulum forms a dynamic continuum for lipid diffusion between contiguous soybean root cells. *Plant Cell* **5**, 25-38
- Grassé P.P.** (1957) Ultrastructure, polarité et reproduction de l'appareil de Golgi. *C. R. Acad. Sci. Paris* **245**, 1278-1281
- Griffiths G., Ericsson M., Krijnse-Locker J., Nilsson T., Goud B., Soeling H.D., Tang B.L., Wong S.H. and Hong W.** (1994) Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor on the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **127**, 1557-1574
- Griffiths G.** (1996) On vesicles and membrane compartments. *Protoplasma* **195**, 37-58
- Griffiths G.** (2000) Gut thoughts on the Golgi complex. *Traffic* **1(9)**, 738-745
- Hall A. and Zerial M.** (1995) Overview of the Ras superfamily of small GTPases – General introduction. *Guidebook to the small GTPases*. Edited by Zerial M. and Huber L.A. Sambrook & Tooze. Oxford University Press.
- Hamman B.D., Chen J.C., Johnson E.E. and Johnson A.R.** (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
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166(4)**, 557-80
- Harris N. and Oparka K.J.** (1983) Connections between dictyosomes ER and GERL in cotyledons of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Protoplasma* **114**, 93-102
- Harter C., Pavel J., Coccia F., Draken E., Wegehingel S., Tschochner H. and Wieland F.** (1996) Nonclathrin coat protein γ , 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. and Wieland F.T.** (1998) A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11649-11654
- Hartl F.U.** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579
- Hartmann E., Sommer T., Prehn S., Gorlich D., Jentsch S. and Rapoport T.A.** (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**, 654-657
- Haselhoff J., Siemering D.R., Prasher D.C. and Hodge S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2122-2127
- Haselhoff J.** (1999) GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol.* **58**, 139-151
- Hawes C., Brandizzi F. and Andreeva A.V.** (2000) Endomembranes and vesicle trafficking. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 454-461
- Hawes C. and Satiat-Jeunemaitre B.** (2001) Trekking along the cytoskeleton. *Plant Physiol.* **125**, 119-122
- Hawes C.** (2005) Cell biology of the plant Golgi apparatus. *New Phytol.* **165**, 29-44
- Heinlein M. and Epel B.L.** (2004) Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int. Rev. Cytol.* **235**, 93-164.
- Helenius A., Trombetta E.S., Herbert D.N. and Simons J.F.** (1997). Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* **7**, 193-200
-

- Helenius A. and Aebi M.** (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369
- Hellriegel H.** (1887) Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote? *Landw. Versuchsstation Bernburg* **33**, 464ff
- Hellriegel H. und Wilfarth H.** (1888) Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen, *Buchdruckerei der Post*, Berlin
- Helms J.B. and Rothman J.E.** (1992) Inhibition by Brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of a guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-354
- Hendrick J.P. and Hartl F.U.** (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 349-384
- Henikoff S. and Henikoff J.G.** (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89(22)**, 10915-10919.
- Hepler P.K.** (1982) Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* **111**, 121-133
- Hepler P.K., Palevitz B.A., Lancelle S.A., McCauley M.M. and Lichtscheidl I.** (1990) Cortical endoplasmic reticulum in plants. *J. Cell Sci.* **96**, 355-373
- Herman E.M., Li X., Su R.T., Larsen P., Hsu H. and Sza H.** (1994) Vacuolar-type H⁺-ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells. *Plant Physiol.* **106**, 1313-1324
- Herman E. and Schmidt M.** (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol.* **136(3)**, 3440-3446.
- Herrmann C., Wray J., Travers F. and Barman T.** (1992) Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases: an example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* **31**, 12227-12232
- Herzberg N.H., Middelkoop E., Adorf M., Dekker H.L., Van Galen M.J., Van den Berg M., Bolhuis P.A. and Van den Bogert C.** (1993) Mitochondria in cultured human muscle cells depleted of mitochondrial DNA. *Eur. J. Cell Biol.* **61(2)**, 400-408
- Hicke L. and Schekman R.** (1989) Yeast Sec23p acts in the cytoplasm to promote protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J.* **8**, 1677-1684
- Hicke L., Yoshiga T. and Schekman R.** (1992) Sec23p and a novel 105 kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the ER. *Mol. Biol. Cell* **3**, 667-676
- Hilling B. and Amelunxen F.** (1985) On the development of the vacuole II. Further evidence for endoplasmic reticulum origin. *Eur. J. Cell Biol.* **38**, 195-200
- Hippe-Sanwald S.** (1993) Impact of freeze substitution on biological electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **24(5)**, 400-422
- Hirose S. & Komamine A.** (1989) Changes in the ultrastructure of the Golgi apparatus during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *New Phytol.* **111**, 599-605
- Hirst J. and Robinson M.S.** (1998) Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**, 173-193
- Hochholdinger F., Woll K., Sauer M. and Dembinsky D.** (2004) Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Ann. Bot. (Lond).* **93(4)**, 359-368
- Hohnjec N., Perlick A.M., Pühler A. and Küster H.** (2003) The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16(10)**, 903-915
- Hörtensteiner S., Martinoia E. and Amrhein N.** (1992) Reappearance of hydrolytic activities and tonoplast proteins in the regenerated vacuole of evacuated protoplasts. *Planta* **187**, 113-121
- Hoffman G.R., Rahl P.B., Collins R.N. and Cerione R.A.** (2003) Conserved structural motifs in intracellular trafficking pathways: structure of the γ COP appendage domain. *Mol. Cell* **12(3)**, 615-625
- Holstein S.E.** (2002) Clathrin and plant endocytosis. *Traffic* **3(9)**, 614-620
-

- Houle M.G., Kahn R.A., Naccache P.H. and Bourgoïn S.** (1995) ADP-ribosylation factor translocation correlates with potentiation of GTP γ S-stimulated phospholipase D activity in membrane fractions of HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 22975-22800
- Hrazdina G. and Jensen R.A.** (1992) Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 241-267
- Huang A.H.C.** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**, 1055-1061
- Huang M., Weissmann J.T., Béraud-Dufour S., Luan P., Wang C., Chen W., Aridor M., Wilson I.A. and Balch W.E.** (2001) Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH₂ terminus in ER export. *J. Cell Biol.* **155**(6), 937-948
- Huppa J.B. and Ploegh H.L.** (1998) The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* **92**, 145-148
- liama M. and Kono Y.** (1992) Development of Golgi apparatus in root cap cells of maize (*Zea mays* L.) is affected by compacted soil. *Annals of botany* **70**, 207-212
- Iodice L., Sarnatato S. and Bonatti S.** (2001) The carboxyl-terminal valine is required for transport of glycoprotein CD8 alpha from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment. *J. Biol. Chem.* **276**, 28920-28926
- Jackson C.L. & Casanova J.E.** (2000) Turning on Arf: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors, *Trends Cell Biol.* **10**, 60-67
- Jackson-Constan D., Akita M. and Keegstra K.** (2001) Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta.* **1541**, 102-113
- Jedd G. and Chua N.-H.** (2002) Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals Acto-Myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant Cell Physiol.* **43**(3), 384-292
- Jin J.B., Kim Y.A., Kim S.J., Lee S.H., Kim D.H., Cheong G.-W. and Hwang I.** (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1511-1525
- Juniper B., Hawes C. and Horne J.C.** (1982) The relationship between dictyosomes and the forms of endoplasmic reticulum in plant cells with different export programs. *Bot. Gaz.* **143**, 135-145
- Jürgens G.** (2004) Membrane trafficking in plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 481-504
- Kachar B and Reese T.E.** (1988) The mechanism of cytoplasmic streaming in characean algal cells: Sliding of endoplasmic reticulum along actin filaments. *J. Cell Biol.* **106**, 1545-1552
- Kahn A.** (1995) The Arf subfamily. *Guidebook to the small GTPases*. Edited by Zerial M. and Huber L.A. Sambrook & Tooze. Oxford University Press.
- Kalies K.U. Gorlich D. and Rapoport T.A.** (1994) Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J. Cell Biol.* **126**, 925-934
- Karandashov V. and Bucher M.** (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* **10**, 22-29
- Kohno T. and Shimmen T.** (1988) Accelerated sliding of pollen tube organelles along *Characeae* actin bundles regulated by Ca²⁺. *J. Cell Biol.* **106**, 1539-1543
- Klausner R.D., Donaldson J.G. and Lippincott-Schwartz J.** (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* **116**, 1071-1080
- Klumperman J.** (2000) The growing Golgi: in search of its independence. *Nat. Cell Biol.* **2**, E1-E2
- Kreis T.E., Lowe M. and Pepperkok R.** (1995) COPs regulating membrane traffic. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* **11**, 677-706
- Krishnan H.B., Franceschi V.R. and Okita T.W.** (1986) Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein body formation in rice seeds. *Planta* **169**, 471-480
-

- Ktistakis N.T., Brown H.A., Waters M.G., Sternweis P.C. and 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. and Schekman R.** (1998) COPII-cargo interactions direct protein sorting into the ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**, 187-190
- Kuge O., Dascher C., Orci L., Rowe T. Amherdt M., Plutner H., Ravazzola M., Tanigawa G., Rothman J.E. and Balch W.E.** (1994) Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J. Cell Biol.* **125**, 51-65
- Kurek I., Herman E., Erel N., Blecher O., Devos K. and Breiman A.** (1999) A novel heat shock induced wheat FKBP-peptidyl prolylcis-trans isomerase: developmental and heat induced expression. *Plant. Physiol.* **119**, 693-703
- Kutsuna N., Kumagai F., Sato M. and Hasezawa S.** (2003) Three-dimensional reconstitution of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* **44**, 1045-1054
- Kyte, J. and Doolittle, R.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Kweon H.S., Beznoussenko G.V., Micaroni M., Polishchuk R.S., Trucco A., Martella O., Di Giandomenico D., Marra P., Fusella A., Di Pentima A., Berger E.G., Geerts W.J., Koster A.J., Burger K.N., Luini A. and Mironov A.A.** (2004) Golgi enzymes are enriched in perforated zones of golgi cisternae but are depleted in COPI vesicles. *Mol. Biol. Cell* **15(10)**, 4710-4724
- Laboissière M.C.A., Sturley S.L. and Raines R.T.** (1995) The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **270**, 28006-28009
- Laemmli U.D.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lamarche N. and Hall A.** (1994) GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* **10(12)**, 436-40
- Lambert A.-C.** (1993) Microtubuli-organizing centers in higher plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 116-122
- Larkins B.A. and Hurkman W.J.** (1978) Synthesis and deposition of zein protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* **62**, 256-263
- Lee M.H., Min M.K., Lee Y.J., Jin J.B., Shin D.H., Kim D.H., Lee K-H. and Hwang I.** (2002) ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* **129**, 1507-1520
- Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fischette-Laine A.C., Gomord V. and Faye L.** (1998) N-Glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **38**, 31-48
- Letourneur F., Gaynor E.C., Henneke S., Demolliere C., Duden R., Emr S.D., Riezman H. and Cosson P.** (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207
- Levanony H., Rubin R., Altschuler Y. and Galili G.** (1992) Evidence of a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J. Cell Biol.* **119**, 1117-1128
- Lewis S.M., Poon P.P., Singer R.A., Johnston G.C. and Spang A.** (2004) The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles. *Mol. Biol. Cell.* **15(9)**, 4064-4072
- Lichtscheidl I.K., Lancelle S.A. and Hepler P.K.** (1990) Actin-endoplasmic reticulum complexes in *Drosera*. Their structural relationship with the plasmalemma, nucleus, and organelles in cells prepared by high pressure freezing. *Protoplasma* **155**, 116-126
- Liebe S. and Menzel D.** (1995) Actomyosin-based motility of endoplasmic reticulum and chloroplasts in *Vallisneria mesophyll* cells. *Biol. Cell* **85**, 207-222
- Lin C.Y., Huang P.H., Liao W.L., Cheng H.J., Huang C.F., Kuo J.C., Patton W.A., Massenburg D., Moss J. and Lee F.J.** (2000) ARL4, an ARF-like protein that is developmentally regulated and localized to nuclei and nucleoli. *J. Biol. Chem.* **275(48)**, 37815-37823
- Lindlof A.** (2003) Gene identification through large-scale EST sequence processing. *Appl. Bioinformatics* **2(3)**, 123-129
-

- Lippincott-Schwartz J., Yuan L.C., Bonifacino J.S. and Klausner R.D.** (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801-813
- Lippincott-Schwartz J., Cole N.B. and Donaldson J.G.** (1998) Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem. Cell Biol.* **109**, 449-462
- Lippincott-Schwartz J. and Liu W.** (2003) Coat control by curvature. *Nature* **426**, 507-508
- Liu W., Duden R., Phair R.D. and Lippincott-Schwartz J.** (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *J. Cell Biol.* **168**(7), 1053-1063
- Lockhausen J., Kristen U., Menhardt W. and Dallas W.J.** (1990) Three-dimensional reconstitution of a plant dictyosome from serial ultrathin sections using computer image processing. *J. Microsc.* **158**, 197-205
- Lowe M. and Kreis T.E.** (1995) *In vitro* assembly and disassembly of coatomer. *J. Biol. Chem.* **270**, 31364-31371
- Lowe M. and Kreis T.E.** (1996) *In vivo* assembly of coatomer, the COP-I coat precursor. *J. Biol. Chem.* **271**, 30725-30730
- Lu L., Horstmann H., Ng C. and Hong W.** (2001) Regulation of Golgi structure and function by ARF-like protein 1 (Arf1). *J. Cell Sci.* **114**, 4543-4555
- Lucas W.J., Ding B. and Van der Schoot C.** (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125**, 435-476
- Lucas W.J. and Wolf S.** (1993) Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* **3**, 308-315
- Lucas W.J., Lee J.Y.** (2004) Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(9), 712-726.
- Lupashin V.V. and Waters M.G.** (1997) t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase. *Science* **276**, 1255-1258
- Ma D., Zerangue N., Lin Y.F., Collins A., Yu M., Jan Y.N. and Jan L.Y.** (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-319
- Ma D., Zerangue N., Raab-Graham K., Fried S.R., Jan Y.N. and Jan L.Y.** (2002) Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G-protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* **33**, 715-729
- Malhotra V., Orci L., Glick B.S., Block M.R. and Rothman J.E.** (1988) Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicle with cisternae of the Golgi stack. *Cell* **54**, 221-227
- Malhotra V., Serafini T., Orci L., Sheperd J.C. and Rothman J.E.** (1989) Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* **58**, 329-336
- Malsam J., Satoh A., Pelletier L. and Warren G.** (2005) Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles. *Science* **307**, 1095-1098
- Majoul I., Straub M., Hell S.W., Duden R. and Soling H.D.** (2001) KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev. Cell.* **1**(1), 139-153
- Marzioch M., Henthorn D.C., Herrmann J.M., Wilson R., Thomas D.Y., Bergeron J.J., Solari R.C. and Rowley A.** (1999) Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1923-1938
- Matsuoka K., Orci L., Amherdt M., Bednarek S.Y., Hamamoto S., Schekman R. and Yeung T.** (1998) COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-275
- Matsuoka K., Schekman R., Orci L. and Heuser J.E.** (2001) Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13705-13709
-

- Mattera R., Ritter B., Sidhu S.S., McPherson P.S. and Bonifacino J.S.** (2004) Definition of the consensus motif recognized by γ -adaptin ear domains. *J. Biol. Chem.* **279**(9), 8018-8028
- McGonigle T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L. and Swan J.A.** (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **115**, 495-501
- McMahon H.T. and Mills I.G.** (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Op. in Cell Biol.* **16**, 379-391
- McNulty A.K. and Saunders M.J.** (1992) Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *J. Cell Sci.* **103**, 407-414
- Melançon P., Glick B.S., Malhotra V., Weidmann P.J., Serafini T., Gleason M.L., Orci L. and Rothman J.E.** (1987) Involvement of GTP-binding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell* **51**, 1053-1062
- Memon A., Clark G.B. and Thompson Jr G.A.** (1993) Identification of an ARF type low molecular mass GTP-binding protein in pea (*Pisum sativum*). *Biochem. and Biol. Res. Commun.* **193**, 809-813
- Memon A.R., Hwang S., Deshpande N., Thompson G.A. Jr. and Herrin D.L.** (1995) Novel aspects of the regulation of a cDNA (Arf1) from *Chlamydomonas* with high sequence identity to animal ADP-ribosylation factor 1. *Plant Mol Biol.* **29**(3), 567-77.
- Menetrey J., Macia E., Pasqualato S., Franco M. and Cherfils J.** (2000) Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 466-469
- Merkle T.** (2003) Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Curr Genet.* **44**(5), 231-260
- Miles S., McManus H., Forsten K.E. and Storrie B.** (2001) Evidence that the entire Golgi apparatus cycles in interphase HeLa cells: sensitivity of Golgi matrix proteins to an ER exit block. *J. Cell Biol.* **155**, 543-555
- Miller E.A., Beilharz T.H., Malkus P.N., Lee M.C.S., Hamamoto S., Orci L. and Schekman R.** (2003) Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* **114**, 497-509
- Møgelsvang S. and Simpson D.J.** (1998) Protein folding and transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in plants. *J. Plant Physiol.* **153**, 1-15
- Molendijk A.J., Ruperti B. and Palme K.** (2004) Small GTPases in vesicle trafficking. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**(6), 694-700
- Mollenhauer H.H. and Morr  D.J.** (1994) Structure of Golgi apparatus. *Protoplasma* **180**, 14-28
- Moore P.J. and 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 secretory pathways. *Planta* **174**, 433-445
- Mossesso E., Bickford L.C. and Goldberg J.** (2003) SNARE Selectivity of the COPII Coat. *Cell* **114**, 483-495
- Movafeghi A., Happel N., Pimpl P., Tai G.H. and Robinson D.G.** (1999) *Arabidopsis* Sec21p and Sec23p homologs: Probable coat proteins of plant COP-coated vesicles. *Plant Physiol.* **119**, 1437-1445
- Mullins C., Hartnell L.M., Wassarman D.A. and Bonifacino J.S.** (1999) Defective expression of the μ 3 subunit of the AP-3 adaptor complex in the *Drosophila* pigmentation mutant carmine. *Mol. Gen. Genet.* **262**(3), 401-412
- Munro S. and Pelham H.R.B.** (1986) An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300
- Munro S. and Pelham H.R.B.** (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907
- Murphy A.S., Bandyopadhyay A., Holstein S.E. and Peer W.A.** (2005) Endocytotic Cycling of PM Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**
- Murshid A. and Presley J.F.** (2004) ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 133-145
-

- Nakano A., Brada D. and Schekman R.** (1988) A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J. Cell Biol.* **107**, 851-863
- Nakano A. and Muramatsu M.** (1998) Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* **273**, 21431-21434
- Napier R.M., Fowke L.C., Hawes C., Lewis M. and Pelham H.R.** (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **102**, 261-271
- Nazarko T.Y., Nicaud J.M. and Sibirny A.A.** (2005) Observation of the *Yarrowia lipolytica* peroxisome-vacuole dynamics by fluorescence microscopy with a single filter set. *Cell Biol. Int.* **29(1)**, 65-70
- Neal S.E., Eccleston J.F., Hall A. and Webb M.R.** (1988) Kinetic analysis of the hydrolysis of GTP by p21^{N-ras}. *J. Biol. Chem.* **263**, 19718-19722
- Neal S.E., Eccleston J.F. and Webb M.R.** (1990) Hydrolysis of GTP by p21^{NRAS}, the NRAS protooncogene product, is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: use of a single fluorescent probe at the catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(9)**, 3562-3565.
- Nebenführ A., Gallagher L.A., Dunahay T.G., Frohlick J.A., Mazurkiewicz A.M., Meehl J.B. and Staehelin L.A.** (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Phys.* **121**, 1127-1141
- Nebenführ A., Ritzenthaler C. and Robinson D.G.** (2002) Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* **130**, 1102-1108
- Nebenführ A.** (2002) Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 507-512
- Neumann U., Brandizzi F., Hawes C.** (2003) Protein transport in plant cells: in and out of the Golgi. *Ann. Bot. (Lond)*. **92(2)**, 167-80
- Nickel W. and Wieland F.T.** (1997) Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. *FEBS Lett.* **413(3)**, 395-400
- Nickel W., Brügger B. and Wieland F.T.** (2002) Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J. Cell Sci.* **155**, 3235-3240
- Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr. and Deerfield D.W. II.** (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation, *EMBNEW. News* **4**, 14
- Nielsen T., Fricke M., Hellweg D. and Andresen P.** (2001) High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy. *J. Microsc.* **201**, 368-376
- Nilsson O., Crozier A., Schmülling T., Sandberg G. and Olsson O.** (1993) Indole-3-acetic acid homeostasis in transgenic tobacco plants expressing the *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene. *Plant J.* **3**, 681-689
- Nilsson O., Tuominen H., Sundberg B. and Olsson O.** (1997) The *Agrobacterium rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiol. Plant.* **100**, 456-462
- Nishimura N. and Balch W.E.** (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**, 556-558
- Novick P., Field C. and Schekman R.** (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215
- Nufer O., Gulbrandsen S., Degen M., Kappeler F., Paccaud J.P., Tani K. and Hauri H.P.** (2002) Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J. Cell Sci.* **115**, 619-628
- Ohno H., Aguilar R.C., Yeh D., Taura D., Saito T., Bonifacino J.S.** (1998) The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J. Biol. Chem.* **273(40)**, 25915-25921
- Oparka K.J. and Read N.D.** (1994) *Plant Cell Biol: A practical approach.* IRL Press, Oxford, 27-50
- Orci L., Glick B.S. and Rothman J.E.** (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* **46**, 171-184
-

- Orci L., Stamnes M., Ravazzola M., Amherdt M., Perrelet A., Söllner T.H. and Rothman J.E. (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-349
- Ostermann J., Orci L., Tani K., Amherdt M., Ravazzola M., Elazar Z. and Rothman J.E. (1993) Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* **75**, 1015-1025
- Owen D.J., Collins B.M. and Evans P.R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 153-191
- Owens R.J. and Northcote D.H. (1981) The location of arabinosyl:hydroxyproline transferase in the membrane system of potato tissue culture cells. *Biochem. J.* **195**, 661-667
- Palade G.E. (1959) Functional changes in the structure of cell compartments in `sub-cellular particles`. In Haydi T. (ed.) *New York: Ronald*, 66-80
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358
- Palmer D.J., Helms J.B., Beckers C.J., Orci L. and Rothman J.E. (1993) Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **168**, 12083-12089
- Panté N. and Aebi U. (1994) Towards understanding the three-dimensional structure of the nuclear pore complex at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 187-196
- Pasqualato S., Menetrey J., Franco M. and Cherfils J. (2001) The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO reports* **2**, 234-238
- Pasqualato S., Renault L. and Cherfils J. (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with structural device for `front-back` communication. *EMBO reports* **3 (11)**, 1035-1041
- Patriarca E.J., Tate R., Ferraioli S. and Iaccarino M. (2004) Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* **234**, 201-62
- Pedrazzini E. and Vitale A. (1996) The binding protein (BIP) and the synthesis of secretory proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 207-216
- Pepperkok R., Scheel J. Horstmann H., Hauri H.P., Griffiths G. and Kreis T.E. (1993) β -COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex *in vivo*. *Cell* **74**, 71-82
- Pepperkok R., Whitney J.A., Gomez M. and Kreis T.E. (2000) COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted Arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J. Cell Sci.* **113**, 135-144
- Petaja-Repo U.E., Hogue M., Bhalla S., Laperriere A., Morello J.P. and Bouvier M. (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J.* **21**, 1628-1637
- Peyroche A., Paris S. and Jackson C.L. (1996) Nucleotide exchange on Arf mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**, 479-481
- Pimpl P., Movafeghi A., Coughlan S., Denecke J., Hillmer S. and Robinson D.G. (2000) *In situ* localization and *in vitro* induction of plant COPI-coated vesicles. *Plant Cell* **12**, 2219-2236
- Pimpl P., Hanton S.L., Taylor J.P., Pinto-daSilva L.L. and Denecke J. (2003) The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell* **5**, 1242-1256
- Piston D.W. (1999) Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol.* **9**, 66-69
- Post-Beitenmiller D. (1996) Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 405-430
- Powers J. and Barlowe C. (2002) Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* **13**, 880-891
- Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M. and Azcon-Aguilar C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot.* **53**, 525-534.
-

- Presley J.F., Cole N.B., Schroer T.A., Hirschberg K., Zaal K.J. and Lippincott-Schwartz J. (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81-85
- Presley J.F., Ward T., Pfeifer A.C., Siggia E.D., Phair R.D. and Lippincott-Schwartz J. (2002) Dissection of COPI and Arf1 dynamics *in vivo* and role in Golgi membrane transport. *Nature* **417**, 187-193
- Pryer N.K., Salama N.R., Schekman R. and Kaiser C.A. (1993) Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum *in vitro*. *J. Cell Biol.* **120**, 865-875
- Rambourg A and Clermont Y. (1990) Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol.* **51**, 189-200
- Regad F., Bardet C., Tremousaygue D., Moisan D., Lescure B. and Axelos M. (1993) cDNA cloning and expression of an *Arabidopsis* GTP-binding protein of the ARF family. *FEBS Letters* **316**, 133-136
- Regazzi R., Ullrich S., Kahn R.A. and Wollheim C.B. (1991) Redistribution of ADP-ribosylation factor during stimulation of permeabilized cells with GTP analogues. *Biochem. J.* **275**, 639-644
- Rein U., Andag U., Duden R., Schmitt H.D. and Spang A. (2002) ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *J. Cell Biol.* **157**(3), 395-404.
- Reinhard C., Harter C., Bremser M., Brügger B., Sohn K., Helms J.B. and Wieland F. (1999) Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1224-1228
- Reinhard C., Schweikert M., Wieland F.T. and Nickel W. (2003) Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(14), 8253-8257
- Reiter W.D. (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol.* **5**(6), 536-542.
- Rexach M.F. and Schekman R.W. (1991) Distinct biochemical requirements for the budding, targeting and fusion of ER-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* **114**, 219-229
- Richmond T. (2000) Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol.* **1**(4), 3001.1-3001.6
- Ridge R.W. (1988) Freeze substitution improves the ultrastructural preservation of legume root hairs. *Bot. Mag. Tokyo* **101**, 427-441
- Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt W.H. and Sagen H.E. (1930) Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Sci.* **41**, 507-540
- Ritzenthaler C., Nebenführ A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin L.A. and Robinson D.G. (2002) Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco bright yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* **14**, 237-261
- Robertson J.G., Lyttleton P., Bullivant S. and Grayston G.F. (1978) Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell Sci.* **30**, 129-149
- Robinson D.G. (1985) Plant membranes. Endo and plasma membranes of plant cells. *Wiley*, New York
- Robinson D.G., Hoh B., Hinz G. and 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
- Römisch K. (1999) Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J. Cell Sci.* **112**, 4185-4191
- Römisch K., Collie N., Soto N., Logue J., Lindsay M., Scheper W. and Cheng C.-H.C. (2003) Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane in cold-adapted organisms. *J. Cell Sci.* **116**, 2875-2883
- Rolfe B.G., Gresshoff P.M. and Shine J. (1980) Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Science Letters* **19**, 277-284
- Roth L.E. and Stacey G. (1989) Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* **49**(1), 13-23
- Rothman J.E. (1996) The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci.* **5**(2), 185-194
-

- Sabnis R.W., Deligeorgiev T.G., Jachak M.N. and Dalvi T.S.** (1997) DiOC₆(3): a useful dye for staining the endoplasmic reticulum. *Biotech. Histochem.* **72(5)**, 253-258
- Saint-Jore C.M., Evins J., Batoko H., Brandizzi F., Moore I. and Hawes C.** (2002) Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant J.* **29**, 661-678
- Sakai Y., Koller A., Rangell L.K., Keller G.A. and Subramani S.** (1998) Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *J. Cell Biol.* **141(3)**, 625-636
- Salama N.R., Yeung T. and Shekman R.W.** (1993) The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J.* **12**, 4073-4082
- Salama N.R., Chuang J.S. and Schekman R.** (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
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbour*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderfoot A.A. and Raikhel N.V.** (1999) The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs, *Plant Cell* **11**, 629-641
- Satiat-Jeunemaitre B. and 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. and Hawes C.** (1996) Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J. Microsc.* **181**, 162-77
- Sato Y., Matsuoka K. and Nakamura K.** (1997) A tobacco cDNA encoding a homolog of N-ethylmaleimide sensitive fusion (NSF) protein. *Plant Physiol.* **113**, 1464
- Sato K., Sato M. and Nakano A.** (2003) Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell* **14(9)**, 3605-3616
- Sayle R.A. and E. J. Milner-White E.J.** (1995) RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 374-376
- Sasaki T., Matsumoto T., Yamamoto K., Sakata K., Baba T., Katayose Y., Wu J., Niimura Y., Cheng Z., Nagamura Y., Antonio B.A., Kanamori H., Hosokawa S., Masukawa M., Arikawa K., Chiden Y., Hayashi M., Okamoto M., Ando T., Aoki H., Arita K., Hamada M., Harada C., Hijishita S., Honda M., Ichikawa Y., Idonuma A., Iijima M., Ikeda M., Ikeno M., Ito S., Ito T., Ito Y., Iwabuchi A., Kamiya K., Karasawa W., Katagiri S., Kikuta A., Kobayashi N., Kono I., Machita K., Maehara T., Mizuno H., Mizubayashi T., Mukai Y., Nagasaki H., Nakashima M., Nakama Y., Nakamichi Y., Nakamura M., Namiki N., Negishi M., Ohta I., Ono N., Saji S., Sakai K., Shibata M., Shimokawa T., Shomura A., Song J., Takazaki Y., Terasawa K., Tsuji K., Waki K., Yamagata H., Yamane H., Yoshiki S., Yoshihara R., Yukawa K., Zhong H., Iwama H., Endo T., Ito H., Hahn J.H., Kim H.I., Eun M.Y., Yano M., Jiang J. and Gojobori T.** (2002) The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* **420**, 312-316
- Scales S.J., Pepperkok R. and 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
- Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmitz F. and Wittinghofer A.** (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338
- Schledzewski K., Brinkmann H. and 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 coatomer COPI. *J. Mol. Evol.* **48(6)**, 770-778
- Schmid F.X.** (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein folding reactions. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 123-143
- Schmid S.L.** (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 511-548
-

- Schmülling T., Schell J. and Spena A.** (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.* **9**, 2621-2639
- Schnepf E. and Busch J.** (1976) Morphology and kinetics of slime secretion in glands of *Mimulus tinlingii*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **79**, 62-71
- Schnepf E.** (1986) Cellular polarity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 23-47
- Schnepf E.** (1993) Golgi apparatus and slime secretion in plants: the early implications and recent models of membrane traffic. *Protoplasma* **172**, 3-11
- Schopfer C.R. and Hepler P.K.** (1991) Distribution of membranes and the cytoskeleton during cell plate formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. *J. Cell Sci.* **100**, 717-728
- Schuhmacher H.M., Gundlach H., Fiedler F. and Zenk M.H.** (1987) Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports* **6**, 410-413
- Serafini T., Orci L., Amherdt M., Brunner M., Kahn R.A. and 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
- Serafini T., Stenbeck G., Brecht A., Lottspeich F., Orci L., Rothman J.E. and Wieland F.** (1991b) A coat subunit of the Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein β -adaptin. *Nature* **349**, 215-220
- Shan S.O., Stroud R.M. and Walter P.** (2004) Mechanism of association and reciprocal activation of two GTPases. *PLoS Biol.* **2(10)**, 1572-1581
- Shan S.O. and Walter P.** (2005) Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett.* **579(4)**, 921-926
- Shaywitz D.A., Espenshade P.J., Gimeno R.E. and Kaiser C.A.** (1997) COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *J. Biol. Chem.* **272**, 25413-25416
- Shelness G.S. and Blobel G.** (1990) Two subunits of the canine signal peptidase complex are homologous to yeast SEC11 protein. *J. Biol. Chem.* **265(16)**, 9512-9519
- Sherrier D.J. and VandenBosch K.A.** (1994) Secretion of cell wall polysaccharides in *Vicia* root hairs. *Plant J.* **5**, 185-195
- Shimmen T. and Yokota E.** (1994) Physiological and biochemical aspects of cytoplasmic streaming. *Int. Rev. Cytol.* **155**, 97-139
- Shorter J., Beard M.B., Seemann J., Dirac-Svejstrup A.B. and Warren G.** (2002) Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J. Cell Biol.* **157(1)**, 45-62
- Silberstein S. and Gilmore R.** (1996) Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* **10**, 849-858
- Smith E.F. and Townsend C.O.** (1907) A plant tumour of bacterial origin. *Science* **25**, 671-673
- Smith, F.A. and Smith, S.E.** (1989) Membrane transport at the biotrophic interface: An overview. *Aust. J. Plant Physiol.* **16**, 33-43
- Sönnichsen B., Watson R., Clausen H., Misteli T. and Warren G.** (1996) Sorting by COPI-coated vesicles under interphase and mitotic conditions. *J Cell Biol.* **134**, 1411-1425
- Sohn K., Orci L., Ravazzola M., Amherdt M., Bremser M., Lottspeich F., Fiedler K., Helms J.B. and Wieland F.T.** (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J. Cell Biol.* **135**, 1239-1248
- Someya A., Makoto S., Takeda K., Pacheco-Rodriguez G., Ferrans V.J., Moss J. and Vaughan M.** (2001) ARF-GEP100, a guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor 6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2413-2418
-

- Sparkes I.A. and Baker A.** (2002) Peroxisome biogenesis and protein import in plants, animals and yeasts: enigma and variations? *Mol. Membr. Biol.* **19**(3), 171-185
- Spena A., Schmülling T., Koncz C. and Schell J.** (1987) Independent and synergistic activity of *rol A, B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.* **6**, 3891-3899
- Spiess M.** (1995) Heads or tails – what determines the orientation of proteins in the membrane? *FEBS Lett.* **369**, 76-79
- Squire A. and Bastiaens P.I.** (1999) Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Microsc.* **193**, 36-49
- Staehelein L.A. and Chapman R.L.** (1987) Secretion and membrane recycling in plant cells: novel intermediary structures visualized in ultrarapidly frozen sycamore and carrot suspension-culture cells. *Planta* **171**, 43-57
- Staehelein L.A., Giddings Jr. T.H., Kiss J.Z. and Sack F.D.** (1990) Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tip of *Arabidopsis* and *Nicotiana* seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples. *Protoplasma* **157**, 75-91
- Staehelein L.A. and Moore I.** (1995) The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annual Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **46**, 261-288
- Stamnes M.A., Craighead M.W., Hoe M.H., Lampen N., Geromanos S., Tempst P. and Rothman J.E.** (1995) An integral membrane 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. and Wieland F.T.** (1992) γ -COP, a coat subunit of non-clathrin-coated vesicles with homology to Sec21p. *FEBS Lett.* **314**, 195-198
- Stenbeck G., Harter C., Brecht A., Herrmann D., Lottspeich F., Orci L. and Wieland F.T.** (1993) β -COP, a novel subunit of coatamer. *EMBO J.* **12**, 2841-2845
- Steinborn K., Maulbetsch C., Priester B., Trautmann S., Pacher T., Geiges B., Kuttner F., Lepiniec L., Stierhof Y.D., Schwarz H., Jurgens G. and Mayer U.** (2002) The *Arabidopsis* PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev.* **16**(8), 959-71
- Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W. and Walter M.H.** (2003) Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *J. Chem. Ecol.* **29**(9), 1955-1979
- Sturm A., Johnson K.D., Szumilo T., Elbein A.D. and Chrispeels M.J.** (1987) Subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases involved in the processing of N-linked oligosaccharides. *Plant Physiol.* **85**, 741-745
- Szopa J. and Müller-Röber B.** (1994) Cloning and expression analysis of ADP-ribosylation factor from *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell Reports* **14**, 180-183
- Takai Y., Sasaki T. and Matozaki T.** (2001) Small GTP-Binding proteins. *Phys. Rev.* **81**, 153-208
- Takatsu H., Futatsumori M., Yoshino K., Yoshida Y., Shin H.W. and Nakayama K.** (2001) Similar subunit interactions contribute to assembly of clathrin adaptor complexes and COPI complex: analysis using yeast three-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 1083-1089
- Takeuchi M., Tada M., Saito C., Yashiroda H. and Nakano A.** (1998) Isolation of a tobacco cDNA encoding Sar1 GTPase and analysis of its dominant mutations in vesicular traffic using a yeast complementation system. *Plant Cell Physiol.* **39**, 590-599
- Takeuchi M., Ueda T., Yahara N. and Nakano A.** (2002) Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J.* **31**(4), 499-515
- Takizawa P.A., Yucel J.K., Veit B., Faulkner D.J., Deerinck T., Soto G., Ellisman M. and Malhotra V.** (1993) Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, ilimaquinone. *Cell* **73**, 1079-1090
-

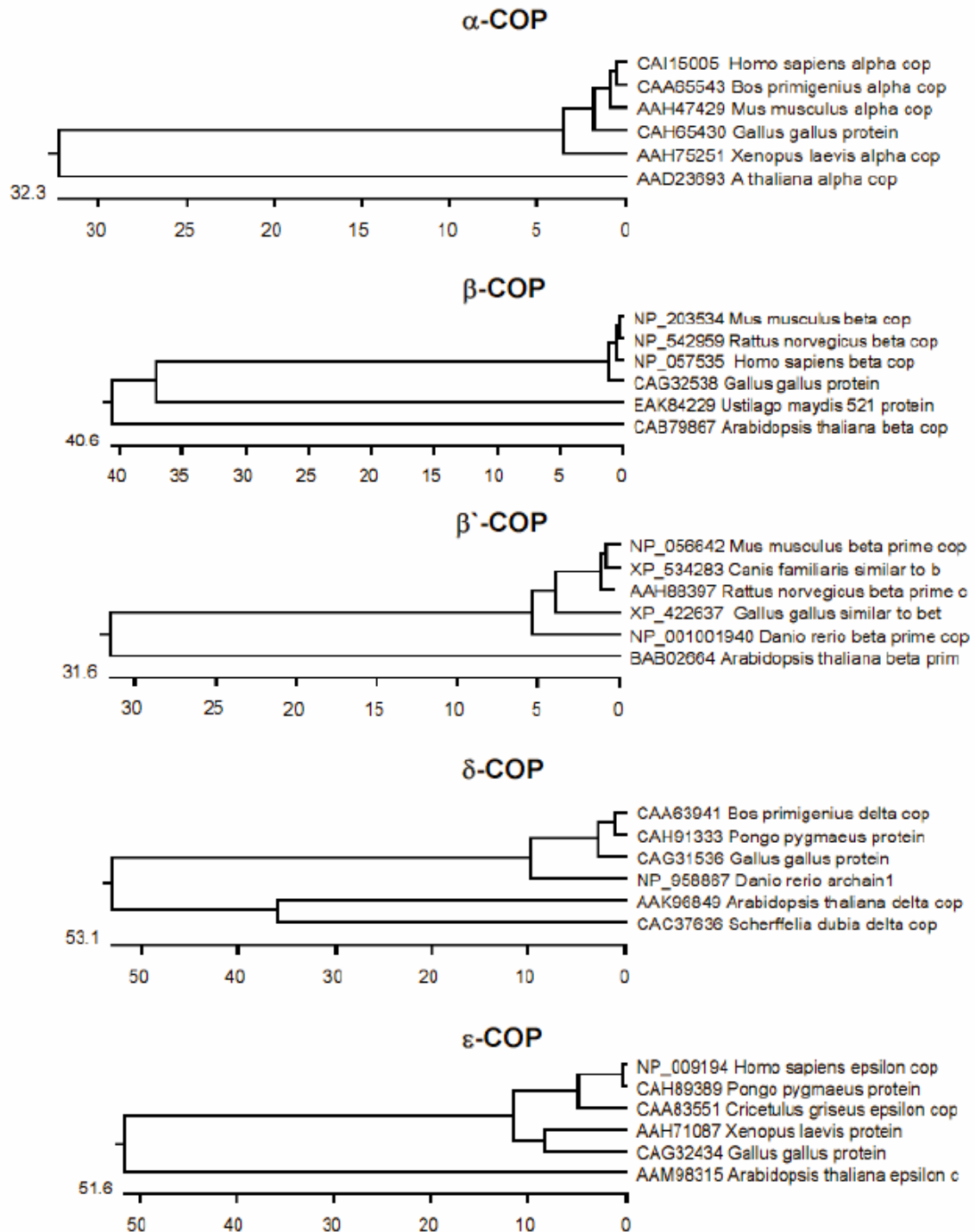
- Tanigawa G., Orci L., Amherdt M., Ravazzola M., Helms J. and Rothman J. (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J. Cell Biol.* **123**, 1365-1371
- Teal S.B., Hsu V.W., Peters P.J., Klausner R.D. and Donaldson J.G. (1994) An activating mutation in ARF1 stabilizes coatamer binding to Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3135-3138
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000), Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* **408**, 796-815
- Thomas M.R., Rose R.J. and Nolan K.E. (1992) Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Rep.* **11**, 113-117
- Thyberg J. and Moskalewski S. (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res.* **246(2)**, 263-279
- Togawa A., Morinaga N., Ogasawara M., Moss J. and Vaughan M. (1999) Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J. Biol. Chem.* **274**, 12308-12315
- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D. and Harrison M.J. (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* **22(6)**, 531-541
- Trombetta S.E. and Parodi A.J. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyl-transferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 9236-9240
- Tse Y.C., Mo B., Hillmer S., Zhao M., Lo S.W., Robinson D.G. and Jiang L. (2004) Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* **16(3)**, 672-693
- Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H. and Nakano A. (2001) Ara6, a plant unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **17**, 4730-4741
- Ueda M., Koshino-Kimura Y. and Okada K. (2005) Stepwise understanding of root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8(1)**, 71-76
- van Aarle I.M. and Olsson P.A. (2003) Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **69(11)**, 6762-6767
- van Buuren M.L., Maldonado-Mendoza I.E., Trieu A.T., Blaylock L.A. and Harrison M.J. (1999) Novel genes induced during an arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis formed between *Medicago truncatula* and *Glomus versiforme*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2(3)**, 171-181
- van Gestel K., Köhler R.H. and Verbelen J.-P. (2002) Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *J. Exp. Bot.* **53(369)**, 659-667
- Vasudevan C., Han W., Tan Y., Nie Y., Li D., Shome K., Watkins S.C., Levitan E.S. and Romero G. (1998) The distribution and translocation of the G protein ADP-ribosylation factor 1 in live cells is determined by its GTPase activity. *J. Cell Sci.* **111**, 1277-1285
- Verma D.P. and Hong Z. (1996) Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiol.* **4(9)**, 364-368
- Vernoud V., Horton A.C., Yang Z. and Nielsen E. (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **131**, 1-18
- Vitale A., Ceriotti A. and Denecke J. (1993) The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J. Exp. Bot.* **44**, 1417-1444
- Vitale A. (2001) Uncovering secretory secrets: inhibition of endoplasmic reticulum (ER) glucosidases suggests a critical role for ER quality control in plant growth and development. *Plant Cell* **13(6)**, 1260-1262.
- Vogel J.P., Lee J.N., Kirsch D.R., Rose M.D. and Sztul E.S. (1993) Brefeldin A causes a defect in secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268(5)**, 3040-3043
- von Heijne, G. (1988) Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **947**, 307-333
- Wada M. and Suetsugu N. (2004) Plant organelle positioning. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7(6)**, 626-631
-

- Walter P. and Blobel G.** (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**, 551-556
- Walther P.** (2003) Recent progress in freeze-fracturing of high-pressure frozen samples. *J. Microsc.* **212**, 34-43
- Wanker E.E., Sun Y., Savitz A.J. and Meyer D.I.** (1995) Functional characterization of the 180-kD ribosome receptor *in vivo*. *J. Cell Biol.* **130**, 29-39
- Wanner G. and Theimer R.R.** (1978) Membranous appendices of spherosomes (oleosomes): Possible role in fat utilization in germinating oil seeds. *Planta* **140**, 163-169
- Ward T.H., Polishchuk R.S., Caplan S., Hirschberg K. and Lippincott-Schwartz J.** (2001) Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* **155**, 557-570
- Watson P.J., Frigerio G., Collins B.M., Duden R. and Owen D.J.** (2004) γ COP appendage domain – structure and function. *Traffic* **5**, 79-88
- Wee E.G.-T., Sherrier D.J., Prime T.A. and Dupree P.** (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* **10**, 1759-1768
- Weiss O., Holden J., Rulka C. and Kahn R.A.** (1989) Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 21066-21072
- Whaley W.G. and Mollenhauer H.H.** (1963) The Golgi apparatus and cell plate formation – a postulate. *J. Cell Biol.* **17**, 216-221
- Willnow T.E.** (1998) Receptor-associated protein (RAP): A specialized chaperone for endocytic receptors. *Biol. Chem.* **379**, 1025-1031
- Wong D.H. and Brodsky F.M.** (1992) 100-kD proteins of Golgi- and trans-Golgi network-associated coated vesicles have related but distinct membrane binding properties. *J. Cell Biol.* **117(6)**, 1171-1179
- Wu C.C., Yates J.R. 3rd, Neville M.C. and Howell K.E.** (2000) Proteomic analysis of two functional stages of the Golgi complex in mammary epithelial cells. *Traffic* **1**, 769-782
- Yamaji R., Adamik R., Takeda K., Togawa A., Pacheco-Rodriguez G., Ferrans V.J., Moss J. and Vaughan M.** (2000) Identification of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2567-2572
- Yamamoto K. and Sasaki T.** (1997) Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol. Biol.* **35(1-2)**, 135-144
- Yang Y.-D., el Amawi R., Bubeck J., Pepperkok R., Ritzenthaler C. and G. Robinson D.G.** (2005) Visualization of COPII and Golgi Dynamics in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells Provides Evidence for Transient Association of Golgi Stacks with ER Exit Sites. *Plant Cell* tpc.104.026757
- Zambryski P.** (2004) Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. *J Cell Biol.* **164(2)**, 165-168.
- Zhang G.F. and Staehelin L.A.** (1992) Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant Physiol.* **99**, 1070-1083
- Zhang C.J., Rosenwald A.G., Willingham M.C., Skuntz S., Clark J. and Kahn R.A.** (1994) Expression of a dominant allele of human ARF1 inhibits membrane traffic *in vivo*. *J. Cell Biol.* **124**, 289-300
- Zhao L., Helms J.B., Brügger B., Harter C., Martoglio B., Graf R., Brunner J. and Wieland F.T.** (1997) Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with coatomer subunit β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4418-4423
- Zhao L., Helms J.B., Brunner J. and Wieland F.T.** (1999) GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J. Biol. Chem.* **274**, 14198-14203
-

7. Anhang

7.1. Anhang 1

7.1.1. Phylogenievergleich zwischen pflanzlichen und tierischen Coatomerproteinen



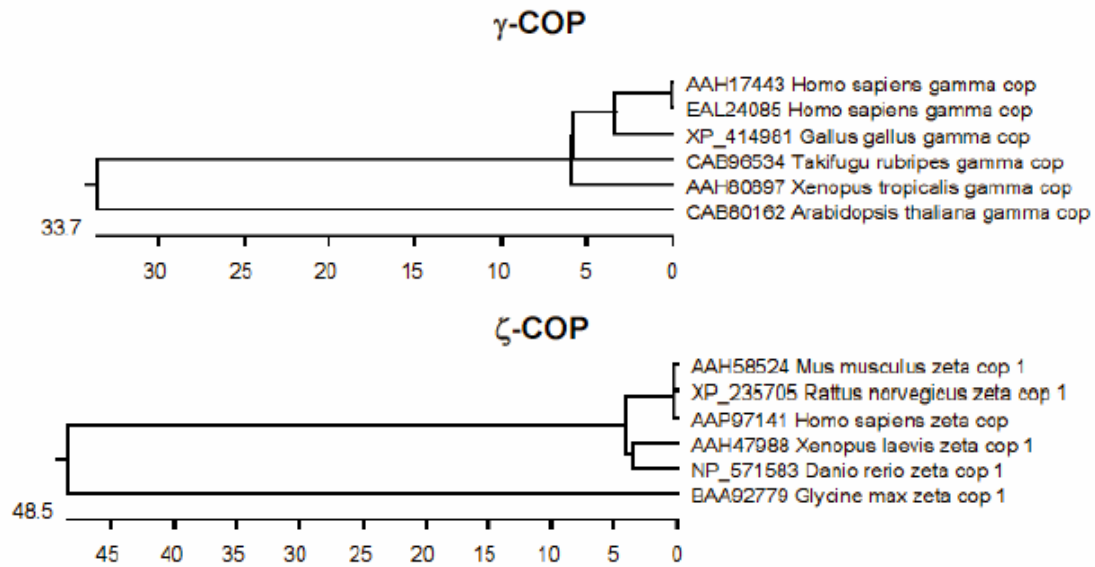


Abb. 7.1: Phylogenetischer Vergleich zwischen pflanzlichen und tierischen Coatamerproteinen. Die Proteinsequenzen wurden in MegAlign™ nach dem Clustal V Algorithmus miteinander verglichen und die Verwandtschaft zwischen ihnen in Form von phylogenetischen Bäumen visualisiert. Die Skala gibt den Grad der Divergenz an. Je kürzer der Abstand zwischen zwei Ästen, desto enger ist der Grad der Verwandtschaft zwischen den Proteinen.

Arabidopsis thaliana Ackerschmalwand, *Bos primigenius* Hausrind, *Canis familiaris* Hund, *Cricetulus griseus* chinesischer Streifenhamster, *Danio rerio* Zebrafisch, *Glycine max* Sojabohne, *Homo sapiens* Mensch, *Gallus gallus* Huhn, *Mus musculus* Hausmaus, *Pongo pygmaeus* Orang-Utan, *Rattus norvegicus* Wanderratte, *Scherffelia dubia* eine Grünalge, *Takifugu rubripes* japanischer Kugelfisch, *Ustilago maydis* Rostpilz, Erreger des Maisbeulenbrands, *Xenopus laevis* Krallenfrosch, *Xenopus tropicalis* afrikanischer Krallenfrosch.

7.2. Anhang 2

7.2.1. Multiple Alignments der EST-Sequenzen aus *M. truncatula* mit Homologien für Coatomer-Untereinheiten auf Basis der Aminosäureabfolge

α -COP

```

                *           20           *           40           *           60           *
A_thaliana_a-COP : MLT-----KFKETKSNRVKGLSFHPKRPWILASLHSGVIQLWDYRMGTLID : 45
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : -----FN-----LQSSTMPRLREIKRKLQQRSEKVCVDLHPTPEWILASLYSGTVCIWNYQSQTMAK : 58
TC78665          : NLSLGLFFKSTFLNQLTTFQSSEMPLRLEIKRKLQQRSEKVSVDLHPTPEWILASLYSGTVCIWNYQSQTMAK : 74

                80           *           100           *           120           *           140
A_thaliana_a-COP : RFDEHEGPVRGVHFHNSQPLFVSGGDDYKIKVWVNYKTHRCLFTLLGHLDYIRTVQFHHPENPWIVSASDDQTIRI : 119
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : SFEVTELPVRSKAFVARKQWVAGDDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDYIRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKL : 132
TC78665          : SFEVTELPVRSKAFIARKQWVAGDDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHSYIRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKL : 148

                *           160           *           180           *           200           *           220
A_thaliana_a-COP : WNWQ-SRTCISVLTGHNHYVMCASFPKE-DLVVSASLDQTVRVWDIGALKKKSASPADDLMRFSQMNSDLFGG : 191
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : WDWEKGWICTQIFEGHSHYVMQVTFNPKDNTFASASLDRTIKIWNLGS----- : 181
TC78665          : WDWEKGWICTQIFEGHSHYVMQVTFNPKRY----- : 178

                *           240           *           260           *           280           *
A_thaliana_a-COP : VDAIVKYVLEGHDRGVNWFHPTPLFIVSGADDRQVKLWRMNETKAWVDTLRGHMNNVSSVMFHAKQDIIVS : 265
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                300           *           320           *           340           *           360           *
A_thaliana_a-COP : NSEDKSIRVWDATKRTGIQTFRREHDFWILAVHPEINLLAAGHDNGMIVFKLERERPAFALSGLSFLYAKDRF : 339
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                380           *           400           *           420           *           440
A_thaliana_a-COP : LRYEYSTQKDSQVIPIRRPGTPSLNQSPTLSYSPTENAVLICSDLDGGSYELYIIPKDSVGRSDVVDQAKRG : 413
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                *           460           *           480           *           500           *           5
A_thaliana_a-COP : TGGSAVFIARNRFAVLEKSTSQVLVKNLKNVVKSSLPITDAIFYAGTGNLLCRSEDKVVIFDLQQRVLVGE : 487
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : -----FYAGTGNLLCRSEDRVVFDLQQRIVLGD : 29
TC78665          : ----- : -

```

```

                20          *          540          *          560          *          580          *
A_thaliana_a-COP : LQTPFVRYVVWSNDMESVALLSKHTIIIIASKKLVLQCTLHETIRVKSGAWDDNGVFIYTTLNHIKCYCLPNGDSG : 561
TC78999          : ----- : -
TC81826          : ----- : -
TC82848          : LQTPFIKYVVWSNDEHVALLSKHAI IIIASKKLVHQCTLHETIRVKSGAWDDNGVFIYTTLNHIKCYCLPNGDNG : 103
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                600          *          620          *          640          *          660
A_thaliana_a-COP : IIRTLDVPIYITKVSNTIFCLDRDGKNRAITINATEYIFKLLALLRKKYDHVMSMIKNSQLCGQAMIAYLQQKG : 635
TC78999          : ----- : -
TC81826          : -----QLCGTAMIAYLQQKG : 15
TC82848          : IIKTLDVPIYITKVSANIIFCLDRDGKSRVITIDATEYIFKLSLFKKKYD----- : 153
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                *          680          *          700          *          720          *          740
A_thaliana_a-COP : FPEVALHFVEDERIRFNLALESIGNISVAVASATEINEKDHWYRLGVEALRQGNRIVEFAYQQTKNFERLSFLY : 709
TC78999          : ----- : -
TC81826          : FPEVALHFVKDERIRFNLAIESGNIQIIVASATAIDEKDHWYQLGVEALRQGNAGIVEYAYQRTKNFERLSFLY : 89
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                *          760          *          780          *          800          *
A_thaliana_a-COP : LITGNLDKLSKMLKIAEVKNNVMGQFHNALYLGDKERVKILENAGHPLAYITASVHGLTDIAERLAIELGDN : 783
TC78999          : -----GHLPLAYVAASVHGLDDVAKRLAAELGNN : 29
TC81826          : LITGNVEKLSKMLKIAEVKNDVMGQFHNALYMGDIRERVKILENVGHLPLAYITASTHGLHDVAERLAAELGDN : 163
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                820          *          840          *          860          *          880
A_thaliana_a-COP : VPSLPEGKTPSSLMPSPIMCGGDWPLLRVMKGFIEGGLESANRGAVDEEEEDV-EGDWEGGLDKFDVDFDMENT : 856
TC78999          : VPSLPEGKTPSSLIPSPVPCGSDWPLLRVMRGMFDGGFDNTGRGIADEEEDEAPDGDWGEELD-I-VDVDANG : 101
TC81826          : VPSLPEGKTPSSLIPSPVLCCGDWPLLRVMRGI FDGGFRNADQDADEEEFDDAPEGDWVEDIG-LDVDGLENG : 236
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : 185
TC78665          : ----- : 179
                k

                *          900          *          920          *          940          *          960
A_thaliana_a-COP : DIEAILDGAEEAGEEEDDEEGGWGL-DLDLPELDTPKASANARSSFTVTPPQGMFVSQIWSQKSSSLAAEQAAAG : 929
TC78999          : DVTAILLEDGEVAEE-NDEEGGWEMEDLELGPADTPKASVGTQSSVFIPPTTGLFPVSHIWTQKSSSLAAEHAAAG : 174
TC81826          : DVTAILDDGEAAEE-GDEEGGWELEDLELPEADTPKASVSTRSSVFVAPTPGMAVSIWIQRSSSLAADHAAAG : 309
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

                *          980          *          1000          *          1020          *
A_thaliana_a-COP : SFDTAMRLLHRQLGIRNFAPLKSMLFDLFSGSHSYLRAFSSSPVVPLAIERGWSESSSPNVRGPPALVFDLFSQL : 1003
TC78999          : NFDTAMRLLNRQLGIRNFAPLKSMLFDLHTGSHSYLRAFSSAPIISLAVERGWTESSSTSVRGPPALPFKLSQL : 248
TC81826          : NFDTAMRLLNRQLGIRNFAPLRSMFLDLHSASHSYLRAFSSAPVVPLAVERGWTESSSPNVRGPPALPYKLSQL : 383
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

```

```

          1040          *          1060          *          1080          *          1100          *
A_thaliana_a-COP : EAKLKSGYKATTAGKLEALRVFLSILQTIPLVVVESRREVDEVKELVIVKEYVLGLQLELKRREMKDDPVRQ : 1077
TC78999          : DEKLRAGYKFFTAGKFTEALKTFVLSILHTIPLIVVESRREVDDVKELIIVKEYVLGLQIELKRRETKDNPVRQ : 322
TC81826          : DEKLGAGYKSTTAGKFTEALRTFANILHTIPLIVVESRREVDDVKELIIVKEYVLALQMELEKRRE----- : 449
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

```

```

          1120          *          1140          *          1160          *          1180
A_thaliana_a-COP : QELAAYFTHCKLQTPHLRLAYFSAMTVCYKSKNMATAAHFARSLLDTNPTIESQARTARQVMQAAERNMTDATT : 1151
TC78999          : HELAAYFTHCNLQAPHLRLALQNAMVTCFKAKNLATAANFARRLLETNPTIENQAKTARQVLAAAERNMTDATQ : 396
TC81826          : ----- : -
TC82848          : ----- : -
TC87605          : -----FYIGCSPERSELR----- : 198
TC78665          : -----YLCQC-----IS----- : 186

```

```

          *          1200          *          1220          *          1240          *
A_thaliana_a-COP : LNYDFRNPFVICGSTYVPIYKQKDVACPYCTARFVPSQEGNICSVCDLAVIGADASGLLCSASQVR- : 1218
TC78999          : LNYDFRNPFVICGATYVPIYRQKDVACPYCTSRFVPSQEGQLCTVCDISVVGADASGLLCSPSQVR- : 463
TC81826          : -----M : 450
TC82848          : ----- : -
TC87605          : ----- : -
TC78665          : ----- : -

```

β-COP

```

                *      20      *      40      *      60      *
A_thaliana_b-COP : MDKSSTMLVHYDKGTPAVANEIKEALEGNDVEAKVDAMKKAIMLLLNGETIPQLFITIIRYVLPSEDHTIQKLLL : 75
tc89513          : MEKSCSLIVHFDKGTTPALATEIKESLEGNDVAAKIEALKKAIMLLLNGETIPQLFITVIRYVLTCDHDTVQKLLL : 75
al368347        : ----- : -
tc77558         : ----- : -
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : ----- : -
nf090g01        : ----- : -
20285391        : ----- : -
nf067c03        : ----- : -

```

```

                80      *      100      *      120      *      140      *
A_thaliana_b-COP : LYLELIEKTDKSGKVLPEMILICQNLRRNLQHPNEYIRGVTLRFLCRMKETEIVEPLTPSVLQNLEHRHHPFVRRN : 150
tc89513          : LYLEITDKTDSRGKVLPEMILICQNLRRNLQSPNEFIRGVTLRFLCRINESEIVEPLIPSIILSNLEHRHHPFVRRN : 150
al368347        : ----- : -
tc77558         : ----- : -
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : ----- : -
nf090g01        : ----- : -
20285391        : ----- : -
nf067c03        : ----- : -

```

```

                160      *      180      *      200      *      220
A_thaliana_b-COP : AILAIMSIYKLPHGDLFVDAPEMIEKVLSTEQDPSAKRNAFLMLFTCAEERAVNYLLSNVDKVDWNSLQMVV : 225
tc89513          : AVLAGMSVYKLPQGEQLLDSAPEIVEKFLVSEQDA----- : 185
al368347        : -----NAFLMLFSCAQDRAVNYLFTNIDRIIDWGEQLQMVV : 36
tc77558         : ----- : -
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : ----- : -
nf090g01        : ----- : -
20285391        : ----- : -
nf067c03        : ----- : -

```

```

                *      240      *      260      *      280      *      300
A_thaliana_b-COP : LELIRSVCKTKPAEKGYIKI IISLLSATSSAVIYECAGTLVSLSSAPTAIRAAAANTYCQLLSQSDNNVKLILL : 300
tc89513          : ----- : -
al368347        : LELIKKVCRRNKGEGKGYIKI IISLLSANSTAVVYECAGTLVSLSSAPTAIKAAANTYCQLLSQSDNNVKLIVL : 111
tc77558         : ----- : -
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : ----- : -
nf090g01        : ----- : -
20285391        : ----- : -
nf067c03        : ----- : -

```

```

                *      320      *      340      *      360      *
A_thaliana_b-COP : DRLYELKTLHRDIMVELIIDVLRALSSPNLDIRRKTLDIALDLITHHNINEVVQMLKKEVVKTSQSGELEKNGEYR : 375
tc89513          : ----- : -
al368347        : DRLNELK---RD----- : 120
tc77558         : ----- : -
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : ----- : -
nf090g01        : ----- : -
20285391        : ----- : -
nf067c03        : ----- : -

```

```

      380          *          400          *          420          *          440          *
A_thaliana_b-COP : QMLIQAIHACAVKFPEVASTVVHLLMDFLGDSNVASALDVVVFVREIIEETNPCLRVSIIITRLLDTFYQIRAGKVC : 450
tc89513           : ----- : -
al368347         : ----- : -
tc77558          : -----KLRVSIITRLLDTFYQIRAAARVC : 23
EST432480        : ----- : -
EST641360        : ----- : -
MtBC47C07F1      : ----- : -
MtBC15A04        : ----- : -
nf090g01         : ----- : -
20285391         : ----- : -
nf067c03         : ----- : -

      460          *          480          *          500          *          520
A_thaliana_b-COP : PCALWIIIGEYCLSLSEVESGISTITQCLGELPFYVSEESEPTETSCKKIQTSSAMVSSRKPVLADGTYATQSA : 525
tc89513           : ----- : -
al368347         : ----- : -
tc77558          : SCALWIIIGEYCLSLSEVESGIATIKQCLGDLPFYTISEDEGEGQETSKAVQQVNSTTVSSRRPAILADGTYATQSA : 98
EST432480        : -----A : 1
EST641360        : ----- : -
MtBC47C07F1      : ----- : -
MtBC15A04        : ----- : -
nf090g01         : ----- : -
20285391         : ----- : -
nf067c03         : ----- : -

      *          540          *          560          *          580          *          600
A_thaliana_b-COP : ASETTFSSPTVVQGSLTS-GNLRALLLTGDFFLGAVVACTLTKLVLRLLEEVQSSKTEVNKTVSQALLIMVSIQL : 599
tc89513           : ----- : -
al368347         : ----- : -
tc77558          : ALETAMSPPTLVQGSLSISIGNLRSLILSGDFFLGAVVACTLTKLILRLLEEVQTSKVEVNKATSQSLLIMVSMQL : 173
EST432480        : ALETAMSPPTLVQGSLSISIGNLRSLILSGDFFLGAVVACTLTKLILRLLEEVQTSKVEVNKATSQSLLIMVSMQL : 76
EST641360        : -----PTLVQGSLSISIGNLRSLILSGDFFLGAVVACTLTKLILRLLEEVQTSKVEVNKATSQSLLIMVSMQL : 67
MtBC47C07F1      : ----- : -
MtBC15A04        : ----- : -
nf090g01         : ----- : -
20285391         : ----- : -
nf067c03         : ----- : -

      *          620          *          640          *          660          *
A_thaliana_b-COP : GQSPVSPHPIDNDSYERIMLCIKLLCHRNVEMKKIWLWLESCRQSFVKMLADKQRRETEEIKAKAQISNAQPDDLID : 674
tc89513           : ----- : -
al368347         : ----- : -
tc77558          : GQSSVLPHPIDNDSHDRVVLCIRLLCNTGDEIRKIWLWLESCRQSFVKMLADKQRRETEEIKAKAQISNAQPDDLID : 248
EST432480        : GQSSVLPHPIDNDSHDRVVLCIRLLCNTGDEIRKIWLWLESCRQSFVKMLADKQRRETEEIKAKAQISNAQPDDLID : 151
EST641360        : GQSSVLPHPIDNDSHDRVVLCIRLLCNTGDEIRKIWLWLESCRQSFVKMLADKQRRETEEIKAKAQISNAQPDDLID : 142
MtBC47C07F1      : -----ADKQRRETEEIKAKAQISNAQPDDLID : 27
MtBC15A04        : ----- : -
nf090g01         : ----- : -
20285391         : ----- : -
nf067c03         : ----- : -

      680          *          700          *          720          *          740          *
A_thaliana_b-COP : FFHLKSRKMSLLMINFFQGMSSQLELEDQVQDDLKRATGEFTKDADDANKLNRIQLTGFSDPVYAEAYVTVHHYD : 749
tc89513           : ----- : -
al368347         : ----- : -
tc77558          : FYHLKSRK-----GMSQLELEDEVQDDLKRATGEFTKDADDANKLNRIQLTGFSDPVYAEAYVTVHHYD : 313
EST432480        : FYHLKSRK-----GMSQLELEDEVQDDLKRATGEFTKDADDANKLNRIQLTGFSDPVYAEAYVTVHHYD : 216
EST641360        : FYHLKSRK-----GMSQLELEDEVQDYLKRATGEFTKDADDANKLNRIQLTGFSDPVYAEAYVTVHHYD : 207
MtBC47C07F1      : FYHLKSRK-----GMSQLELEDEVQDDLKRATGEFTKDADDANKLNRIQLTGFSDPVYAEAYVTVHHYD : 92
MtBC15A04        : -----RILQLTGFSDPVYAEAYVTVHHYD : 24
nf090g01         : -----SDPVYAEAYVTVHHYD : 16
20285391         : -----PEAYVTVHHYD : 11
nf067c03         : -----PEAYVTVHHYD : 11
                                     eayvtvhhyd

```



```

          760          *          780          *          800          *          820
A_thaliana_b-COP : HAEPVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYSLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETS-NVME : 823
tc89513          : ----- : -
al368347        : ----- : -
tc77558         : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYTLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETSSNVLE : 388
EST432480       : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKL----- : 246
EST641360       : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMG----- : 233
MtBC47C07F1     : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYTLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETS----- : 162
MtBC15A04       : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYTLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETSSNVLE : 99
nf090g01        : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYTLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETSSNVLE : 91
20285391        : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYTLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETSSNVLE : 86
nf067c03        : IVLDVTVINRTKETLQNLCLLELATMGDLKLVERPQNYTLAPESSKQIKANIKVSSTETGVIFGNIVYETSSNVLE : 86
          i l vtvinrtketlqnlcllelatmg

```

```

          *          840          *          860          *          880          *          900
A_thaliana_b-COP : RNVVVLNDIHIHIDIMDYISPAVCSEVAFRTMWAEFEWENKVAVNTTQNEREFLDHIKSTNMKCLTAPSAIAGEC : 898
tc89513          : -----FE----- : 187
al368347        : ----- : -
tc77558         : RTVIVLNDIHIHIDIMDYIAPASCADVAFRTMWAEFEWENKVAVNTVLQDEREFLGHIKSTNMKCLTPPSALEGEC : 463
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : RTVIVLNDIHIHIDIMDY----- : 115
nf090g01        : RTVIVLNDIHIHIDIMDYIAPASCADVAFRTMWAEFEWENKVAVNTVLQDEREFAG----- : 145
20285391        : RTVIVLNDIHIHIDIMDYIAPASCADVAFRTMWAEFEWENKVAVNTVLQDEREFLGHIKSTNMKCLTPPSALEGEC : 161
nf067c03        : RTVIVLNDIHIHIDIMDYIAPASCADVAFRTMWAEFEWENKVAVNTVLQDEREFLGHIKSTNMKCLTPPSALEGEC : 161

```

```

          *          920          *          940          *          960
A_thaliana_b-COP : GFLAANLYAKSVFGEDALVNLSIEKQTDGTLGSGYIRIRSKTQGIALSLGDKITLKQKGGGS- : 958
tc89513          : ----- : -
al368347        : -----N : 121
tc77558         : GFLAANLYAKSVFGEDALVNVNLSIEKQSDGKLSGYIRIRSKTQGIALSLGDKITLKQKGTAG : 524
EST432480       : ----- : -
EST641360       : ----- : -
MtBC47C07F1     : ----- : -
MtBC15A04       : ----- : -
nf090g01        : ----- : -
20285391        : GFLAANLYAKSVFGEDALVNVNLSIEKQSDGKGL----- : 192
nf067c03        : GFLAANLYAKSVFGEDALVNVNLSIEKQSDGKGL----- : 192

```

β -COP

```

A_thaliana_b`-COP : M-----*      20      *      40      *      60      *      : 67
nf009e04           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFTIPRKQWVVA : 74
nf009h04           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFIARKQWVVA : 74
nf017g08           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFVARKQWVVA : 74
nf031h03           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFIARKQWVVA : 74
nf084d0           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFIARKQWVVA : 74
tc87605           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFVARKQWVVA : 74
nf106g10           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFVARKQWVVA : 74
nf115a05           : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFIARKQWVVA : 74
t113580e          : MPLRLEIKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFIARKQWVVA : 74
nf059h03           : -----IKRKLAAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFVARKQWVVA : 68
nf084h07           : -----LAQRSERVKSVDLHPTEPWILASLYSGTVCIWNYQQTITKSFEVTELPVRSAKFVARKQWVVA : 64
nf087a02           : -----YQSQTMAKSFEVTELPVRSAKFVARKQWVVA : 31
tc82717           : ----- : -
nf015a04           : T-----TVLKEFG----- : 8
tc83357           : ----- : -
EST641821         : A-----HW----- : 3
tc89186           : A-----HW----- : 3
tc80224           : G----- : 1

```

```

A_thaliana_b`-COP : 80      *      100      *      120      *      140      : 141
nf009e04           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHSYD IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 134
nf009h04           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHSYD IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 148
nf017g08           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDY IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 138
nf031h03           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHSYD IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 148
nf084d0           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHSYD IRCVAVHPTLPYVLS----- : 116
tc87605           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDY IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 148
nf106g10           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDY IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 148
nf115a05           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHSYD IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 148
t113580e          : GADDMFIRVYNYNTVSKVKVFEAHSYD IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLW----- : 126
nf059h03           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDY IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 132
nf084h07           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDY IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 128
nf087a02           : GADDMFIRVYNYNTMDKVKVFEAHTDY IRCVAVHPTLPYVLSDDMLIKLWDWENGWACTQIFEGHSHYVMQV : 105
tc82717           : -----ASDDQVLKLNWKKGWSDETFEGNSHYVMQV : 32
nf015a04           : ----- : -
tc83357           : ----- : -
EST641821         : ----- : -
tc89186           : ----- : -
tc80224           : ----- : -

```

```

A_thaliana_b`-COP : *      160      *      180      *      200      *      220      : 215
nf009e04           : VFNPKDTNTFASASLDRTIKIWNLGSPDPNFTLDAHQKGVNCVDYFTGGDKPYLITGSDHTAKVWDYQTKSCV : 135
nf009h04           : VFNPKDTNTFASASLDRTIKIWNLGSPDPNFTLDAHXXKGVNCVDYFTG----- : 196
nf017g08           : ----- : -
nf031h03           : VFNPKDTNTFASASLDRTI----- : 167
nf084d0           : ----- : -
tc87605           : VFNPKDTNTFASASLDRTIKIWNLGSPDP----- : 177
nf106g10           : VFNPKDTNTFASASLD----- : 164
nf115a05           : VFNPK----- : 153
t113580e          : ----- : -
nf059h03           : ----- : -
nf084h07           : ----- : -
nf087a02           : VFNPKDTNTFASASLDRTIKIWNLGSPDPNFTLDAHQKGVNCVDYFTGGDKPYLITGSDHTAKV----- : 170
tc82717           : VFNPKDPSTFASASLDGTLKIWIIDSSAPNFTFEGHLKGMNCVDYFESNDKQYLLSGSDDYTAKVWDYDSKNCV : 106
nf015a04           : ----- : -
tc83357           : ----- : -
EST641821         : ----- : -
tc89186           : ----- : -
tc80224           : ----- : -

```

```

          *      240      *      260      *      280      *
A_thaliana_b`-COP : QTLDGHTHNVSAVCFHPELPIIITGSEDGTVRIWHATTYRLENTLNYGLERVWAIGYKSSRRVIGYDEGTIM : 289
nf009e04           : ----- : -
nf009h04           : ----- : -
nf017g08           : ----- : -
nf031h03           : ----- : -
nf084d0            : ----- : -
tc87605            : ----- : -
nf106g10           : ----- : -
nf115a05           : ----- : -
t113580e           : ----- : -
nf059h03           : ----- : -
nf084h07           : ----- : -
nf087a02           : ----- : -
tc82717           : QTLGKHNNVTAICAHPEIPIIITASEDSTVKIWDVAVTYRLQNTLDFGLERVWSIGYKKG----- : 167
nf015a04           : -----PIGYLKSSRRVIGYDEGTIM : 29
tc83357           : ----- : -
EST641821         : ----- : -
tc89186           : ----- : -
tc80224           : ----- : -

```

```

          300      *      320      *      340      *      360      *
A_thaliana_b`-COP : VKLGREIPVASMDSSGKIIWAKHNEIQTANIKSIGAGYEATDGERLPLSVKELGTCDLYPQSLKHNPNGRFVVV : 363
nf009e04           : ----- : -
nf009h04           : ----- : -
nf017g08           : ----- : -
nf031h03           : ----- : -
nf084d0            : ----- : -
tc87605            : ----- : -
nf106g10           : ----- : -
nf115a05           : ----- : -
t113580e           : ----- : -
nf059h03           : ----- : -
nf084h07           : ----- : -
nf087a02           : ----- : -
tc82717           : ----- : -
nf015a04           : VKLGREVPVASMDNSGKIIWAKHNEIQTVNIKSIGAGLEVADGERLPLAVKELGTCDLYPQNLKHNPNGRFVVV : 103
tc83357           : -----GRFVVV : 6
EST641821         : ----- : -
tc89186           : ----- : -
tc80224           : ----- : -

```

```

          380      *      400      *      420      *      440
A_thaliana_b`-COP : CGDGEYIIYTALAWRNRSFSGLEFVWSSEGECAVRESSSKIKIFSKNFQERKSIRPTFSAEKIFGGTLLAMCS : 437
nf009e04           : ----- : -
nf009h04           : ----- : -
nf017g08           : ----- : -
nf031h03           : ----- : -
nf084d0            : ----- : -
tc87605            : ----- : -
nf106g10           : ----- : -
nf115a05           : ----- : -
t113580e           : ----- : -
nf059h03           : ----- : -
nf084h07           : ----- : -
nf087a02           : ----- : -
tc82717           : ----- : -
nf015a04           : CGDGXYII----- : 111
tc83357           : CGDGEYIIYTALAWRNRSFSGSALEIVWSSDGEYAVRETTSKIKIFSFTFQEKKSIRPTFSAERIFGGTVLAMCS : 80
EST641821         : ----- : -
tc89186           : ----- : -
tc80224           : ----- : -

```

```

*      460      *      480      *      500      *      5
A_thaliana_b`-COP : NDFICFYDWAECRLIQIDVTVKNLYWAESGDLVAIASDTSFYILKYNRELVSSSHFDSSGRPTDEEGVEDAFEVL : 511
nf009e04 : ----- : -
nf009h04 : ----- : -
nf017g08 : ----- : -
nf031h03 : ----- : -
nf084d0 : ----- : -
tc87605 : ----- : -
nf106g10 : ----- : -
nf115a05 : ----- : -
t113580e : ----- : -
nf059h03 : ----- : -
nf084h07 : ----- : -
nf087a02 : ----- : -
tc82717 : ----- : -
nf015a04 : ----- : -
tc83357 : NDFICFYDWAECRLIRRIDVNVKNLYWADS----- : 110
EST641821 : ----- : -
tc89186 : ----- : -
tc80224 : ----- : -

```

```

20      *      540      *      560      *      580      *
A_thaliana_b`-COP : HENDERVRTGIWVGDCFIYNNSSWKLNYCVGGEVTTMYHLDRPMLLGYIANQSRVYLVDKFEFNVIGYTLTLLSL : 585
nf009e04 : ----- : -
nf009h04 : ----- : -
nf017g08 : ----- : -
nf031h03 : ----- : -
nf084d0 : ----- : -
tc87605 : ----- : -
nf106g10 : ----- : -
nf115a05 : ----- : -
t113580e : ----- : -
nf059h03 : ----- : -
nf084h07 : ----- : -
nf087a02 : ----- : -
tc82717 : ----- : -
nf015a04 : ----- : -
tc83357 : ----- : -
EST641821 : -----LLSL : 7
tc89186 : -----LLSL : 7
tc80224 : ----- : -

```

```

600      *      620      *      640      *      660
A_thaliana_b`-COP : IEYKTLVMRGDLDRANQILPTIPKEQHNNVAHFLESRGMIEDALEIATDPDYKFDLAIQLGRLEIAKEIAEEVQ : 659
nf009e04 : ----- : -
nf009h04 : ----- : -
nf017g08 : ----- : -
nf031h03 : ----- : -
nf084d0 : ----- : -
tc87605 : ----- : -
nf106g10 : ----- : -
nf115a05 : ----- : -
t113580e : ----- : -
nf059h03 : ----- : -
nf084h07 : ----- : -
nf087a02 : ----- : -
tc82717 : ----- : -
nf015a04 : ----- : -
tc83357 : ----- : -
EST641821 : IEYKTLVMRGDLESANEVLPSIPKEHHNSVARFLESRGMIEDALEVATDPDYRFDLAIQLGRLEVAKGIAIEVQ : 81
tc89186 : IEYKTLVMRGDLESANEVLPSIPKEHHNSVARFLESRGMIEDALEVATDPDYRFDLAIQLGRLEVAKGIAIEVQ : 81
tc80224 : ----- : -

```

```

*           680           *           700           *           720           *           740
A_thaliana_b`-COP : SESKWKQLGELAMSSGKQLQAEDCMKYAMDLSGLLLLYSSLGDAEGVSKLACLALAKEQGKNNVAFCLFRTLGRLE : 733
nf009e04          : ----- : -
nf009h04          : ----- : -
nf017g08          : ----- : -
nf031h03          : ----- : -
nf084d0           : ----- : -
tc87605           : ----- : -
nf106g10          : ----- : -
nf115a05          : ----- : -
t113580e         : ----- : -
nf059h03          : ----- : -
nf084h07          : ----- : -
nf087a02          : ----- : -
tc82717           : ----- : -
nf015a04          : ----- : -
tc83357           : ----- : -
EST641821        : SESKWKQLGELAMSSGKQLMAEECLNHAMDLSGLLLLYSSFGDAEGISKLATLAKEQGKNNVAFCLFMLGKLE : 155
tc89186           : SESKWKQLGELAMSSGKQLMAEECLNHAMDLSGLLLLYSSFGDAEGISKLATLAKEQGKNNVAFCLFMLGKLE : 155
tc80224           : ----- : -

```

```

*           760           *           780           *           800           *
A_thaliana_b`-COP : DCLQLLVESNRIPEAALMARSYLPKSVSEIVALWRDLKVNPKAAESLADPEEYSNLFEDWQVALSVEANTAE : 807
nf009e04          : ----- : -
nf009h04          : ----- : -
nf017g08          : ----- : -
nf031h03          : ----- : -
nf084d0           : ----- : -
tc87605           : ----- : -
nf106g10          : ----- : -
nf115a05          : ----- : -
t113580e         : ----- : -
nf059h03          : ----- : -
nf084h07          : ----- : -
nf087a02          : ----- : -
tc82717           : ----- : -
nf015a04          : ----- : -
tc83357           : ----- : -
EST641821        : DCLQLLIESNRIPEAALMARSYLPKSVPEIVAIVWRKDLNKVNPKAAESLADPEEYPNLFEDWQVALAVESKAAE : 229
tc89186           : DCLQLLIESNRIPEAALMARSYLPKSVPEIVAIVWRKDLNKVNPKAAESLADPEEYPNLFEDWQVALAVESKAAE : 229
tc80224           : -----VESNRIPEAALMARSYLPKSVSEIVAIVWRKDLKVNPKAAESLADPEEYPNLFDDWQVALAVESKAAE : 69

```

```

           820           *           840           *           860           *           880
A_thaliana_b`-COP : TRGVYTAENYPSHADKPSITLVEAFRNLQVE-AEESLENGNIDHEVAEENG-----HVNEGDE-----E : 867
nf009e04          : ----- : -
nf009h04          : ----- : -
nf017g08          : ----- : -
nf031h03          : ----- : -
nf084d0           : ----- : -
tc87605           : ----- : -
nf106g10          : ----- : -
nf115a05          : ----- : -
t113580e         : ----- : -
nf059h03          : ----- : -
nf084h07          : ----- : -
nf087a02          : ----- : -
tc82717           : ----- : -
nf015a04          : ----- : -
tc83357           : ----- : -
EST641821        : TRNVYPPAEQYIHHADKSHVTLVEAFRN----- : 257
tc89186           : TRNVYPPAEQYINHADKSHVTLVEAFRNMQIEE-EEPLENGDSNHELTEQN-EEHYTE-----EEHYTTEEQ- : 293
tc80224           : TRGVYHPAEQYINHAGKSHVTLVDAFRNMQIEEGDQPLENGDSNHELTEHNGEEDYTEGHEEQNGEEDYTEEQE : 143

```

```

          *          900          *          920          *
A_thaliana_b`-COP : EQQEEEVNEEEGVV-DADSTDGAVLVNGSEGEEEWGTNNKGNPSA : 911
nf009e04          : ----- : -
nf009h04          : ----- : -
nf017g08          : ----- : -
nf031h03          : ----- : -
nf084d0           : ----- : -
tc87605           : ----- : -
nf106g10          : ----- : -
nf115a05          : ----- : -
t113580e         : ----- : -
nf059h03         : ----- : -
nf084h07         : ----- : -
nf087a02         : ----- : -
tc82717          : -----S : 168
nf015a04         : ----- : -
tc83357          : -----R- : 111
EST641821        : -----M : 258
tc89186          : --NGEEGSQEEAVVDAESTDGAVLVNGNEADEEWVLAPH-H-- : 332
tc80224          : EQNGEEGSQDDAVVVDADSSDGTVLINGNEADEELSTNKEGS--V : 186
```

δ -COP

```

A. thaliana_d-COP : MVVLAASIVVKS*GKVLVSRH*VVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*VGMGKQHTYIETE*NVRYVY*QPIH*ALFLLLV*TKQS : 74
tc86025.pro : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 74
tc86026.pro : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETE*NIRYVY*QPIBALYLLLV*TNKQS : 74
EST642185 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 74
EST646329 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 74
nf001e07 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETE*NIRYVY*QPIBALYLLLV*TNKQS : 74
nf032b04 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 74
nf043h08 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETE*NIRYVY*QPIBALYLLLV*TNKQS : 74
nf089a05 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 74
nf102c06 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 74
nf102h06 : MVVLAASIVGKSGKVLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETE*NIRYVY*QPIBALYLLLV*TNKQS : 74
MtBA08E03R1 : -----VLVSRQFVDM*SRIRIEGLLA*AFP*KL*IGTGKQHTYIETD*NVRYVY*HPIBS*SLYLLLV*TNKQS : 60
be325979 : -----HYFKFWTH*LR*LLAA*FP*KL*IGTGKQHTYIETE*NVRYVY*QPI-----MLLV*TNKQS : 49
tc86028.pro : ----- : -
mvvlaa iv ksgkv vsrq vdm*sririeg*llaaf*pkl*gtgkqhtyiet n ryvy pie l llvt*nkqs

```

```

A. thaliana_d-COP : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*SLGHKE*SVTVAQVKQYCEMESHEEK*LHKL*VM : 148
tc86025.pro : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
tc86026.pro : NIMDDLTLRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*SLGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
EST642185 : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
EST646329 : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
nf001e07 : NIMDDLTLRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*SLGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
nf032b04 : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
nf043h08 : NIMDDLTLRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*SLGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
nf089a05 : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
nf102c06 : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
nf102h06 : NIMDDLTLRLLSKLVPEYS*SLDEEG*IC*KHAFELIFAFDEVI*SLGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 148
MtBA08E03R1 : NILEDLT*LRLLSKLVPEYS*SLDEE*SE*CKHAFELIFAFDEVI*ALGHKENVTVAQVKQYCEMESHEEK*LKYL*VQ : 134
be325979 : NILEDLTLRLLSKL----- : 64
tc86028.pro : ----- : -
ni dldtlrllsklvpeys*sldeeg*ic hafelifafdevi lghkenvtvaqvkqy*cemesh*ee*klyklvq

```

```

A. thaliana_d-COP : QSKIND*TKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*P--GGFSSMGSMG*SGRLES*GFNELS*ISSGGGGY*GSGSGFGMIS*-DV : 219
tc86025.pro : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGGF*G*SFDVNG----- : 188
tc86026.pro : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GDKGGF*G*PLTSMG*SGRIENS*FS*DMSIS*STGTG*-FGSGSGFG*-SSTDV : 220
EST642185 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGGF*WSLTSMG*SGRIEIA----- : 195
EST646329 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGGF*G*PLTSMG*SGRIENS*FS*DMSIS*SSGTG*-FGSVSGFGLTT*TDI : 221
nf001e07 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*XGDK----- : 178
nf032b04 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGG----- : 179
nf043h08 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GDKGGF*G*PLTSMG*SGRIENS*FS*DM----- : 199
nf089a05 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGGF*G*PLTSMG*S----- : 189
nf102c06 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGGF*G*PLTSMG*SGRIE----- : 193
nf102h06 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR----- : 175
MtBA08E03R1 : QSKVNETKDLMKRKASE*IDKSKIEK*NR*GEKGG----- : 166
be325979 : ----- : -
tc86028.pro : ----- : -
qsk netkd mkrkaseidk*skiekn

```

```

A. thaliana_d-COP : DPINTKPKDRSRSSVTAPPKSSGMKLGKSGK*-NQLMESLKAEGEDVIEDVKPT*-GQSKAAAPPTDPF*TLTVEE : 291
tc86025.pro : ----- : -
tc86026.pro : DSFSTKPKGRPTASATGPPKGLGMKLGK*SQKT*NQFLES*LKAEGEVILEVDQPKLGP*SRSAAPPL*DPITL*TVEE : 294
EST642185 : ----- : -
EST646329 : DSFSTKPKGRPTASANAPPKGLGMKLGK*SQKT*NQFLES*LKAEGEVILEVVQPKLGP*SRSAAPPL*DPITL*TVEE : 295
nf001e07 : ----- : -
nf032b04 : ----- : -
nf043h08 : ----- : -
nf089a05 : ----- : -
nf102c06 : ----- : -
nf102h06 : ----- : -
MtBA08E03R1 : ----- : -
be325979 : ----- : -
tc86028.pro : ----- : -

```

```

          300          *          320          *          340          *          360          *
A._thaliana_d-COP : KLNVALRRDGGGLSSFDMQGTLSLQILNQEDGFVQVQIATGENPEILFKTHPNINRDMFNENILGLKRPDQPPF : 365
tc86025.pro       : ----- : -
tc86026.pro       : KLNVTLKRDDGGLSNSDVQGTLSLQILN----- : 321
EST642185        : S----- : 196
EST646329        : K----- : 296
nf001e07         : ----- : -
nf032b04         : ----- : -
nf043h08         : ----- : -
nf089a05         : ----- : -
nf102c06         : ----- : -
nf102h06         : ----- : -
MtBA08E03R1     : ----- : -
be325979        : ----- : -
tc86028.pro      : -----QVQVQTGDNQAVSFKTHPNMNKELFANEYILGLKDPNRPFP : 41

```

```

          380          *          400          *          420          *          440
A._thaliana_d-COP : TGQGGD--GVGLLRWRMQRADESMVPLTINCWPSVSGNETYVSLEYEASSMFDLTNVIISVPLPALREAPSVRQ : 437
tc86025.pro       : ----- : -
tc86026.pro       : ----- : -
EST642185        : ----- : -
EST646329        : ----- : -
nf001e07         : ----- : -
nf032b04         : ----- : -
nf043h08         : ----- : -
nf089a05         : ----- : -
nf102c06         : ----- : -
nf102h06         : ----- : -
MtBA08E03R1     : ----- : -
be325979        : ----- : -
tc86028.pro      : TGQASDAGGVGLLKWRMQSTDESMVPLTINCWPSVSGNETYVNIEYEASSMFDLRNVVVISVPLPALREAPSVSQ : 115

```

```

          *          460          *          480          *          500          *          5
A._thaliana_d-COP : CDGEWRYDPRNSVLEWSILLIDNSNRSGSMEFVVPVVDSSVFFPISVQFAATSTYSGLKVTGMIPLRGGGGATP : 511
tc86025.pro       : ----- : -
tc86026.pro       : ----- : -
EST642185        : ----- : -
EST646329        : ----- : -
nf001e07         : ----- : -
nf032b04         : ----- : -
nf043h08         : ----- : -
nf089a05         : ----- : -
nf102c06         : ----- : -
nf102h06         : ----- : -
MtBA08E03R1     : ----- : -
be325979        : ----- : -
tc86028.pro      : IDGEWRYDSRNSILEWSVLLIDNSNRSGSLEFVVPQVDASAFFPISVRFMATDTFSDLKVMNIIPVKGGN--PP : 187

```

```

          20          *
A._thaliana_d-COP : RFVQRTHLIAQNY---QVI- : 527
tc86025.pro       : ----- : -
tc86026.pro       : ----- : -
EST642185        : ----- : -
EST646329        : ----- : -
nf001e07         : ----- : -
nf032b04         : ----- : -
nf043h08         : ----- : -
nf089a05         : ----- : -
nf102c06         : ----- : -
nf102h06         : ----- : -
MtBA08E03R1     : ----- : -
be325979        : ----- : -
tc86028.pro      : KYAQRQLLTENYQVV--QV : 205

```


ε-COP

```

*          20          *          40          *          60          *
A._thalina_e-COP : MSAMGAGPDHFLNLRNNFYLGA YQTAINNSEIANLSPENAVERDCLVFRSYIALGSYQLVISEIDESAA TPL : 72
TC77793          : M----ATPDHFLNLRNNFYLGA YQAAINSSEVSNLSPDDIIERDTLVFRCYISLGQLQFVISEINDSAPTPL : 68
M._truncatula_EST_5 : QWA---TPDHLFNLNRNNFYLGA YQAAINSSEVSNLSPDDIIERDTLVFRCYISLGQLQFVISEINDSAPTPL : 69
EST429635        : -----GLGQLQFVISEINDSAPTPL : 20
MtBB56B02R1      : ----- : -
MtBC16A11F1      : ----- : -
M._truncatula_EST_6 : ----- : -
NF020B11         : ----- : -

*          80          *          100         *          120         *          140
A._thalina_e-COP : QAVKLLAMYLSTPQNKESTISSLKEWLADSTIGNNDTLRLIAGIIFMHEEDYNETLKHTHAGGTMDLYALNV : 144
TC77793          : QAVKLLALYFSSPDSKESAIASIKEWLADPAIGNNATLRLVAGIIFLHEQDFNEALKYTNAGGTME LTALNV : 140
M._truncatula_EST_5 : QAVKLLALYFSSPDSKESAIASIKEWLADPAIGNNATLRLVAGIIFLHEQDFNEALKYTNAGGTME LTALNV : 141
EST429635        : QAVKLLALYFSSPDSKESAIASIKEWLADPAIGNNATLRLVAGIIFLHEQDFNEALKYTNAGGTME LTALNV : 92
MtBB56B02R1      : ----- : -
MtBC16A11F1      : ----- : -
M._truncatula_EST_6 : ----- : -
NF020B11         : ----- : -

*          160         *          180         *          200         *
A._thalina_e-COP : QIFIKMHRAEYAERQLRVMQQIDEDHTLTQLASAWLNLAVGGSKIQAHLIFEDFSEKVPMTCLILNGKAVC : 216
TC77793          : QIFIKMHRSDYAERQLRIMQQIDEDHTLTQLANAWLNLAVGGAKIQEAHLIFQDLSERYQSTSLLLNGKAVC : 212
M._truncatula_EST_5 : QIFIKMHRSDYAERQLRIMQQIDEDHTLTQLANAWLNLAVGGAKIQEAHLIFQDLSERYQSTSLLLNGKAVC : 213
EST429635        : QIFIKMHRSDYAERQLRIMQQIDEDHTLTQLANAWLNLAVGGAKIQEAHLIFQDLSERYQSTSLLLNGKAVC : 164
MtBB56B02R1      : -----ANAWLNLAVGGAKIQEAHLIFQDLSERYQSTSLLLNGKAVC : 41
MtBC16A11F1      : -----AHLIFQDLSERYQSTSLLLNGKAVC : 25
M._truncatula_EST_6 : ----- : -
NF020B11         : ----- : -
                                     a l i f d s e y t l n g k a v c

*          220         *          240         *          260         *          280
A._thalina_e-COP : CMQMGNFDEAETLLLEALNKDAKDPETLANLVVCSLHV GKS S S R H L S Q L K L S H P E H I L V K R V S A E D N F E R A : 288
TC77793          : CMQMGNFDEAETLLVEALNKDARDPETLANLVVCC L H L G K P S S K S F S Q L K L S H P D H V L V K R V S A A E E S F D R A : 284
M._truncatula_EST_5 : CMQMGNSDEAETLLVEALNKDAR----- : 236
EST429635        : CMQMGNFDEAETLLVEALNKDARDPETLANLVVCC L H L G ----- : 203
MtBB56B02R1      : CMQMGNFDEAETLLVEALNKDARDPETLANLVVCC L H L G K P S S K S F S Q L K L S H P D H V L V K R V S A A E E S F D R A : 113
MtBC16A11F1      : CMQMGNFDEAETLLVEALNKDARDPETLANLVVCC L H L G K P S S K S F S Q L K L S H P D H V L V K R V S A A E E S F D R A : 97
M._truncatula_EST_6 : -----FDEAETLLVEALNKDARDPETLANLVVCC L H L G K P S S K S F S Q L K L S H P D H V L V K R V S A A E E S F D R A : 66
NF020B11         : -----LHLGK P S S K S F S Q L K L S H P D H V L V K R V S A A E E S F D R A : 37
cmqmgnfdeaetll ealnkd dpetlanlvvc lh g k s s s q l k l s h p h l v k r v s a e f r a

*
A._thalina_e-COP : VC-LVA : 293
TC77793          : LQSA S- : 289
M._truncatula_EST_5 : ----- : -
EST429635        : ----- : -
MtBB56B02R1      : LQSA S- : 118
MtBC16A11F1      : LQSA S- : 102
M._truncatula_EST_6 : LQSA S- : 71
NF020B11         : LQSA S- : 42
q

```

γ -COP

```

                *           20           *           40           *           60           *
A_thaliana_g-COP : MAQPLVKKDDDDHDELEYS PFMGIEKGAVLQEARVFNDPQVDP RRCSQVITKLLYLLNQGESFTKVEATEVF : 72
aw691305          : MAQPLIKKDDDRDDEDNYS PFLGIEKGAVLQEARVFNDPQLDARRCSQVITKLLYLLNQGETFTKVEATEVF : 72
EST506679        : -----KDDDRDDEAEYS PFMGIEKGAVLQEARVFNDPQLDARRCSQVITKLLYLLNQGETFTKTEATEVF : 65
tc84216          : -----VLQEARVFNDPQLDARRCSQVITKLLYLLNQGETFTKTEATEVF : 44
nf029c08         : ----- : -
aw690179         : ----- : -
tc77875          : M----- : 1
tc77876          : ----- : -

```

```

                80           *           100           *           120           *           140
A_thaliana_g-COP : FSVTKLFQSKDTGLRRMVYLI IKELSPSSDEVIIVTSSLMKDMNSKIDMYRANAIRVLCRIIDGTLTQIER : 144
aw691305          : FSVTKLFQSRDLGLRRMVYLI IKEL----- : 97
EST506679        : FAVTKLFQSKDMGLRRMVYLMIKEI SPSEDEVIIVTSSLMKDMNSKIDMYRANAIRVLCRITDGTLLAQIER : 137
tc84216          : FAVTKLFQSKDMGLRRMVYLMIKEI SPSEDEVIIVTSSLMKDMNSKIDMYRANAIRVLCRITDGTLLAQIER : 116
nf029c08         : ----- : -
aw690179         : ----- : -
tc77875          : ----- : -
tc77876          : ----- : -

```

```

                *           160           *           180           *           200           *
A_thaliana_g-COP : YLKQAIVDKNP VVSSAALVSGLHLLKTNPEIVKRWSNEVQEGIQSRSALVQFHALALH QIRQNDRLAVSKL : 216
aw691305          : ----- : -
EST506679        : YLKQAIVDKNPIVASAALVSGIHL LQTNPEIVKRWSNEVQESVQSRAAFVQFHALGLLH QIRQNDRLAVSKL : 209
tc84216          : YLKQAIVDKNPIVASAALVSGIHL LQTNPEIVKRWSNEVQESVQSRAAF----- : 165
nf029c08         : ----- : -
aw690179         : ----- : -
tc77875          : ----- : -
tc77876          : ----- : -

```

```

                220           *           240           *           260           *           280
A_thaliana_g-COP : VGSLTRGVSRSFLAQCLLIQRPFYEFLESCLRHKSEMVI EAAKAITDLNGVTSRELT PAITVLQFLFLSSPR : 288
aw691305          : ----- : -
EST506679        : VSSLQGGAVRSFLAQCLLIK----- : 229
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : -----ERPFYDFLESCLRHKSEMVI EAAKAITDLNGVTSRELT PAITVLQFLFLSSSK : 53
aw690179         : -----RPFYDFLESCLRHKSEMVI EAAKAITDLNGVTSRELT PAITVLQFLFLSSSK : 52
tc77875          : ----- : -
tc77876          : ----- : -

```

```

                *           300           *           320           *           340           *           360
A_thaliana_g-COP : PVLRF AAVRTL NQVAMTHPMAVTN CNIDMESLISDQNRSIATLAI TLLKGTGNESSVDR LMKQITNFMSDIA : 360
aw691305          : -----MAQPL----- : 102
EST506679        : -----DDDRD----- : 234
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : PVLRF AAVRTL NQVAMTHPMAVTN CNIDMESLISDQNRSIATLAI TLLKGTGNESSVDR LMKQITNFMSDIA : 125
aw690179         : PVLRF AAVRTL NQVAMTHPMAVTN CNIDMESLISDQNRSIATLAI TLLKGTGNESSVDR LMKQITNFMSDIA : 124
tc77875          : ----- : -
tc77876          : ----- : -

```

```

                *           380           *           400           *           420           *
A_thaliana_g-COP : DEFKIVVDAIRSLCVKFP LKXRS LMTFSLNLR EEGGF EYKRAIVDSIVTII RDI PDAKESGLLHLCEFIE : 432
aw691305          : ----- : -
EST506679        : -----D----- : 235
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : DEFKIVVVEAIRSLCLKFP LKXRS LMXLSN LXEERPF----- : 164
aw690179         : DEFKIVVVEAIRSLCLKFP LKXRS LMXLSNI -LXERPF----- : 162
tc77875          : -----KAI VDSIVILIRDI PDAKESGLLHLCEFIE : 31
tc77876          : ----- : -

```

```

      440          *          460          *          480          *          500
A_thaliana_g-COP : DCEFTYLSTQILHFLGIEGPNSTSDPSKYIRYIYNRVHLENATVRAAAVSTLAKFGFMVESLKPRITVLLKRC : 504
aw691305          : ----- : -
EST506679        : EAEYIS-----PFMGIE----- : 246
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : ---YDFLES-----C : 171
aw690179         : ---YDFLES-----C : 169
tc77875          : DCEFTYLSTQILHFLGIEGPKTLDPSKYIRYIYNRVHLENATVRASAVSTLAKFGASVDGLKPRIFVLLRRC : 103
tc77876          : ----- : -

      *          520          *          540          *          560          *
A_thaliana_g-COP : IYDSDDEVDRATLYLSEPEEEAFDINSVPKEVKSQPLAEKKAQGKKTPTGLGAPPAAPASGFDGYERLLSSI : 576
aw691305          : ----- : -
EST506679        : -----KGAVLQEAR----- : 255
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : L-----RHKSEM----- : 178
aw690179         : L-----RHKSEM----- : 176
tc77875          : LFSDSDEVDRATLYL----- : 119
tc77876          : ----- : -

      580          *          600          *          620          *          640
A_thaliana_g-COP : PEFAAFGKLFKSSLPVELTEAETEYAVNVVKHIFDSHVVFQYNTNTIPEQLLERVLNI---EAEFSEVT : 644
aw691305          : ----- : -
EST506679        : ----- : -
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : -----VIF----- : 181
aw690179         : -----VIF----- : 179
tc77875          : -----NTMKAIVDSIVIL----- : 132
tc77876          : -----EYAVNVVKHIFDRHVVFQYNTNTIPEQLLEHVIVIVDNSEAEDEFSEAF : 49

      *          660          *          680          *          700          *          720
A_thaliana_g-COP : SKALNSLPYDSPGQAFVVFVEKPAVGPVAVGKFSNTLTFVVKVHVDPSTGEAEDDGVEDEYQLEDLEVVAGDY : 716
aw691305          : ----- : -
EST506679        : -----VFNDPQ----- : 261
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : ----- : -
aw690179         : ----- : -
tc77875          : -----IRDIP-----DAKESGL----- : 144
tc77876          : SKPLKSLPYDSPGQIFVAFVEKPEGVPTLGKFSNVLKFIVRE--VDPTTGEAEDDGVEDEYQLEDLEIVSADY : 119

      *          740          *          760          *          780          *
A_thaliana_g-COP : MVKVGVSNFRNAWESMDEEDERVDEYGLGQRESLGEAVKAVMDLLGMQTCEGTETIPLNARSHTCLLSGVYI : 788
aw691305          : -----IKKDDDR----- : 109
EST506679        : ----- : -
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : -----EAAKAITDLNGVTS----- : 195
aw690179         : -----EAAKAITDLNGVTS----- : 193
tc77875          : -----LHLCE----- : 149
tc77876          : TLKVGVSNFRNAWESMGPDFERVDEYGLGPRESLAEAVNTVINLLGLQPCEGTEVVPNSRSHTCLLSGVFI : 191

      800          *          820          *
A_thaliana_g-COP : GNVKVLVRAQFGMDSSKDIAMKLTVRAEDVSVAEAIHEIVASG- : 831
aw691305          : ----- : -
EST506679        : -----L : 262
tc84216          : ----- : -
nf029c08         : -----RELTPA-- : 201
aw690179         : -----RELTPAIT : 201
tc77875          : -----F : 150
tc77876          : GNIKVLVRLSFGLDGPVKDVAMKLTVRSEDETVSDAIHEIVASG- : 234

```

ζ-COP 1

```

      *           20           *           40           *           60           *
G_max_z-COP_1 : MASQGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNNAKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEVTLLENNIIIYKFVQ : 74
EST403005 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
EST457768 : MAFNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
EST668977 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
nf046f01 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
nf091g07 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
tc87228 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
nf023c07 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 74
aj548103 : MASNGLCPSIKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNI----- : 67
EST636606 : -----LLDSEGKRVAVKYYSDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 60
nf101a12 : -----SDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 46
EST5313217 : -----SDDWPTNSKLAFEKFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFVQ : 16
EST318062 : ----- : -
nf052b11 : X----- : 1
                                     sddwptn klafekfvftktvktnarteae tllenni ykfvq

      80           *           100           *           120           *           140
G_max_z-COP_1 : DLHFFVTGGEDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKREALENLDLILLCLDEIVDGGMILETNGPLIAEKVT : 148
EST403005 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 148
EST457768 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 148
EST668977 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 148
nf046f01 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALXNLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 148
nf091g07 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 148
tc87228 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 148
nf023c07 : DLHFF----- : 79
aj548103 : ----- : -
EST636606 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 134
nf101a12 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 120
EST5313217 : DLHFFVTGGDDENELILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 90
EST318062 : -----ILSVLQGFFDAVTLLLRSNVDKSEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 59
nf052b11 : -----ENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPLIAEKVT : 33
dlhff           il svlqgffdavtllllrsnvdk ealenldlillcldeivdgg iletngpliaekvt

      *           160           *           180
G_max_z-COP_1 : SHSLDADAPLSEQTLTQAWATAREHLTRTLLK- : 180
EST403005 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLL-T : 180
EST457768 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 180
EST668977 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 180
nf046f01 : SHNMDADAF----- : 157
nf091g07 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 180
tc87228 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 180
nf023c07 : ----- : -
aj548103 : ----- : -
EST636606 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 166
nf101a12 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 152
EST5313217 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 122
EST318062 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 91
nf052b11 : SHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFTRTLLT- : 65
shn dadaplseqtltqawatar trtll

```

ζ-COP 2

```

      *           20           *           40           *           60           *
G_max_z-COP_2 : MSH---ETCPSVKNVLLLDSDGKRVAVKYFSEDWPTNSAKENFEKVVFNKTQKTNARTEAEIMFFENNIVVYKFVQ : 73
tc79711 : MSPSKLELNPSVKNILLDSDGRRVAVKYFSEDWPTNSAKEAFEKLVFNKTQKTNARTEAEIMFFENNIVVYKFVQ : 76
MS E PSVKN6LLDSDG4RVA KYFS DWPTNSAKE FEK6VFNKTQKTNARTEAEI MFENNI66YKVFQ

      80           *           100           *           120           *           140
G_max_z-COP_2 : DLHFFVTGTGDYENELILATVLQAFFDSVGLLRGNVDKKEALENLDLILLCIDEIVDGGIILETNPNVIAGKVASN : 149
tc79711 : DLHFFVTGTSDENELILSSVLQAFFDSVGLLRGNVDKKEALENLDLILLCIDEIVDGGIILETNPNVIAGKVGSN : 152
DLHFFVTGT D ENELIL 3VLQAFFDSVGLLLRGNVDKKEALENLDLILLCIDEI6D GIILET PN IAGKV SN

      160           *           180
G_max_z-COP_2 : SIDSGAPLSEQTLSQALATAREHLARSLLK- : 179
tc79711 : SITSGAPLSEQTLSQALASAREHLARSLLK- : 182
S SGAPLSEQTLSQALA3AREHLARSLLK

```

Abb. 7.2. Multiple Alignments von translatierten EST-Sequenzen aus *Medicago truncatula* und Coatomerprotein-Untereinheiten aus *Arabidopsis thaliana* und *Glycine max*. Die Aminosäuresequenzen wurden mittels des Clustal V Algorithmus im Programm MegAlign™ miteinander verglichen und arrangiert.

7.3. Anhang 3

7.3.1. Die EST-Sequenz für Arf1 aus Erbse zeigte Homologien zu pflanzlichen Arf-Proteinen

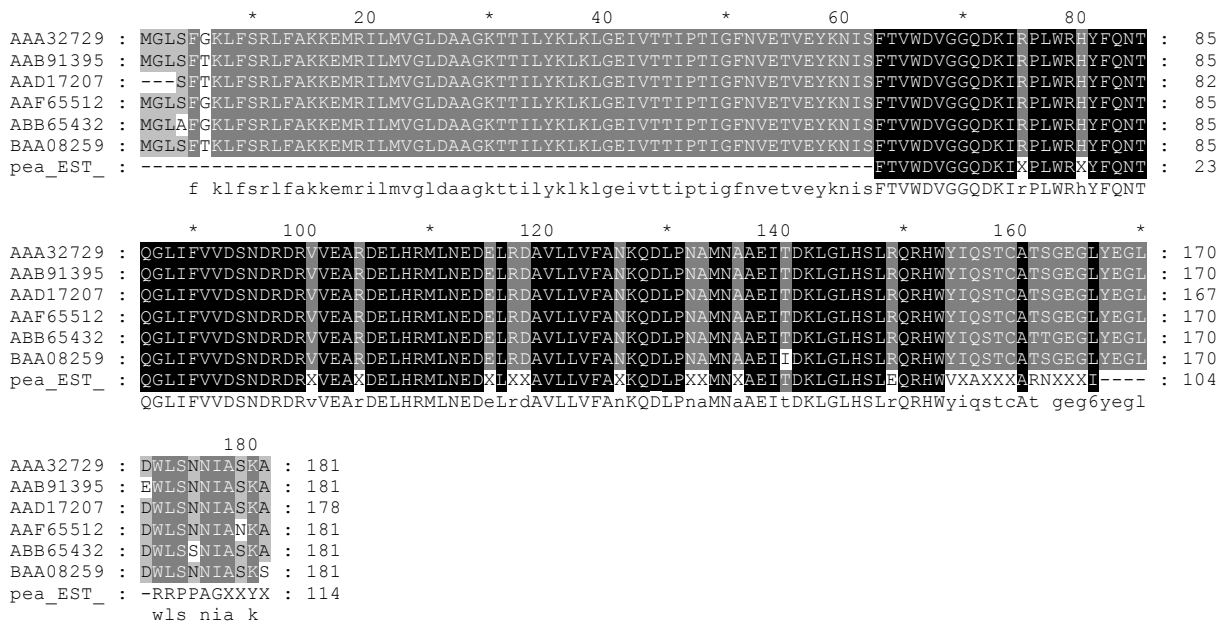
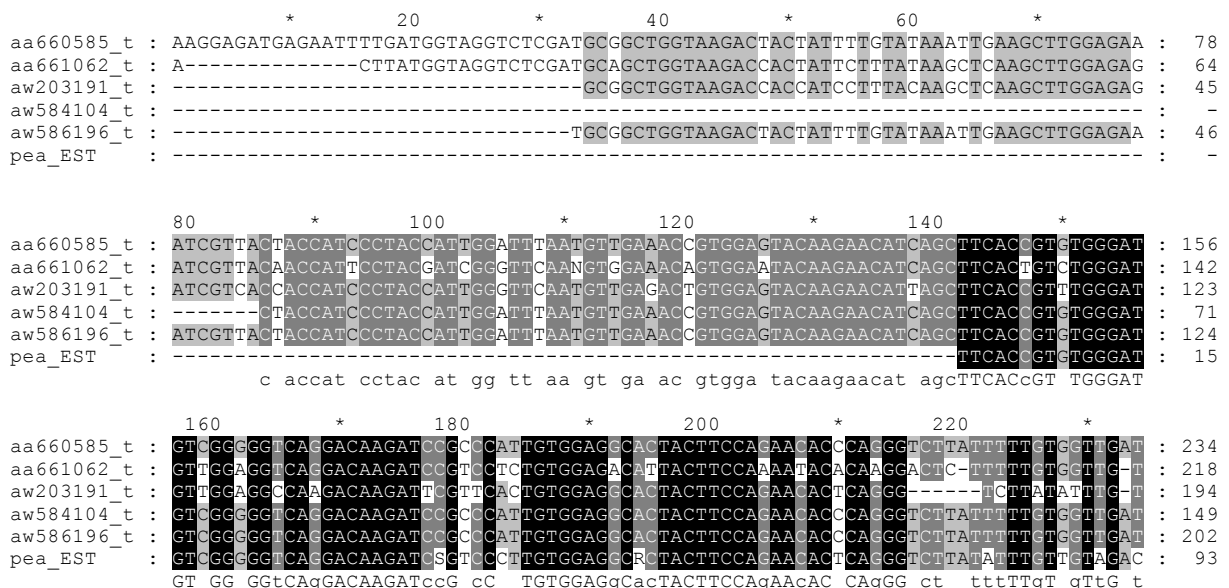


Abb. 7.3. Multiples Alignment zwischen der translatierten EST-Sequenz aus *Pisum sativum* (Erbse) und mittels Blast P-Analyse identifizierten Homologen aus verschiedenen Pflanzen. Die Sequenzen wurden mittels des Clustal V Algorithmus im Programm MegAlign™ miteinander verglichen und entsprechend angeordnet.

AAA32729 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) ADP-ribosylation factor, AAB91395 *Vigna unguiculata* (Wicke) ADP-ribosylation factor, AAD17207 *Glycine max* (Sojabohne) ADP-ribosylation factor, AAF65512 *Capsicum annuum* (Paprika) ADP-ribosylation factor, ABB65432 *Oryza sativa* (Reis) Arf1, BAA08259 *Daucus carota* (Karotte) ADP-ribosylation factor.

7.3.2. EST-Sequenzen aus *M. truncatula* mit Homologien zu MtArf1



```

          240          *          260          *          280          *          300          *
aa660585_t : AGCAATGATAGAGACCGGGTGGTTGAGGCAAGGATGAATTGCACAGGATGTTGAATGANGATGAACCTANAGATGCT : 312
aa661062_t : AGCA-IGACAGGACCGTGTCTTGAGGCTAGAN-TGAGCTGCACAGGATGTTGA----- : 271
aw203191_t : CGTA--GACAGCAA-----TCACAGGGATAGAG----- : 220
aw584104_t : AGCAATGATAGAGACCGGGTGGTTGAGGCAAGGATGAAGTGCACAGGATGTTGAATGAGGATGAACCTAGAGATGCT : 227
aw586196_t : AGCAATGATAGAGACCGGGTGGTTGAGGCAAGGATGAAGTGCACAGGATGTTGAATGAGGATGAACCTAGAGATGCT : 280
pea_EST   : AGCAATGACAGGATAGADTTCTTGAGGCCARAGATGAAGTACATAGAATGTTGAATGAGGA----- : 155
          aGcA tGA AG gA g t GttgaGGc Ag g tga t ca ag atgttga

          320          *          340          *          360          *          380          *
aa660585_t : GTTTTGCTTGTTTTTTGCCAACAACAAGATCTTCCAATGCAATGAATGCTGCAGAAATAACTGACAACTTGGACTT : 390
aa661062_t : -TTTT----- : 275
aw203191_t : ----- : -
aw584104_t : GTTTTGCTTGTTTTTTGCCAACAACAAGATCTTCCAATGCAATGAATGCTGCAGAAATAACTGACAACTTGGACTT : 305
aw586196_t : GTTTTGCTTGTTTTTTGCCAACAACAAGATCTTCCAATGCA----- : 322
pea_EST   : ----- : -

          400          *          420          *          440          *          460
aa660585_t : CATTCTCTCCGCCAACGCCACTGGGTATATTCAGANCACTTGTTCACTTCTGGAAAAGGTCTTTACGAAGGTTTGA : 468
aa661062_t : ----- : -
aw203191_t : ----- : -
aw584104_t : CATTCTCTCCGCCAACGCCACTGG-TATATTC-AGAGCACTTGTGCA-----AC----- : 352
aw586196_t : ----- : -
pea_EST   : ----- : -

          *          480
aa660585_t : CTGGCTTTCTTA : 480
aa661062_t : ----- : -
aw203191_t : ----- : -
aw584104_t : -----TTCTG : 357
aw586196_t : ----- : -
pea_EST   : ----- : -

```

Abb. 7.4. Multiples Alignment der EST-Sequenzen aus *M. truncatula* mit Homologien zum Arf1-Fragment aus *Pisum sativum* (Erbse). Die EST-Sequenzen wurden mittels Blast N-Analyse in entsprechenden *M. truncatula* EST-Datenbanken identifiziert und in dem Programm MegAlign™ mittels des Clustal V Algorithmus mit der Sequenz aus Erbse verglichen.

```

          *          20          *          40          *          60          *          80
aa660585 : KEMRILMVGGLDAAGKTTILYKLLKLGELVTTIPTIGENVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSND : 81
aa661062 : -----LMVGLDAAGKTTILYKLLKLGELVTTIPTIGENVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGL-FLWL--H : 73
aw203191 : -----AAGKTTILYKLLKLGELVTTIPTIGENVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVD--- : 67
aw584104 : -----TTIPTIGENVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSND : 52
aw586196 : -----AAGKTTILYKLLKLGELVTTIPTIGENVETVEYKNISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSND : 70
pea_EST   : -----FTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSND : 34
          tiptigf vetveyknisFTVWDVGGQDKIRpLWRhYFQNTQGLiF6vd

          *          100          *          120          *          140          *          160
aa660585 : RDRVVEARDELHRMLNDELXDAVLLVFANKQDLPNAMNAEITDKLGLHSLRQRHWVYSRXLVHFWRSLRRFRLAFL : 160
aa661062 : DRDRVVEAR-----XSTG-C-F----- : 89
aw203191 : -----SNDRD-----R----- : 73
aw584104 : RDRVVEARDELHRMLNEDELRDVLLVFANKQDLPNAMNAEITDKLGLHSLRQRHW-YIQSTC-----ATS : 118
aw586196 : RDRVVEARDELHRMLNEDELRDVLLVFANKQDLSNA----- : 107
pea_EST   : RDRVVEAXDELHRMLNE----- : 51
          v

```

Abb. 7.5. Multiples Alignment der translatierten EST-Sequenzen aus *M. truncatula* mit Homologien zum Arf1-Fragment aus *Pisum sativum* (Erbse). Die EST-Sequenzen wurden mittels Blast N-Analyse in entsprechenden *M. truncatula* EST-Datenbanken identifiziert, in die entsprechende Aminosäureabfolge übersetzt und in dem Programm MegAlign™ mittels des Clustal V Algorithmus mit der Sequenz aus Erbse verglichen.

7.3.4. Ergebnis der Multisequenzierung eines Abschnittes zwischen den G-Boxen 3 und 4 in MtArf1

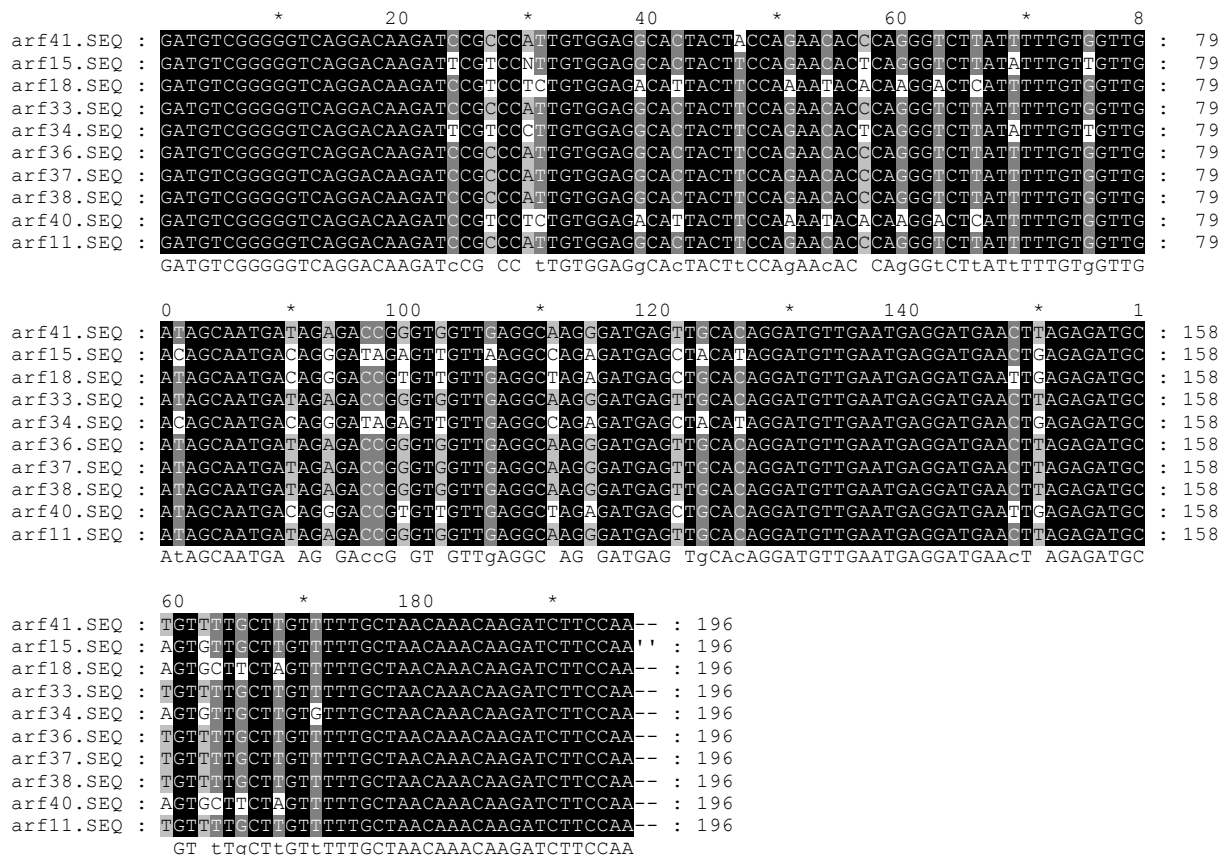


Abb. 7.6. Multiples Alignment von 10 Sequenzabschnitten zwischen den G-Boxen 3 und 4 von MtArf1, die mittels der Primer Arf up und Arf lo amplifizierten wurden. Die Sequenzen wurden mittels des Clustal V Algorithmus in dem Programm MegAlign™ miteinander verglichen.

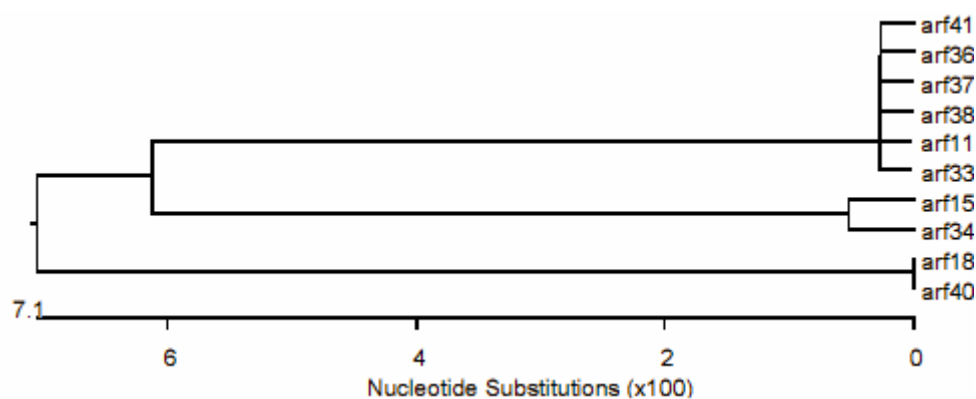


Abb. 7.7: Phylogenetischer Vergleich von Sequenzabschnitten aus MtArf1, die mittels der Primer Arf lo und Arf up amplifiziert wurden. Die Nukleotidsequenzen wurden in MegAlign™ nach dem Clustal V Algorithmus miteinander verglichen und die Verwandtschaft zwischen ihnen in Form von phylogenetischen Bäumen visualisiert. Die Skala gibt die Anzahl an Nukleotidaustauschen pro 100 bp an. Je kürzer der Abstand zwischen zwei Ästen, desto enger ist der Grad der Verwandtschaft zwischen den Sequenzen.

```

*           20           *           40           *           60
arf11.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf15.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 66
arf18.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf33.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf34.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf36.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf37.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf38.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf40.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
arf41.PRO : DVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR : 65
DVGGQDKIRPLWRHY5QNTQGLIFVVDNSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPR

```

Abb. 7.8. Multiples Alignment der 10 translatierten Sequenzabschnitte zwischen den G-Boxen 3 und 4 von MtArf1. Die Sequenzen wurden mittels des Clustal V Algorithmus in dem Programm MegAlign™ miteinander verglichen.

7.3.5. Ein multiples Alignment zeigt die hohe Verwandtschaft von MtArf1 zu Arf-Proteinen aus dem tierischen und pflanzlichen System.

```

*           20           *           40           *           60           *           80           *
M_truncat : MGLTFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAB62249_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAB91395_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAD17207_ : ---SFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 88
AAF65512_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAH31986_ : MGNIFANLKGKLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAM64892_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAO62348_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAO63779_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAO63780_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAP36057_ : MGNIFANLKGKLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAR03592_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
AAT08648_ : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
BAA13490_ : MGNIFANLKGKLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
BAA24696_ : MGLTFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
BAB41081_ : MGLTFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
CAD48129_ : MGLTFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
NP_071963 : MGNIFANLKGKLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
NP_788826 : MGNIFANLKGKLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
NP_911519 : MGLAFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
P36579_Sc : MGLSISKLSQSLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
P51643_Xe : MGNIFANLKGKLGKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
P51822_Da : MGLSFTKLSRLFAKKEMRILMVGLDAAKTTILYKLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFV : 91
mg f Lf LF k4EMRILMVGLDAAKTTILYkLLKGEIVTTIPTIGFNVETVEY nISFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQ66IFV

*           100          *           120          *           140          *           160          *           180
M_truncat : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAB62249_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAB91395_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAD17207_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 178
AAF65512_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAH31986_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAM64892_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAO62348_ : VDSNDRDRVVEARDELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAO63779_ : VDSNDRDRVGEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAO63780_ : VDSNDRDRVGEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAP36057_ : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAR03592_ : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
AAT08648_ : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
BAA13490_ : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
BAA24696_ : VDSNDRDRVGEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
BAB41081_ : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
CAD48129_ : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
NP_071963 : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
NP_788826 : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
NP_911519 : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
P36579_Sc : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
P51643_Xe : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
P51822_Da : VDSNDRDRVVEAREELHRMLNEDELDAVLLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLRORRHWYIQSTCATSGGLYEGLDWLSNNTASKA : 181
VDSNDR R6 EAr EL RML EDELDA6LLVFANKQDLPNAMNAAEIDKLGHLR R WYIQ TCAT3G GLYEGLDWLSn 6

```

Abb. 7.9. Multiples Alignment von MtArf1 mit anderen bekannten Arf-Proteinen auf Basis der Aminosäureabfolge. Homologe Arf-Proteine wurden mittels Blast P-Suche identifiziert und mittels des Clustal V Algorithmus in dem Programm MegAlign™ mit MtArf1 verglichen.

BAB41081 *Triticum aestivum* (Weizen) ADP-ribosylation factor, CAD48129 *Hordeum vulgare* (Gerste) ADP-ribosylation factor 1-like protein, AAB62249 *Catharanthus roseus* (Madagaskar-Immergrün) ADP-ribosylation factor 1, AAB91395 *Vigna unguiculata* (Wicke) ADP-ribosylation factor, AAD17207 *Glycine max* (Sojabohne)

ADP-ribosylation factor, AAT08648 *Hyacinthus orientalis* (Hyazinthe) ADP-ribosylation factor, P51822 *Daucus carota* (Karotte) ADP-ribosylation factor 1, AAF65512 *Capsicum annuum* (Paprika) ADP-ribosylation factor, AAR03592 *Brassica juncea* (Sareptasenf) ARF-like small GTPase, AAM64892 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) ADP-ribosylation factor 1, NP_911519 *Oryza sativa* (Reis) ADP-ribosylation factor 1, AAO63780 *Populus tremuloides* (Amerikanische Zitterpappel) ADP-ribosylation factor 2, BAA24696 *Salix bakko* (Japanische Weide) ADP-ribosylation factor, AAO63779 *Populus tremuloides* (Amerikanische Zitterpappel) ADP-ribosylation factor 1, AAH31886 *Mus musculus* (Hausmaus) ADP-ribosylation factor 1, AAP36057 *Homo sapiens* (Mensch) ADP-ribosylation factor 1, BAA13490 *Mus musculus* (Hausmaus) ARF1, NP_071963 *Rattus norvegicus* (Wanderratte) ADP-ribosylation factor 1, NP_788826 *Bos taurus* (Hausrind) ADP-ribosylation factor 1, P51643 *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) ADP-ribosylation factor 1, P36579 *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) ADP-ribosylation factor 1.

7.4. Anhang 4

7.4.1. Homologievergleiche der Proteine Mtc-COP, Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2

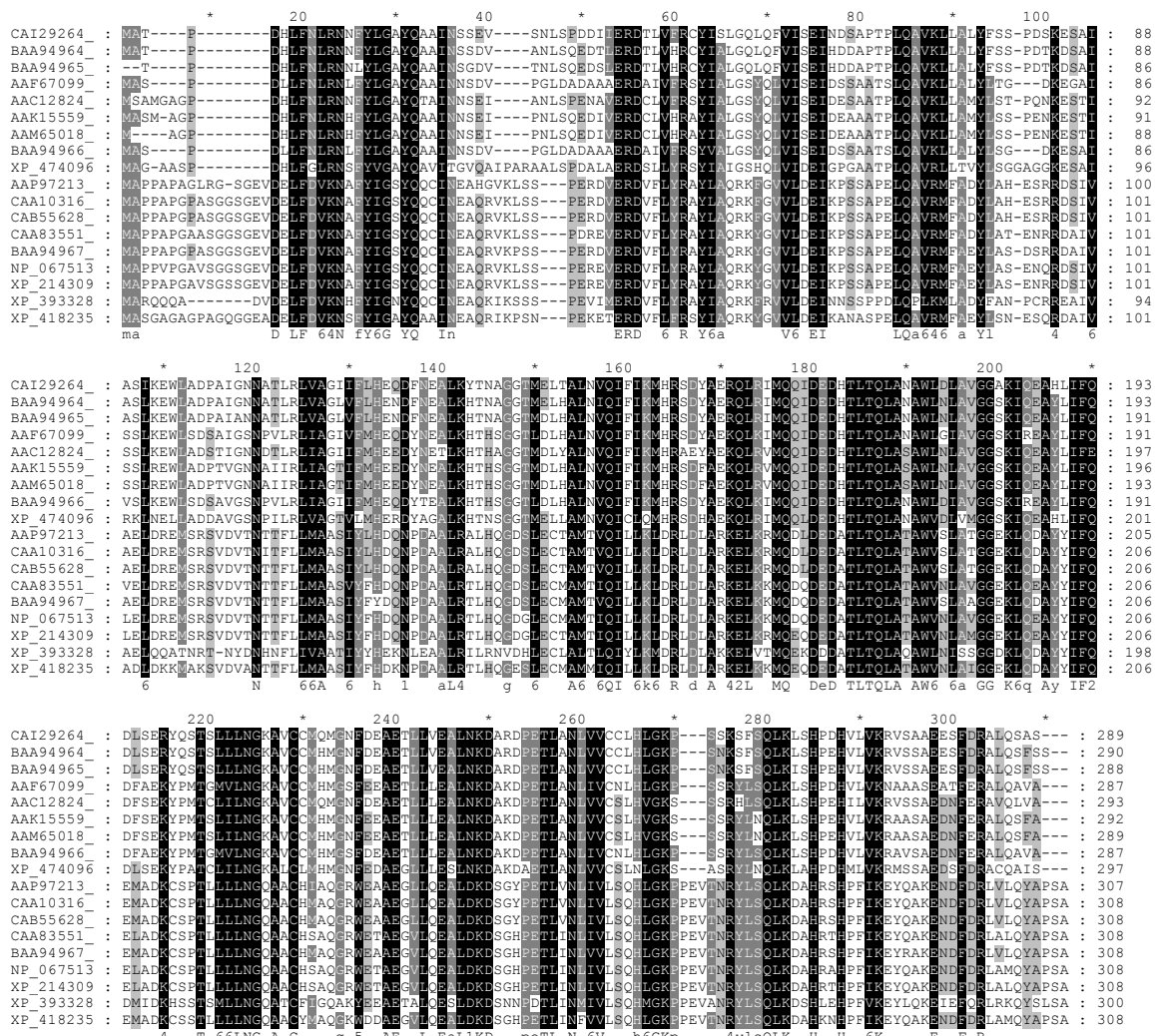


Abb. 7.10. Multiples Alignment von Mtc-COP mit anderen bekannten ϵ -Coatomer-Proteinen auf Basis der Aminosäureabfolge. Homologe ϵ -Coatomer-Proteine wurden mittels Blast P-Suche identifiziert und mittels des Clustal V Algorithmus in dem Programm MegAlign™ mit Mtc-COP verglichen.

CAI29264 *Medicago truncatula* epsilon-COP, BAA94964 *Glycine max* (Sojabohne) epsilon1-COP, BAA94965 *Glycine max* (Sojabohne) epsilon2-COP, AAK15559 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer

protein, epsilon subunit, AAM65018 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) coatomer-like protein, epsilon subunit, AAC12824 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer epsilon subunit, AAF67099 *Zea mays* (Mais) epsilon-COP, BAA94966 *Oryza sativa* (Reis) epsilon1-COP, XP_474096 *Oryza sativa* OSJNBa0033G05.19, CAA10316 *Homo sapiens* (Mensch) Epsilon COP, CAB55628 *Homo sapiens* (Mensch) epsilon-COP, AAP97213 *Homo sapiens* (Mensch) epsilon-COP, BAA94967 *Bos taurus* (Hausrind) epsilon1-COP, NP_067513 *Mus musculus* (Hausmaus) epsilon subunit of coatomer protein complex, XP_214309 *Rattus norvegicus* (Wanderratte) similar to nonclathrin coat protein epsilon-COP, CAA83551 *Cricetulus griseus* (chinesischer Streifenhamster) epsilon-COP, XP_418235 *Gallus gallus* (Huhn) similar to epsilon1-COP, XP_393328 *Apis mellifera* (Honigbiene) coatomer similar to epsilon subunit of coatomer protein complex isoform a; coatomer epsilon subunit.

```

      *           20           *           40           *           60           *
CAI29266_ : MASNGL-----CPS-----IKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTN : 35
CAI29267_ : MSPS--KLEL-----NPS-----VKNILLDSDGRRVAAKYFSDDWPTN : 37
BAA92779_ : MASQGL-----CPS-----IKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTN : 35
BAA93004_ : MSH---ET-----CPS-----VKNVLLDSDGKRVAVKYFSEDWPTN : 34
BAA92781_ : MAGFLLNYDS-----CPV-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTN : 39
BAA92782_ : MA-FPLHYGS-----CPV-----VKNILLDSEGKRVAVKYCDWPTY : 38
AAL69490_ : MAG---TNDS-----CPL-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWATN : 36
AAM62512_ : MAG---TNDS-----CPL-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWTTN : 36
AAN12967_ : MAG---TNDS-----CPL-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWATN : 36
AAO22718_ : MS---PDS-----CPL-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTN : 34
BAA92778_ : MSGFHGTHDS-----CPL-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTH : 39
BAA92780_ : -----LDSEGKRVAVKYFSDWSSN : 20
BAA93045_ : MADF--SKES-----CPS-----VKNILLDSEGKRVAVKYFSDWPTN : 37
BAA93046_ : M-----ET-----CPS-----VKNILLDSEGKRVAVKYYSDDWPTL : 32
XP_465257_ : MGEF--SKES-----CPS-----VKNILLDSEGKRVAVKYFSDWSSN : 37
XP_475371_ : M-----ES-----CPS-----VKNILLDSEGKRVAVKYTDWPTL : 32
AAH47988_ : -----HASASAGLRKMDAVLLDPSLYTVKAVLLDNDGERLFAKYDDETYPTV : 48
NP_057141_ : M-----EALILEPSLYTVKAILLDNDGDRLFAKYDDETYPSV : 38
NP_062791_ : M-----EALILEPSLYTVKAILLDNDGDRLFAKYDDETYPSV : 38
NP_571583_ : -----MDTLILEPSLYTVKAVLIMDNDGERLFAKYDDETYPTV : 38
NP_776707_ : M-----EALILQPSLYTVKAILLDNDGDRLFAKYDDETYPSV : 38
XP_235705_ : MVALGIWIQRRLRANQRRRLCDSTSAAATGKMEALILEPSLYTVKAILLDNDGDRLFAKYDDETYPSV : 70
m                                     k 1 6D G R6 KY5 d 5 3

```

```

      80           *           100           *           120           *           140
CAI29266_ : SSKLAFEKFFVFTKTVKTNARTEAEITLLENNIVVYKFAQDLHFFVTGGDDENELILSSVLQGFDAVITLL : 105
CAI29267_ : SAKEAFEKLVFNKTQKTNARTEAEITMFENNIIVYKFAQDLHFFVTGSDDENELILSSVLQAFFDSVGLL : 107
BAA92779_ : NAKLAFEKFFVFTKTVKTNARTEAEVTLLENNIIIVYKFAQDLHFFVTGGEDENELILASVLQGFDAVITLL : 105
BAA93004_ : SAKENFEKVVFNKTQKTNARTEAEIAMFENNIVLYKFAQDLHFFVTGGDYENELILATVQLQAFFDSVGLL : 104
BAA92781_ : NAKVAFEKSIFTKTQKTNARTEAEITMFENNIIVYKFAQDLHFFVTGGDDENELVLATVQLQGFDAVITLL : 109
BAA92782_ : SAKLAFEKSIFTKTQKTNARTEAEIAMFDSNIVVYKFAQDLHFFVTGGDDENELILATVQLQGFDAVITLL : 108
AAL69490_ : ASKLAFEKYVFSKTSKTNARTEAEITLLESNIIVYKFAQDLHFFVTGGGENENELVLSVLQGFDAVALL : 106
AAM62512_ : ASKLAFEKYVFSKTSKTNARTEAEITLLESNIIVYKFAQDLHFFVTGGGENENELVLSVLQGFDAVALL : 106
AAN12967_ : ASKLAFEKYVFSKTSKTNARTEAEITLLESNIIVYKFAQDLHFFVTGGGENENELVLSVLQGFDAVALL : 106
AAO22718_ : AAKLSEKIVFSKTSKTNARTEAEITLDSNIIVYKFAQDLHFFVTGGGENENELILASVLQGFDAVALL : 104
BAA92778_ : AAKLTFEKIVFSKTSKTNARTEAEITLFDGYIVYKFAQDLHFFVTGGGENENELVLSVLQGFDAVALL : 109
BAA92780_ : ASKLAFEKSVFTKTLKTNARSEAEITLFDGYIVYKFAQDLHFFVTAGDDENELIANVQLQGFSDSVGLL : 90
BAA93045_ : ASKLAYEKSVFTKTLKTNARTEAEITLFDGYIVYKFAQDLHFFVTAGDDENELILASVHLGFSDSVGLL : 107
BAA93046_ : SAKLAFEKSVFTKTQKANAGTEVEIVMFDGQIVYKFAQDLHFFVTGGEEENELILASVQLQGFSDAVERL : 102
XP_465257_ : ASKLAFEKSVFTKTLKTNARSEAEITLFDGYIVYKFAQDLHFFVTAGDDENELIANVQLQGFSDSVGLL : 107
XP_475371_ : SAKLAFEKSVFTKQKATAGAEAEIVMFDGHIIVYKFAQDLHFFVTGGEEENELILASVQLQGFDAVDII : 102
AAH47988_ : KEQKAFEKNI FNKTH---RTDSEIALLEGLTVVYKSSIDL YFYVIGSSHENELMLMVLNCLFDSLSQM : 114
NP_057141_ : KEQKAFEKNI FNKTH---RTDSEIALLEGLTVVYKSSIDL YFYVIGSSYENELMLMVLNCLFDSLSQM : 104
NP_062791_ : KEQKAFEKNI FNKTH---RTDSEIALLEGLTVVYKSSIDL YFYVIGSSYENELMLMVLNCLFDSLSQM : 104
NP_571583_ : KEQKAFEKNI FNKTH---RTDSEIALLEGLTVVYKSSIDL YFYVIGSSHENELMLMVLNCLFDSLSQM : 104
NP_776707_ : KEQKAFEKNI FNKTH---RTDSEIALLEGLTVVYKSSIDL YFYVIGSSYENELMLMVLNCLFDSLSQM : 104
XP_235705_ : KEQKAFEKNI FNKTH---RTDSEIALLEGLTVVYKSSIDL YFYVIGSSYENELMLMVLNCLFDSLSQM : 136
a5EK 6F KT r E6 6 66YK DL F5V g ENEL66 VL D 6 6

```

```

      *           160           *           180           *           200           *
CAI29266_ : LRSNVDRKEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETNGPIIAEKVTSHNMDADAPLSEQTLTQAWATARDTFT : 175
CAI29267_ : LRGNVDRKEALENLDLILLCLDEIIDAGIILETTPNTIAGKVGSNSTESGAPLSEQTLTQALASAREHHLA : 177
BAA92779_ : LRSNVDRKEALENLDLILLCLDEIVDGGMILETNGPIIAEKVTSHSLDADAPLSEQTLTQAWATAREHLT : 175
BAA93004_ : LRGNVDRKEALENLDLILLCLDEIVDGGIILETDPNVIAGKVASNSIDSGAPLSEQTLTQALATAREHHLA : 174
BAA92781_ : LRNVDRQREALENLDLILLCLDEIVDGGMILETDGNTIAGKVSSHNMDDGAPLSEQTLTQALATAREHLT : 179
BAA92782_ : LRSNVDRQREALENLDLILLCLDEIVDGGMILETDGNTIAGKVSSHNMDDGSPISEQTLTQALATAREHLT : 178
AAL69490_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGMVLETDPNVIAGKVAMQSAEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 176
AAM62512_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGMVLETDPNVIAGKVAMQSAEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 176
AAN12967_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGMVLETDPNVIAGKVAMQSAEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 176
AAO22718_ : LRSNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 174
BAA92778_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 179
BAA92780_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 179
BAA93045_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
BAA93046_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
XP_465257_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
XP_475371_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
AAH47988_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
NP_057141_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
NP_062791_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
NP_571583_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
NP_776707_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 177
XP_235705_ : LRNVDRKMEALENLDLIFLCLDEMVDQGVVLETDPNVIAGKVAMQSTEASGSLSEQTLTQALATAREHHLA : 204
L4 V k LEN6 6 L 6DE66D G66LE3 6 4V EQT6 q 1 A4e

```

Abb. 7.11. Multiples Alignment der Isoformen Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 mit entsprechenden pflanzlichen und tierischen Homologen auf Basis der Aminosäuresequenzen. Homologe ζ -Coatomer-Proteine wurden mittels Blast P-Suche identifiziert und mittels des Clustal V Algorithmus in dem Programm MegAlign™ mit Mt ζ -COP1 und Mt ζ -COP2 verglichen.

CAI29266 *Medicago truncatula* zeta-COP 1, BAA92779 *Glycine max* (Sojabohne) zeta1-COP, BAA92781 *Lycopersicon esculentum* (Petersilie) zeta1-COP, BAA92782 *Lycopersicon esculentum* (Petersilie) zeta2-COP, BAA93046 *Zea mays* (Mais) zeta1-COP, XP_475371 *Oryza sativa* (Reis) zeta1 subunit, AAL69490 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, AAN12967 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, AAM62512 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer protein, BAA92778 *Brassica rapa* (Raps) zeta1-COP, AAO22718 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) putative coatomer zeta subunit, BAA92780 *Oryza sativa* (Reis) zeta2-COP, XP_465257 *Oryza sativa* (Reis) zeta2-COP, BAA93045 *Zea mays* (Mais) zeta2-COP, CAI29267 *Medicago truncatula* zeta-COP 2, BAA93004 *Glycine max* (Sojabohne) zeta2-COP, NP_057141 *Homo sapiens* (Mensch) zeta 1, XP_235705 *Rattus norvegicus* (Wanderratte) zeta-1, NP_062791 *Mus musculus* (Hausmaus) zeta 1, NP_776707 *Bos taurus* (Hausrind) CGI-120 protein, AAH47988 *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) Copz1 protein, NP_571583 *Danio rerio* (Zebrafisch) zeta1-cop.

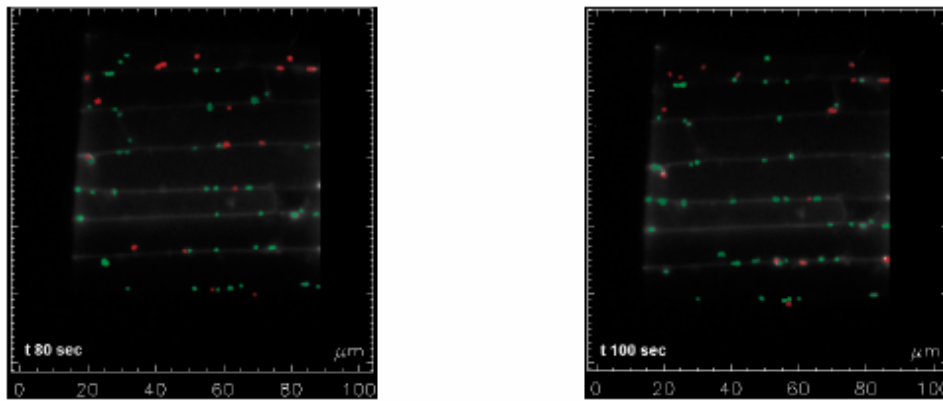


Abb. 7.12. Quantifizierung der Bewegung fluoreszenter Strukturen in *M. truncatula* Wurzelzellen transformiert mit den Konstrukten *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* oder *Mt ζ -COP2::GFP*.

In Intervallen von je 20 Sekunden wurden für die ersten Minute nach Start der Datenerfassung alle vorhandenen Partikel dahingehend überprüft, ob sie sich zum jeweiligen Zeitpunkt gerade in Bewegung befanden oder nicht. Bewegte Strukturen wurden rot gekennzeichnet, unbewegte hingegen grün. Für *Mt ζ -COP2::GFP* wurden zusätzlich noch zwei weitere Intervalle, 80 Sekunden und 100 Sekunden nach Beginn der Datenaufnahme ausgewertet.

	Zeit [sec]	Bewegte Strukturen (rot)	Unbewegte Strukturen (grün)	Bewegte Strukturen [%]	Unbewegte Strukturen [%]
MtArf1::GFP	1	25	40	38,46	61,53
	20	31	52	37,34	62,65
	40	36	54	40	60
	60	47	64	42,34	57,66
			Mittelwert	39,535	60,46
			Standardabweichung	2,164709372	2,159675902
Mtζ-COP1::GFP	1	30	46	39,47	60,52
	20	32	50	39,02	60,98
	40	30	48	38,46	61,54
	60	36	54	40	60
			Mittelwert	39,2375	60,76
			Standardabweichung	0,655050889	0,656251984
Mtζ-COP2::GFP	1	23	34	40,35	59,65
	20	23	35	39,65	60,34
	40	19	29	39,58	60,42
	60	26	39	40	60
			Mittelwert	39,895	60,1025
			Standardabweichung	0,354635964	0,352361084
	80	17	43	28,33	71,67
	100	15	44	25,42	74,57

Tab. 7.1. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Quantifizierung bewegter und nicht bewegter fluoreszenter Strukturen in Wurzelzellen, transformiert mit *MtArf1::GFP*, *Mt ζ -COP1::GFP* oder *Mt ζ -COP2::GFP*. Die Anzahl an bewegten und unbewegten Partikel zu den entsprechenden Zeitpunkten ist angegeben, ihr Anteil in Prozent, davon die Mittelwerte in Prozent und die Standardabweichungen.

7.5.1. Quantifizierung der Bewegung von fluoreszenten Strukturen nach Behandlung mit Nocodazol oder DMSO

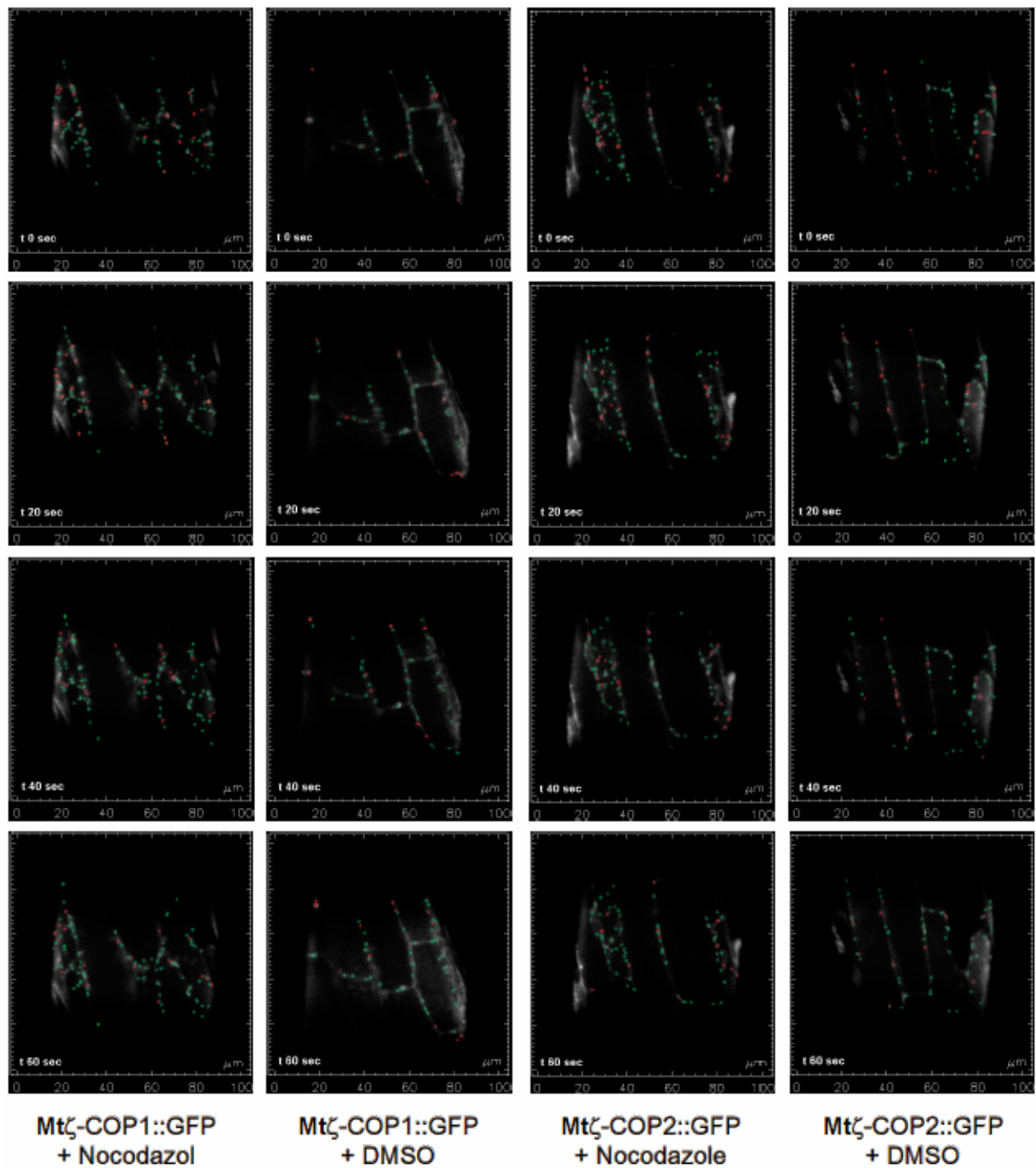


Abb. 7.12. Quantifizierung der Bewegung fluoreszenter Strukturen in *Mt ζ -COP1::GFP* oder *Mt ζ -COP2::GFP* transformierten Wurzelzellen *M. truncatula* Wurzelzellen, behandelt mit dem Inhibitor Nocodazol oder dem Lösungsmittel DMSO. In Intervallen von je 20 Sekunden wurden für die erste Minute nach Start der Datenerfassung alle bewegten und unbewegten Partikel erfasst. Bewegte Strukturen wurden rot gekennzeichnet, unbewegte hingegen grün.

	Zeit [sec]	bewegte Strukturen (rot)	unbewegte Strukturen (grün)	bewegte Strukturen [%]	unbewegte Strukturen [%]
Mtζ-COP2::GFP + Nocodazol	1	20	41	32,79	67,21
	20	19	48	28,36	71,64
	40	18	50	26,47	73,53
	60	13	54	19,4	80,6
Mtζ-COP1::GFP + DMSO	1	10	25	28,57	71,43
	20	10	33	23,26	76,74
	40	8	35	18,6	81,4
	60	11	38	22,45	77,55
Mtζ-COP2::GFP + DMSO	1	18	41	30,51	69,49
	20	16	43	27,11	72,88
	40	13	38	25,49	74,51
	60	10	43	18,87	81,13
Mtζ-COP1::GFP + Nocodazol	1	26	63	29,21	70,79
	20	24	64	27,27	72,73
	40	23	75	23,47	76,53
	60	18	72	20	80

Tab. 7.2. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Quantifizierung bewegter und nicht bewegter fluoreszenter Strukturen in *Mt ζ -COP1::GFP* oder *Mt ζ -COP2::GFP* transformierten Wurzelzellen, behandelt mit dem Inhibitor Nocodazol oder dem Lösungsmittel DMSO. Die Anzahl an bewegten und unbewegten Partikel zu den entsprechenden Zeitpunkten und ihr Anteil in Prozent sind angegeben.

8. Abkürzungen

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ABD	Aktin-Bindedomäne
Abs	Absorption
Acc.	Accession
AGP	Arabinogalactan-reiches Glykoprotein
Amp	Ampicillin
AP	Adaptor Primer
APS	Ammoniumpersulfat
Arf	ADP-ribosylation factor
Arl	Arf-like protein
Arp	Arf-related protein
ArQua1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> (Quandt <i>et al.</i> , 1993)
Asn	Asparagin
Asp	Aspariginsäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Å	Angström
BAC	bacterial artificial chromosome
BDM	2,3-Butandion Monoxim
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BFA	Brefeldin A
BSA	bovine serum albumine
bv.	biovar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CCV	Clathrin-coated Vesikel
CD	Compact Disc
cDNA	komplementäre DNA
CFP	cyan fluorescent protein
CHO	chinese hamster ovary cells
CLSM	konfokale Laserscanning-Mikroskopie
COP	Coatomerprotein
cv.	Kultivar
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	das heißt

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
E	Einstein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPS	Exopolysaccharid
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERD2	HDEL-Rezeptor
ERGIC	ER-Golgi-Intermediate-Compartment
EST	Expressed sequence tag
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.) und andere
etc.	<i>et cetera</i> (lat.) und weitere
Fa.	Firma
Fix	Fixierung
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm, Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	green fluorescent protein
GITC	Guanidinisothiocyanat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Glu	Glutaminsäure
Gm	Gentamycin
GSP	genspezifischer Primer
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	<i>hours</i> (engl.) Stunden
HE	Hefeelictor
HRGP	Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
HSP	heat shock protein (engl.) Hitzeschockprotein
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin

kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
Kat.	Katalog
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
LMW	Low molecular weight
Lsg.	Lösung
<i>M.</i>	<i>Medicago</i>
M	Mol
mA	Milliampère
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie
Man	Mannose
MCS	multiple cloning site
ml	Milliliter
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Skoog
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MWCO	molecular weight cut-off
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
min.	Minuten
NA	numerische Apertur
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMT	N-Myristoyltransferase
No.	<i>numero</i> (lat.) Nummer
NOD	Nodulation
NOS	Nopalin Synthase
NPT	Neomycinphosphotransferase
Nr.	Nummer
Ns	Nanosekunden
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
o.D.	optische Dichte
o/n	over night, über Nacht
ORF	open reading frame (engl.), offenes Leseraster
p.a.	<i>pro analysis</i> (gr.) zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Privatdozent
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
PLD	Phospholipase D
PPI	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
P.O.	Post office
POD	Peroxidase
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	random amplification of cDNA ends
Rif	Rifampicin
RLC	root length colonized
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minutes, Umdrehungszahl
RT	Raumtemperatur
®	registered Trademark (engl.), eingetragenes Warenzeichen
Sar	Secretion-associated and Ras-related
Sec	Sekunden
Ser	Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfate ($\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{SO}_3-\text{Na}^+$)
Sm	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Sm	Streptomycin
SNAP	Soluble NSF-attachment protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
SRP	Signalerkennungspartikel
STAR	Sar1-NH2-terminal activation recruitment motif
SSH	single-strand subtractive Hybridization
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TC	Tentative consensus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TIGR	The Institute for Genome Research
TOF	time of flight (engl.)

Tm	trademark (engl.), Warenzeichen
Tyr	Tyrosin
U	units, Enzymeinheiten
u.a.	unter anderem
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UV	ultraviolettes Licht
v	Volumenanteil
V	Volt
Vers.	Version
VT	Volumenteil
VTC	Vesicular Tubular Cluster
W	Tryptophan
w	Gewichtsanteil
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt HD Dr. Karsten Niehaus für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, für die großzügige finanzielle Unterstützung während des gesamten Zeitraums, das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit und der Veröffentlichung und unsere fruchtbaren Diskussionen, insbesondere zum Thema der Mykorrhiza-Symbiosen.

Dr. Thomas Patschkowski möchte ich für das zeitaufwändige Korrekturlesen dieser Arbeit und die Motivierung im Unifit danken.

Dr. Susanne Bolte (Paris) danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe während der Erstellung von Adaptor-ligierten cDNA-Banken aus *Medicago truncatula* und *Nicotiana tabacum*.

Dr. Dr. habil. Bettina Hause, die sich spontan als Zweitgutachterin zur Verfügung gestellt hat, sowie ihrem angetrauten Gatten Dr. Gerd Hause für die Mühe, die er sich mit der Einbettung von Wurzeln gemacht hat.

Prof. Phil Mullineaux (Essex) für die Betreuung während meines Aufenthalts am JIC in Norwich.

Dipl. Biol. Robert-André Roszik für seine Unterstützung bei der Erstellung einer gemeinsamen Homepage.

Dem Schäfchen für die eine lustige Zeit im Labor.

Des weiteren danke ich folgenden Personen für die Bereitstellung wichtiger Vektoren:

- Prof Chris Hawes (Oxford) für den Pflanzentransformationsvektors (ST-GFP), der gute Dienste zur Transformationskontrolle geleistet hat.
- Prof.in Dorethee Staiger für den Pflanzentransformationsvektors pBIN19, der in dieser Arbeit erfolgreich verwendet wurde.
- Dipl. Biol. Thorsten Seidel für einen Vektor mit p35S-GFP Expressionskassette.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Phytopathologie für die schöne Zeit und natürlich meiner Familie für die fortwährende Unterstützung und die selbstlose Überlassung einer Garage und eines Kühlschranks.

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur ganz oder annähernd entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation weder vollständig, noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den 19. April 2005
