

Biologie

**Entwicklung und Anwendung von *in vivo* Methoden
zur Untersuchung der Protein-S-Acylierung am
Tonoplasten in *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Linda Beckmann

aus Neuenkirchen

- 2016 -

Dekan:	Prof. Dr. Wolf-Michael Weber
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Jörg Kudla
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Dirk Prüfer
Tag der mündlichen Prüfung:	12.09.2016
Tag der Promotion:	

Inhalt

1 EINLEITUNG	1
1.1 DER TONOPLAST IST EINE MEMBRAN MIT VIELFÄLTIGEN FUNKTIONEN	1
1.2 DIE BINDUNG PERIPHERER PROTEINE AN MEMBRANEN	3
1.3 PROTEIN-LIPIDMODIFIKATIONEN UND IHRE BEDEUTUNG IN PFLANZEN	4
1.4 DIE PROTEIN-S-ACYLIERUNG UND IHRE FUNKTIONEN	6
1.4.1 Die Struktur der Protein-S-Acyltransferasen	8
1.4.2 Der Mechanismus der Protein-S-Acylierung und ihre Spezifität	10
1.5 DIE PROTEIN-S-ACYLTRANSFERASEN AUS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	12
1.5.1 Die PAT-Enzyme aus <i>A. thaliana</i> zeigen eine diverse subzelluläre Lokalisation	14
1.5.2 Die physiologischen Funktionen der Protein-S-Acyltransferasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
1.5.3 Die Funktion der Golgi- und Tonoplast-lokalisierter Protein-S-Acyltransferase 10 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1.6 VORGEHENSWEISEN ZUR UNTERSUCHUNG DER PROTEIN-S-ACYLIERUNG	17
1.6.1 Inhibition der Protein-S-Acylierung durch den Einsatz von Chemikalien	17
1.6.2 Methoden zum Nachweis der Protein-S-Acylierung	19
1.7 CALCINEURIN B-ÄHNLICHE PROTEINE AUS <i>A. THALIANA</i> ALS SUBSTRATE DER PROTEIN-S-ACYLIERUNG	20
1.7.1 Die Funktion der Tonoplast-lokalisierter Calciumsensor-Proteine <i>CBL2</i> und <i>CBL3</i>	22
1.8 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	23
2 MATERIAL	25
2.1 WACHSTUMSMEDIEN	25
2.1.1 Medien für <i>Escherichia coli</i>	25
2.1.2 Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.1.3 Medien für <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.1.4 Medium für <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.2 OLIGONUKLEOTIDE	26
2.3 PLASMIDE	26
2.4 VERWENDETE REKOMBINANTE DNA	26
2.5 ORGANISMEN	27
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	27
2.5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.5.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.5.4 Pflanzen	28
2.6 ANTIKÖRPER	28
3 METHODEN	29
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN ZUR GENERIERUNG REKOMBINANTER DNA	29
3.1.1 Agarosegelelektrophorese	29
3.1.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	30
3.1.3 Enzymatische Restriktion von DNA	30

3.1.4 Ligation von DNA.....	30
3.1.5 Fällung von DNA	30
3.1.6 Transformation elektrisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	31
3.1.7 Transformation elektrisch kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	31
3.1.8 Dimethylsulfoxid (DMSO)-Dauerkulturen.....	31
3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	32
3.1.10 DNA Sequenzierung.....	32
3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion.....	32
3.2 ARBEITEN MIT PFLANZEN.....	33
3.2.1 Transiente Proteinexpression in Epidermiszellen von <i>Nicotiana benthamiana</i>	33
3.2.2 Proteinexpression in Pollenschläuchen von <i>Nicotiana tabacum</i>	34
3.2.3 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3.2.4 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> zur dauerhaften Proteinexpression	36
3.2.5 Transiente Proteinexpression in Keimlingen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
3.2.6 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
3.2.7 RNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
3.2.8 cDNA Synthese.....	38
3.3 ARBEITEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	38
3.3.1 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	39
3.4.1 Proteinisolierung aus Hefezellen.....	39
3.4.2 Proteinfällung mit Methanol/Chloroform	40
3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz.....	40
3.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.4.5 Proteintransfer auf PVDF-Membranen („Semidry“ Western Blot).....	42
3.4.6 Spezifischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	43
3.4.7 Visuelle Detektion von Proteinen mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase.....	43
3.5 INHIBITION DER S-ACYLIERUNG <i>IN PLANTA</i> DURCH VAKUUMINFILTRATION VON 2-BROMPALMITAT (BOP/IBOP ASSAY).....	44
3.6 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER PROTEIN-S-ACYLIERUNG MITTELS <i>BIOTIN SWITCH</i> ASSAY UND UNTER VERWENDUNG DES INHIBITORS 2-BROMPALMITAT (BIBOP ASSAY)	44
3.7 FLUORESZENZMIKROSKOPIE	46
4 ERGEBNISSE	47
4.1 DIE KOEXPRESSION DER PROTEIN-S-ACYLTRANSFERASE 10 AUS <i>A. THALIANA</i> KOMPENSIERT EINE INHIBITION DER CBL2-S-ACYLIERUNG DURCH 2-BROMPALMITAT.....	47
4.1.1 Der S-Acylierungsinhibitor 2-Brompalmitat (2-Br) hat keinen Einfluss auf die Lokalisationen der Protein-S-Acyltransferase 10 und des koexprimierten Calciumsensors CBL2	47
4.1.2 Im Gegensatz zu 2-Brompalmitat können Cerulenin, Tunicamycin und 2-Fluorpalmitat nicht für eine Inhibition der S-Acylierung <i>in planta</i> eingesetzt werden.....	48
4.1.3 Bei einer PAT10-Koexpression wird die CBL2-Translokation durch Zugabe von 2-Br nicht verhindert.....	49

4.1.4 Die Tonoplastassoziation von CBL2 wird durch höhere Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br, bei gleichzeitiger PAT10-Koexpression nicht verhindert.....	50
4.1.5 CBL2 wird am N-Terminus durch aktive S-Acylierung der PAT10 in Anwesenheit des S-Acylierungsinhibitors 2-Br an den Tonoplasten gebunden.....	51
4.1.6 Eine der beiden Tonoplast-lokaliserten PAT-Enzyme aus <i>A. thaliana</i> vermittelt die Assoziation von CBL2 mit der Vakuolenmembran	52
4.1.7 Die koexprimierte PAT10 vermittelt eine Thioveresterung der Cysteine von CBL2.....	53
4.2 DIE MEMBRANBINDUNG VON CBL2 KANN DURCH MEHRERE PATs VERMITTELT WERDEN	54
4.2.1 Mit Hilfe des BOP Assay können CBL2-translozierende PATs in planta ermittelt werden.....	54
4.2.2 Eine induzierbare PAT-Expression erhöht die Selektivität des BOP Assay.....	56
4.2.3 Die CBL2-translozierenden PATs vermitteln auch eine Tonoplastbindung des Calciumsensors CBL3.....	58
4.2.4 Eine Koexpression verschiedener PATs mit CBL2 und CBL3 führt zu einer Membranbindung der beiden Calciumsensoren in Hefezellen	59
4.3 DER CALCIUMSENSOR CBL2 STELLT EIN S-ACYLIERUNGSSUBSTRAT FÜR PAT10 IN <i>A. THALIANA</i> DAR.....	64
4.3.1 Die zwei <i>A.thaliana pat10</i> Mutanten <i>pat10.1</i> und <i>pat10.3</i> sind Funktionsverlustmutanten	64
4.3.2 CBL2 lokalisiert cytoplasmatisch in epidermalen Zellen von <i>A. thaliana pat10</i> Funktionsverlustmutanten.....	66
4.3.3 CBL2 wird in Tabak Pollenschläuchen durch PAT02 und PAT10 an verschiedene Membranen gebunden.....	68
4.4 EIN AUSTAUSCH DER DHC-CRD DOMÄNE UND DES VOLLSTÄNDIGEN C-TERMINUS' VON PAT10 UND PAT11 FÜHRT ZU FEHLLOKALISIERTEN UND INAKTIVEN ENZYMEN	70
4.5 DIE CYSTEINE 4 UND 18 IM CBL2 N-TERMINUS SIND FÜR DIE BINDUNG AN DEN TONOPLASTEN ESSENTIELL	74
4.6 DIE PATs 02, 04, 05, 06 UND 10 ZEIGEN UNTERSCHIEDE IN IHRER SUBSTRATERKENNUNG	75
4.7 DIE POTENTIELLE AMPHIPATHISCHE HELIX IM CBL2 N-TERMINUS IST FÜR DIE TONOPLASTBINDUNG ESSENTIELL	78
4.8 CBL6 IST EIN S-ACYLIERUNGSSUBSTRAT FÜR EIN GROSSES SPEKTRUM AN PAT-ENZYMEN	81
4.8.1 Die starke Tonoplastbindung von CBL6 wird nicht durch duale S-Acylierung an den benachbarten Cysteinresten 19 und 20 vermittelt	86
4.9 DER BOP ASSAY IN PLANTA UND KOEXPRESSIONEN IN HEFEZELLEN KÖNNEN ERFOLGREICH ZUR ERMITTLUNG FUNKTIONALER PAT-SUBSTRAT MODULE EINGESETZT WERDEN.....	87
4.9.1 Die Wildtyp-Proteine HIR1 und HIR2 sind stabil in der Plasmamembran verankert.....	87
4.9.2 HIR1 und HIR2 werden durch verschiedene Lipidmodifikationen in der Plasmamembran verankert.....	89
4.9.3 Im BOP Assay können fünf PATs die Plasmamembranbindung von HIR1 vermitteln.....	91
4.9.4 HIR1 wird in einem N-terminalen MGQALGC Motiv und an weiteren Cysteinen S-acyliert.....	92
5 DISKUSSION	96
5.1 NEU ENTWICKELTE METHODEN ERMÖGLICHEN DIE IDENTIFIKATION FUNKTIONALER PAT-ENZYM-SUBSTRAT KOMBINATIONEN	96
5.1.1 Mit dem BOP Assay können in vivo funktionale PAT-Enzym-Substrat Paare ermittelt werden	96

5.1.2 Mit dem BOP Assay können S-acylierungsfähige PATs von dual lipidmodifizierten Substratproteinen ermittelt werden	99
5.1.3 Mit dem BiBOP Assay kann die Thioveresterung eines Proteins durch ein PAT-Enzym biochemisch und translokationsunabhängig untersucht werden	100
5.1.4 Funktionale PAT-Substrat Kombinationen können durch Koexpressionen in Hefezellen ohne den Einsatz von 2-Br identifiziert werden	100
5.2 DER CALCIUMSENSOR CBL2 WIRD IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> UNTER NORMALEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN DURCH PAT10 S-ACYLIERT	101
5.2.1 Durch Anwendung der neu etablierten Methoden wurde PAT10 als CBL2-S-acylierendes Enzym bestätigt.....	101
5.2.2 Neben PAT10 sind weitere PAT-Enzyme in der Lage CBL2 zu S-acylieren	102
5.3 DER C-TERMINUS IST FÜR DIE TONOPLAST-LOKALISATION UND DIE S-ACYLIERUNGSAKTIVITÄT VON PAT10 ESSENTIELL	103
5.3.1 Die cytosolisch orientierten Domänen der PATs kooperieren und tragen so zur korrekten Lokalisation und katalytischen Aktivität der Enzyme bei.....	104
5.3.2 Die C-Termini der CBL2-translozierenden PATs unterscheiden sich durch zwei Motive von den C-Termini der nicht-CBL2-translozierenden PATs.....	105
5.4 MITGLIEDER DER GLEICHEN <i>ARABIDOPSIS</i> PAT SUBGRUPPE KÖNNEN DAS GLEICHE SUBSTRAT S-ACYLIEREN, UNTERSCHIEDEN SICH JEDOCH IN DEN MECHANISMEN DER S-ACYLIERUNG	107
5.4.1 Pflanzliche PAT-Enzyme können teilweise das gleiche Substrat S-acylieren, zeigen aber Unterschiede in der Substraterkennung.....	107
5.4.2 PATs zeigen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit dem gleichen Substrat	108
5.5 DER S-ACYLTRANSFER AUF EIN CYSTEIN KANN DURCH ANGRENZENDE AROMATISCHE ODER BASISCHE AMINOSÄUREN UND DURCH HYDROPHOBE MOTIVE BEEINFLUSST WERDEN	109
5.5.1 CBL6 kann nicht-selektiv durch PATs aus allen phylogenetischen Subgruppen dieser Enzymfamilie transloziert werden	111
5.5.2 CBL6 weist im Vergleich zu CBL2 und CBL3 ein hydrophobes Motiv im N-Terminus auf, welches die PAT-vermittelte Tonoplastbindung beeinflussen kann.....	112
5.6 DER CBL2 N-TERMINUS BILDET EINE AMPHIPATHISCHE HELIX, DIE EINE S-ACYLIERUNG BEGÜNSTIGT UND DADURCH DIE TONOPLASTBINDUNG BEEINFLUSST	113
5.6.1 CBL2 wird durch PATs, die selbst nicht am Tonoplasten lokalisiert sind, S-acyliert und in der Vakuolenmembran verankert.....	114
5.7 HIR PROTEINE WERDEN MITTELS PROTEIN-S-ACYLIERUNG DURCH PAT-ENZYME AN MEMBRANEN GEBUNDEN	117
5.7.1 Die Plasmamembranbindung von HIR1 und HIR2 wird durch verschiedene Lipidmodifikationen vermittelt	117
5.7.2 HIR2 bindet aufgrund dualer S-Acylierung an zwei benachbarten Cysteinen an der Plasmamembran und am Tonoplasten	118
5.7.3 Die Plasmamembran-lokalisierte PAT05 kommt als HIR1-S-acylierendes Enzym in Frage ...	119
6 SYNOPSE	120
7 LITERATURVERZEICHNIS	122

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
9 ANHANG	137

1 Einleitung

Ein besonderes Merkmal der meisten Pflanzenzellen ist das Vorhandensein einer großen zentralen Vakuole, die in ausgereiften Zellen bis zu 90 % des Gesamtvolumens einnehmen kann. Die zentrale Vakuole ist ein Zellorganell mit vielseitigen Funktionen. Sie bestimmt zum einen die Größe der Zelle durch osmotische Wasseraufnahme und Aufrechterhaltung des Turgors, welcher wiederum die Zellfestigkeit beeinflusst (Marty 1999; Surpin und Raikhel 2004; Schumacher 2014). Zum anderen dient die Vakuole als Speicherorganell, hier werden unter anderem Zucker, Ionen, Proteine, organische Säuren, Aminosäuren, Nukleinsäuren und Glycoside gelagert (Zhang et al. 2015). Sie ist aber auch für die Speicherung von Phenolen, Alkaloiden oder Proteaseinhibitoren verantwortlich, welche für die pflanzliche Pathogenabwehr essentiell sind (Surpin und Raikhel 2004).

Allgemein unterscheidet man zwei Arten von pflanzlichen Vakuolen. Bei den meisten handelt es sich um sogenannte lytische Vakuolen. In ihnen werden Proteine mit Hilfe von hydrolytischen Enzymen gespalten. Vor allem Samen und andere Speichergewebe weisen den zweiten Vakuolentyp auf, die Proteinspeichervakuole. Diese sind für die Speicherung von Proteinen und löslichen Kohlenhydraten notwendig (Marty 1999; Viotti et al. 2013). Die zentrale Vakuole gehört zu den lytischen Vakuolen, in denen ein niedriger pH von etwa 5 bis 5,5 aufrechterhalten wird (Taiz 1992). Dieser niedrige pH ermöglicht unter anderem die Aktivität azidischer Hydrolasen, wie Proteasen, Ribonukleasen und Glycosidasen (Forgac 1989; Taiz 1992). Dadurch können Proteine in der Vakuole degradiert und Aminosäuren recycelt werden (Müntz 2007). Proteinspeichervakuolen weisen im Gegensatz zu den lytischen Vakuolen einen neutralen pH auf (Surpin und Raikhel 2004).

Um die vielfältigen Funktionen erfüllen zu können, müssen ständig verschiedenste Moleküle in die Vakuole importiert und aus ihr exportiert werden. Dieser Transport erfolgt über den Tonoplasten, von dem die Vakuole vollständig umschlossen ist (Zhang et al. 2015).

1.1 Der Tonoplast ist eine Membran mit vielfältigen Funktionen

Der Tonoplast ist die biologische Membran, die das Lumen der Vakuole vom Cytosol der Pflanzenzellen trennt und dadurch einen unkontrollierten Austausch von Molekülen zwischen den beiden Bereichen verhindert. Biologische Membranen bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht und anderen Lipiden, sowie eingelagerten Proteinen (Maeshima 2001). Innerhalb einer Zelle sind Membranen unterschiedlich zusammengesetzt. So hat der Tonoplast die geringste Dichte unter den Organell-umschließenden Membranen. Die Dichte von Membranen wird über das Gewichtsverhältnis der Proteine zu den Lipiden bestimmt. Im Tonoplasten liegt somit ein niedriges Protein-zu-Lipid Verhältnis vor (Yoshida und Uemura 1986; Maeshima 2001). Im Vergleich zur Plasmamembran weist der Tonoplast eine höhere Membranfluidität auf, vermutlich aufgrund eines geringeren Verhältnisses von Sterolen zu Phospholipiden (Yoshida

und Uemura 1986; Maeshima 2001). Bei den Lipiden der Vakuolenmembran handelt es sich neben Phospholipiden um Glycolipide und neutrale Lipide (Tavernier et al. 1993; Maeshima 2001). Die Zusammensetzung variiert jedoch zwischen unterschiedlichen Organismen und bestimmt spezifische Funktionen der Vakuole (Zhang et al. 2015). Die Lipide einer Membran bilden die direkte Umgebung der eingelagerten Membranproteine und es wird vermutet, dass sie sogar die enzymatische Aktivität der Tonoplast-lokaliserten Proteine beeinflussen können. So regulieren Sphingolipide in der Vakuolenmembran von Hefezellen die Aktivität der vakuolären Protonenpumpe H⁺-Adenosintriphosphatase (V-ATPase [Finnigan et al. 2011; Zhang et al. 2015]). Die Lipide des Tonoplasten sind also für die Funktion der Vakuole bedeutend, jedoch ist ihr Funktionsmechanismus in Pflanzen noch weitestgehend unverstanden.

Lipide und Proteine sind im Tonoplasten nicht gleichmäßig verteilt. Wie auch in der Plasmamembran existieren im Tonoplasten sogenannte Mikrodomänen und Detergenz-resistente Membranen (DRM [Malinsky et al. 2013; Zhang et al. 2015]). In der Literatur werden diese Begriffe oft gleichgesetzt, sind jedoch tatsächlich nicht gleichbedeutend. Als Mikrodomänen werden allgemein die Membranbereiche bezeichnet, die sich durch ihre Zusammensetzung, Struktur und Funktion von den umgebenden Membranbereichen absetzen. Unter Detergenz-resistenten Membranen versteht man die Membranfraktionen, die bei einer Extraktion unter Einsatz von milden Detergenzien *in vitro* nicht-lösliche Eigenschaften zeigen (Malinsky et al. 2013). Bei einer DRM-Isolation aus der Vakuolenmembran von *Arabidopsis thaliana* und anschließender massenspektrometrischer Lipidanalyse wurde in den DRM-Fraktionen ein höherer Anteil an gesättigten Fettsäuren in einigen Phospholipiden im Vergleich zu nicht-DRM-Fraktionen identifiziert. Zudem wurde die V-ATPase beispielsweise vermehrt in DRM-Fraktionen angereichert, während die vakuoläre Protonenpumpe H⁺-Pyrophosphatase (V-PPase) gleichmäßig verteilt in DRM und nicht-DRM Fraktionen identifiziert wurde (Yoshida et al. 2013; Zhang et al. 2015). Das könnte ein Hinweis auf verschiedene Membransubdomänen innerhalb des Tonoplasten sein, durch die verschiedene tonoplastidäre Proteine räumlich voneinander abgegrenzt werden.

Die im Tonoplasten lokalisierten Proteine regulieren den Transport von Wasser, Ionen und Metaboliten über diese Membran (Zhang et al. 2015). Die Energie für diese Transportprozesse liefert die kombinierte Aktivität von V-ATPase und V-PPase (Rea und Sanders 1987; Gaxiola et al. 2007; Schumacher 2014). Diese pumpen Protonen aus dem Cytosol in die Vakuole, wodurch das Cytosol neutral gehalten wird und die Vakuole azidifiziert vorliegt. Der so entstehende Protonengradient treibt wiederum den Im- und Export der verschiedenen Moleküle durch Protonen-gekoppelte Transporter an (Maeshima 2001; Schumacher 2014). Zusammen mit den beiden Protonenpumpen stellen die Aquaporine die am häufigsten vorkommenden Proteine im Tonoplasten dar. Diese regulieren den Wassertransport durch Membranen (Maeshima 2001). Die Vakuole bildet außerdem den größten intrazellulären Speicher von Calcium-Ionen (Ca²⁺) in

ausgereiften Pflanzenzellen und ist damit für die Bildung cytosolischer Calciumsignale essentiell (Peiter 2011). Der Transport von Ca^{2+} über den Tonoplasten erfolgt durch Tonoplast-lokalisierte Transportproteine, die Ca^{2+} -ATPasen oder $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter der CAX Proteinfamilie (*Cation/H⁺ exchanger* [Maeshima 2001; Peiter 2011]).

Bei den genannten Transportproteinen handelt es sich um integrale Membranproteine. Diese durchziehen den Tonoplasten vollständig mit einer oder mehreren Transmembrandomänen (Tan et al. 2008). Jedoch gibt es auch Membranproteine, die lediglich an einer Seite der Lipiddoppelschicht mit der Membran assoziiert sind, die peripheren Membranproteine. Die Verankerung eines Proteins in einer Membran erfolgt demzufolge nicht immer über Transmembrandomänen und auch Proteine mit löslichen Eigenschaften können mit Membranen assoziiert sein.

1.2 Die Bindung peripherer Proteine an Membranen

Die Bindung von peripheren Proteinen an Membranen erfolgt entweder indirekt über Protein-Protein-Interaktionen oder über eine direkte Assoziation mit der Lipiddoppelschicht. Die direkte Membranbindung der peripheren Proteine wird über bestimmte Strukturen, wie zum Beispiel lipidbindende Motive, amphipathische α -Helices oder auch Lipidanker vermittelt (Johnson und Cornell 1999). Es gibt viele verschiedene lipidbindende Motive, wie zum Beispiel die PH (Pleckstrin Homologie) Domäne. Über eine PH Domäne kann ein Protein an verschiedene Phosphatidylinositole (PI) in Membranen binden. Diese Bindung erfolgt entweder elektrostatisch, wobei positiv geladene Aminosäuren eines basischen Motivs innerhalb der PH Domäne mit negativ geladenen Kopfgruppen der PI interagieren. PH Domänen können sich aber auch durch hydrophobe Bereiche nahe der PI Bindestelle in die Membranen einlagern (Manna et al. 2007; Stahelin 2009).

Amphipathische α -Helices (AH) dienen ebenfalls als Membranbindungsmotiv für periphere Membranproteine (Drin und Antony 2010). Bei einer AH handelt es sich um eine α -Helix, die sich durch eine hydrophobe Seite und eine gegenüberliegende polare Seite auszeichnet (Drin et al. 2007). Der hydrophobe Bereich wird vom Cytosol verdrängt und lagert sich in den ebenfalls hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht ein. Der polare Teil der AH orientiert sich jedoch in Richtung der polaren Lipidköpfe der Membran und des Cytosols (Johnson and Cornell 1999; Drin et al. 2007). Dadurch nimmt die Helix eine Orientierung parallel zur Membranfläche an (Drin et al. 2007). AHs dienen jedoch nicht nur der Membranbindung. Sie können auch Membranstabilisierende Funktionen haben, wie zum Beispiel bei antibakteriellen Peptiden (Dathe and Wieprecht 1999; Drin et al. 2007). Weiterhin kann auch die Krümmung der Membran durch die AH eines Proteins beeinflusst werden. Die N-terminale AH des G-Proteins Sar1 ist zum Beispiel für den Transport von COPII Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi essentiell. Am ER löst die Helix von Sar1 eine Membrankrümmung aus, welche wiederum die Abschnürung von COPII Vesikeln initiiert (Lee et al. 2005; Drin et al. 2007). Bestimmte Proteine

können mit Hilfe ihrer AH die Krümmung einer Membran aber auch wahrnehmen und schließlich an diese stark gekrümmten Membranen binden (Drin et al. 2007). Das Golgi-assoziierte Protein ArfGAP1 (*ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1*) besitzt beispielsweise eine AH mit einem sogenannten ALPS Motiv (*amphipathic lipid packing sensor*). Das ALPS Motiv lagert sich bevorzugt in gekrümmte Membranen ein, wodurch ArfGAP1 bevorzugt an gekrümmten und nicht an flachen Membranen bindet (Bigay et al. 2005; Drin et al. 2007; Bigay und Antony 2012). Darüber hinaus kann ein Protein mit Hilfe der AH auch die Komposition der Membranlipide erkennen. Das regulatorische Enzym der Phosphatidylcholin (PC)-Produktion, die Cytidin 5'-Triphosphat(CTP):Phosphocholin Cytidyltransferase (CCT) bindet mittels ihrer AH nur an PC-arme Bereiche in Membranen. Die AH besitzt autoinhibitorische Eigenschaften, wenn die CCT nicht Membran-gebunden ist. Im Membran-gebundenen Zustand wird die CCT jedoch aktiviert und führt somit zu einer erhöhten PC-Synthese in den PC-armen Membranbereichen (Cornell and Northwood 2000; Cornell 2016).

Die Bindung peripherer Proteine an Membranen kann außerdem über Lipidanker erfolgen. Diese Lipidanker werden unter anderem durch posttranslationale Lipidmodifikationen auf die jeweiligen Proteine transferiert.

1.3 Protein-Lipidmodifikationen und ihre Bedeutung in Pflanzen

Der Begriff Protein-Lipidmodifikation beschreibt die spezifische kovalente Bindung von Lipiden an Proteine. Durch solche Lipidbindungen erhöht sich die Hydrophobizität der modifizierten Proteine und demzufolge weisen die Proteine veränderte Eigenschaften auf. Im Wesentlichen begünstigt eine Lipidmodifikation die Assoziation löslicher Proteine an Membranen oder auch an

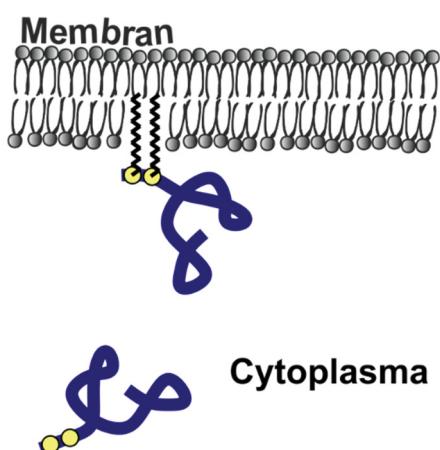


Abb. 1: Membranbindung eines löslichen Proteins über einen Lipidanker. Das nicht-lipidmodifizierte Protein ist im Cytoplasma lokalisiert. Durch die kovalente Bindung von Lipiden (schwarz) an die entsprechenden Motive (gelb) erhöht sich die Hydrophobizität des Proteins und eine Membranbindung wird ermöglicht (verändert aus Yalovsky et al. 1999).

Mikrodomänen innerhalb der Membranen (Abb. 1 [Yalovsky et al. 1999; Hemsley 2015]).

Bei der Protein-N-Myristylierung, -Prenylierung und -S-Acylierung handelt es sich um die drei häufigsten Protein-Lipidmodifikationen im Cytosol von eukaryotischen Zellen. Sie unterscheiden sich durch die Art der übertragenen Lipide und die Modifikationsmotive der Substratproteine (Yalovsky et al. 1999; Hurst und Hemsley 2015).

Bei der Protein-Prenylierung werden Isoprenoide unter Bildung eines Thioethers irreversibel an C-terminale Cysteinreste der Substratproteine gebunden (Abb. 2). Bei den Isoprenoiden handelt es sich entweder um C15 Farnesylgruppen (Farnesylierung) oder C20 Geranylgeranylgruppen (Geranylgeranylierung [Casey 1992; Nadolski und Linder 2007]). Als wichtigstes

Prenylierungsmotiv wurde die C-terminale CaaX Box beschrieben. Das C repräsentiert den lipidmodifizierten Cysteinrest, gefolgt von zwei aliphatischen Aminosäuren (aa). Das X in der CaaX Box stellt die terminale Aminosäure dar und legt fest, ob eine Farnesylgruppe oder eine Geranylgeranylgruppe an das Protein gebunden wird. Proteinen, die an dieser Stelle ein Leucin aufweisen, wird beispielsweise eine Geranylgeranylgruppe angehängt. Endet das CaaX Motiv jedoch mit Serin (S), Threonin (T), Glutamin (Q), Alanin (A) oder Methionin (M) hat das eine Farnesylierung des Proteins zur Folge (Kinsella et al. 1991; Kitten und Nigg 1991; Schafer und Rine 1992; Falsetti et al. 2007; Bhawal et al. 2015; Gentry et al. 2015). Die Protein-Prenylierung wird von drei verschiedenen, vermutlich cytosolischen Enzymen katalysiert, der Protein Geranylgeranyl Transferase-I (PGGT-I), der Protein Farnesyl Transferase (PFT) und der Rab-Geranylgeranyl Transferase (Rab-GGT). Letztere ist spezifisch für die Farnesylierung von kleinen Rab GTPasen (Zeng et al. 2007; Hemsley 2015).

Zwar ist die Prenylierung eine in Eukaryoten konservierte Lipidmodifikation, die physiologische Bedeutung dieser Lipidmodifikation scheint in Pflanzen jedoch eine andere zu sein, als in Hefen oder Tieren. Ein Verlust der Protein-Prenylierung hat in Tieren und Pilzen beispielsweise letale Auswirkungen, während in Pflanzen zwar Wachstumsdefizite auftreten, die Pflanzen aber noch überlebensfähig sind (Running et al. 2004; Hemsley 2015). Etwa 700 *Arabidopsis* Proteine besitzen ein C-terminales CaaX Box Motiv, dennoch wurde bisher nur in wenigen pflanzlichen Proteinen eine Prenylierung nachgewiesen (Zeng et al. 2007; Hemsley 2015).

Als N-Myristylierung wird das irreversible Anhängen der gesättigten Fettsäure Myristinsäure an ein N-terminales Glycin (G) unter Bildung einer Amidbindung bezeichnet (Abb. 2). Das modifizierte Glycin ist Teil der Konsensussequenz MGXXX(S/T), wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann (Resh 1999; Nadolski und Linder 2007; Batistič et al. 2008; Sorek et al. 2009). Diese Lipidmodifikation tritt sowohl während der Proteintranslation, also cotranslational, aber auch posttranslational auf. Bei der cotranslationalen N-Myristylierung erfolgt das Anhängen

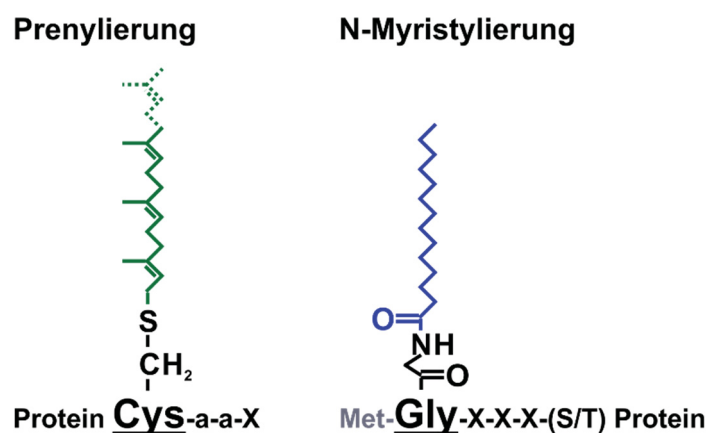


Abb. 2: Struktur der Protein Prenylierung und N-Myristylierung. Bei der Protein-Prenylierung wird eine Farnesylgruppe (grün) oder eine Geranylgeranylgruppe (grün und gestrichelte Linie) an das Cystein innerhalb eines CaaX Motivs gebunden. Bei der N-Myristylierung erfolgt die Bindung einer Myristylgruppe (blau) an ein N-terminales Glycin. Das N-terminale Glycin kann durch Abspaltung der initialen Aminosäure Methionin (grau) entstehen (verändert aus Hemsley 2015).

der Myristinsäure direkt im Anschluss an die Abspaltung der initialen Aminosäure Methionin, bei welcher das angrenzende Glycin eine N-terminale Position einnimmt. Es gibt jedoch auch Proteine, die direkt nach der Translation kein N-terminales Myristylierungsmotiv besitzen, diese Lipidmodifikation aber dennoch durchlaufen. Diese Proteine müssen zunächst proteolytisch gespalten werden, damit das „versteckte“ Glycin an die N-terminale Position gelangt und schließlich posttranslational N-myristyliert werden kann (Wilcox et al. 1987; Zha et al. 2000; Farazi et al. 2001; Nadolski und Linder 2007; Batistič et al. 2008). Katalysiert wird die N-Myristylierung durch N-Myristyltransferasen (NMT), von denen *A. thaliana* zwei Isoformen besitzt (AtNMT1 und 2 [Pierre et al. 2007; Hemsley 2015]). Diese sind subzellulär zum einen mit Ribosomen assoziiert, um Proteine cotranslational zu modifizieren. Zusätzlich sind die NMT in *A. thaliana* im Cytosol lokalisiert (Resh 1999; Qi et al. 2000). Ein Funktionsverlust der NMT1 ist für *A. thaliana* Pflanzen letal, während *nmt2* Mutanten verspätet blühen, ansonsten aber keine veränderten phänotypischen Eigenschaften aufweisen (Pierre et al. 2007; Hemsley 2015). Wie viele pflanzliche Proteine Substrate der N-Myristylierung darstellen ist nicht genau bekannt. Durch die Anwendung von Vorhersageprogrammen wird die Zahl der N-myristylierten Proteine in *A. thaliana* auf 319 bis zu 437 geschätzt (Boisson et al. 2003; Podell und Gribkov 2004; Hemsley 2015). Die Protein-S-Acylierung ist in Pflanzen eine häufig vorkommende Lipidmodifikation, die eine Vielzahl von Proteinen beeinflusst. Anders als die Prenylierung und die N-Myristylierung ist eine Protein-S-Acylierung reversibel, wodurch dieser Lipidmodifikation eine besondere Bedeutung zukommt (Hemsley et al. 2013; Hemsley 2015).

1.4 Die Protein-S-Acylierung und ihre Funktionen

Bei der Protein-S-Acylierung werden die gesättigten Fettsäuren Stearat (18:0), Palmitat (16:0) oder auch die einfach ungesättigte Fettsäure Oleat (18:1) mit den Thiolgruppen (-SH) von Cysteinresten unter Bildung einer Thioesterbindung verknüpft (Abb. 3 [Resh 1996; Hemsley und Grierson 2008; Chamberlain und Shipston 2015]). Diese Bindung ist labil und reversibel und kann durch Acyl-Protein-Thioesterasen (APTs) wieder rückgängig gemacht werden [(Duncan und Gilman 1998; Conibear und Davis 2010)]. Bisher ist kein bestimmtes S-Acylierungsmotiv bekannt, vielmehr gibt es verschiedene S-acylierbare Proteinsequenzen (Magee und Seabra 2005; Rocks et al. 2010). Allgemein tritt die Protein-S-Acylierung oft in der Nähe hydrophober Bereiche der Proteine auf oder liegt in Kombination mit anderen Lipidmodifikationen vor. So können Proteine N-terminal N-myristyliert und S-acyliert werden (Abb. 3A) oder C-terminal prenyliert und S-acyliert vorliegen (Abb. 3B). Dabei werden in der Regel Cysteine S-acyliert, die nah am bereits modifizierten N- oder C-Terminus des Proteins lokalisiert sind. Cysteine, die sich in oder nah an Transmembrandomänen oder anderen Membran-assoziierten Domänen befinden, werden ebenfalls bevorzugt S-acyliert (Abb. 3C). Liegen zwei oder mehr Cysteinreste hintereinander vor, deutet dies ebenfalls auf ein potentiell S-Acylierungsmotiv hin (Abb. 3D [Bijlmakers und Marsh 2003; Dietrich und Ungermann 2004; Magee und Seabra 2005; Rocks et al. 2010]).

Eine durch S-Acylierung vermittelte Membranbindung eines Proteins ist im Vergleich zu den Membranassoziationen durch N-Myristylierung oder Prenylierung stärker (Hemsley und Grierson 2008). Zudem bewirkt eine alleinige N-Myristylierung oder Prenylierung keine stabile Verankerung des Proteins in einer Membran, dazu ist zusätzlich eine weitere Lipidmodifikation, wie eine S-Acylierung nötig (Shahinian und Silvius 1995; Hemsley und Grierson 2008).

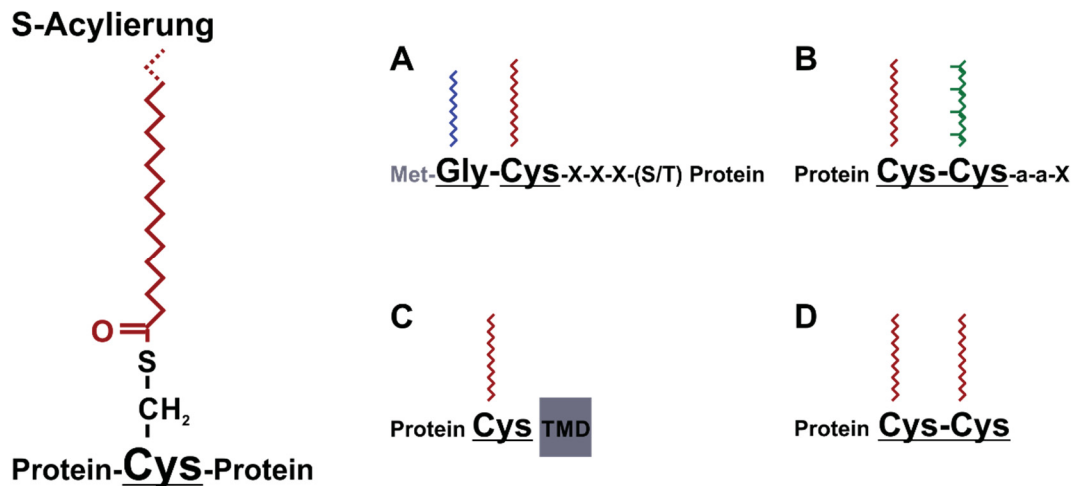


Abb. 3. Struktur der Protein-S-Acylierung. Bei der Protein-S-Acylierung wird Palmitat (rot), Stearat (rot und gestrichelte Linie) oder Oleat (nicht gezeigt) durch eine Thioesterbindung reversibel an einen Cysteinrest gebunden. Eine Protein-S-Acylierung tritt oft in Kombination mit einer N-Myristylierung (**A**) oder einer Prenylierung (**B**) auf. Außerdem werden Cysteine nahe Transmembrandomänen (**C** [TMD]) oder mehrere nebeneinander liegende Cysteine (**D**) bevorzugt S-acyliert (modifiziert aus Magee und Seabra 2005; Hemsley 2015.)

Die Reversibilität der Protein-S-Acylierung ermöglicht eine Assoziation von Proteinen mit verschiedenen Membranen oder Membransubdomänen (Sorek et al. 2007; Batistič 2012). So weist in *A. thaliana* ein Vertreter der Ras Proteinfamilie, AtROP6 (*Rho of plants 6*), im farnesylierten und S-acylierten Zustand, sowie im farnesylierten und nicht-acylierten Zustand, unterschiedliche Lokalisationen innerhalb der Plasmamembran auf (Sorek et al. 2007; Hemsley 2009). Darüber hinaus kann eine S-Acylierung eine Hin- und Herbewegung von Proteinen zwischen verschiedenen Zellmembranen verursachen (Rocks et al. 2005; Batistič 2012). So werden die beiden Ras Isoformen H- und Nras aus Säugetieren durch Farnesylierung und S-Acylierung mit der Plasmamembran assoziiert. Die S-Acylierung von H- und Nras erfolgt am Golgi, woraufhin die Proteine über den sekretorischen Transportweg an die Plasmamembran gebracht werden. Dort führt eine Deacylierung zu einer Verteilung der farnesylierten Proteine zwischen Cytosol und verschiedenen Zellmembranen. Eine S-Acylierung am Golgi vermittelt anschließend erneut einen Transport von H- und Nras an die Plasmamembran (Rocks 2005; Greaves und Chamberlain 2007). Eine Hin- und Herbewegung zwischen verschiedenen subzellulären Lokalisationen durch S-Acylierung und Deacylierung wurde bei pflanzlichen Proteinen bisher nicht gezeigt.

Die Protein-S-Acylierung kann zudem die Proteinstabilität beeinflussen. Ein Beispiel dafür stellt ein heterotrimeres GTP-bindendes Protein aus *A. thaliana* dar. Die Gα1 Untereinheit des

Heterotrimers wird durch N-Myristylierung und S-Acylierung an die Plasmamembran transportiert, wo es mit dem S-acylierten oder prenylierten G β γ Dimer interagiert und der heterotrimere Komplex dadurch stabilisiert wird. Hier liegt eine Kombination von N-Myristylierung, Prenylierung und S-Acylierung vor, die Protein-S-Acylierung trägt somit neben den anderen Lipidmodifikationen zur Stabilisierung des Proteinkomplexes bei (Adjobo-Hermans et al. 2006; Hemsley und Grierson 2008).

Eine Protein-S-Acylierung kann aber auch eine Veränderung der Proteinaktivität bewirken. So ändert der menschliche spannungsgesteuerte Kalium (K⁺)-Kanal K_v1.1 durch eine Protein-S-Acylierung offenbar seine Wahrnehmung des Membranpotentials. Dadurch werden die Interaktionen des Kanals mit der Lipiddoppelschicht erweitert und es entstehen veränderte K⁺-Ströme (Gubitosi-Klug et al. 2005; Batistič 2012). Solch eine Aktivitätsänderung pflanzlicher Proteine durch S-Acylierung wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

Im Vergleich zur Protein-N-Myristylierung und Prenylierung weist die Protein-S-Acylierung einen weiteren bedeutenden Unterschied auf. Diese Lipidmodifikation wird durch eine große Gruppe membranständiger Enzyme katalysiert, den Protein-S-Acyltransferasen.

1.4.1 Die Struktur der Protein-S-Acyltransferasen

Die Identifizierung von Protein-S-Acyltransferasen (PATs) erfolgte erstmalig in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bei einer revers genetischen Analyse wurden *ERF2* und *ERF4* (*Effect on Ras function 2* und *4*) als diejenigen Gene ermittelt, welche für eine Protein-S-Acyltransferase codieren und die S-Acylierung der Ras GTPase Ras2p aus Hefe katalysieren (Lobo et al. 2002). Mittlerweile wurden in *S. cerevisiae* neben Erf2/4p noch die sechs PAT-Enzyme Swf1p (*Spore wall formation 1*), Akr1p, Akr2p (*Ankyrin repeat-containing protein 1* und *2*), Pfa3p, Pfa4p und Pfa5p (*Protein fatty acyltransferases 3, 4* und *5*) identifiziert (Hou et al. 2009). Der Mensch besitzt 23 PAT-Enzyme, die als DHHC1 - 24 bezeichnet werden (es gibt kein DHHC10 Protein) und die Gruppe der PATs in *A. thaliana* besteht aus 24 Enzymen (Roth et al. 2002; Linder und Deschenes 2004; Batistič 2012; Korycka et al. 2012). PAT-Enzyme weisen in der Regel vier Transmembrandomänen auf und sind somit integrale Membranproteine (Abb. 4). Eine Gemeinsamkeit aller PATs ist ein konserviertes Motiv, welches das katalytische Zentrum dieser Enzymfamilie bildet und für den Lipidtransfer während der Protein-S-Acylierung verantwortlich ist. Benannt ist es nach dem Tetrapeptid DHHC, bestehend aus einem Aspartat, zwei Histidinen und einem Cystein. Das DHHC Motiv liegt in vielen PATs innerhalb einer Cysteinreichen Domäne und wird daher auch als DHHC-CRD bezeichnet (Lobo et al. 2002; Hemsley et al. 2005; Mitchell et al. 2006; Batistič 2012; González Montoro et al. 2015). Die Sequenz der DHHC-CRD Domäne aller PAT-Enzyme ähnelt außerdem der einer CCHH Zink-Finger Domäne, wird aufgrund von strukturellen Unterschieden jedoch nicht als klassisches Zink-Finger Motiv kategorisiert (Böhm et al. 1997; Mitchell et al. 2006). In der Hefe PAT Swf1p und der PAT DHHC3 aus Säugern wurden zwei solcher Zn²⁺-Bindemotive beschrieben, wobei die Zn²⁺-Bindung

vermutlich jeweils über eine CCHC Konfiguration erfolgt (González Montoro et al. 2013; Gottlieb et al. 2015). Die Zn^{2+} -Koordination ist wahrscheinlich eher für die Struktur und Stabilität einiger PAT-Enzyme wichtig und weniger für deren Aktivität (Gottlieb et al. 2015). Der Hefe PAT Akr1p fehlen beispielsweise fünf der sechs Cysteine der Zn^{2+} -Bindemotive und es handelt sich dennoch um eine katalytisch aktive S-Acyltransferase (Roth et al. 2002; Gottlieb et al. 2015).

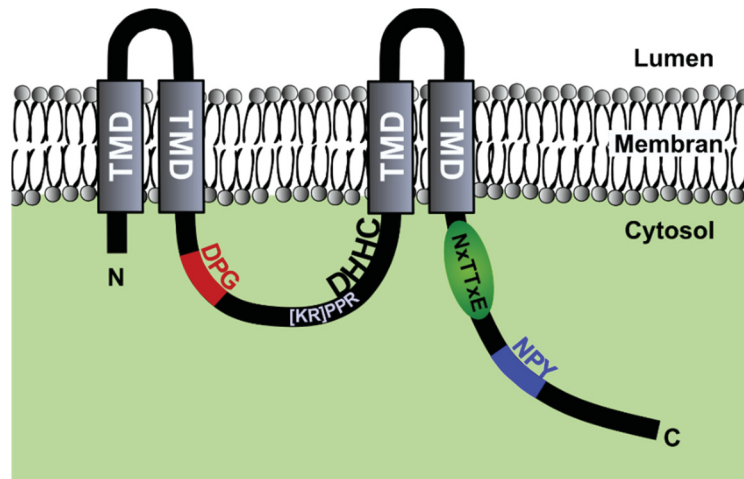


Abb. 4: Die allgemeine Struktur der Protein-S-Acyltransferasen (PATs). Die meisten PATs besitzen vier Transmembrandomänen (TMD), welche von cytosolischen N- und C-Termini flankiert werden. Alle PATs besitzen die katalytische DHHC-CRD Domäne (hier DHHC), welche auf der cytosolischen Seite zwischen TMD 2 und 3 liegt. In einigen PATs sind außerdem die Motive DPG, [KR]PPR, NxTTxE und NPY zu finden (verändert aus González Montoro et al. 2009; Batistič 2012).

Innerhalb der DHHC-CRD Domäne einiger PATs liegt zusätzlich ein [KR]PPR Motiv, welches wichtig für die enzymatische Aktivität ist (Mitchell et al. 2010; Batistič 2012). So zeigt die Hefe PAT Erf2p bei einem Austausch der letzten Aminosäure dieses Motivs von Arginin zu Alanin (Erf2p^{RPPA}) keine Aktivität mehr (Mitchell et al. 2010). Ein weiteres geringer konserviertes Motiv innerhalb der PAT-Enzymfamilie ist der „Palmitoyltransferase konservierte C-terminus (PaCCT)“, bestehend aus den Aminosäuren NP[Yx]xxGxxxN, weshalb es auch als NPY Motiv bezeichnet wird. Dieses Motiv wird für die Enzymaktivität der zwei Hefe PATs Swf1p und Pfa3p benötigt (González Montoro et al. 2009).

In der PAT-Enzymfamilie wurden außerdem zwei weitere kurze und hoch konservierte Motive identifiziert. Das DPG Motiv (Aspartat-Prolin-Glycin), welches C-terminal der zweiten Transmembrandomäne zu finden ist, und das NxTTxE Motiv (Asparagin-x-Threonin-Threonin-x-Glutamat), welches C-terminal der letzten Transmembrandomäne liegt. Beide Motive liegen wie die DHHC-CRD Domäne auf der cytosolischen Seite der Membran, ihre Funktion ist jedoch bislang unbekannt. Es wird allerdings vermutet, dass sie nicht zur Funktion der Enzyme beitragen, da Aminosäure-Substitutionen in beiden Motiven keinen Einfluss auf die Aktivität der Hefe PAT Erf2p haben (Mitchell et al. 2006; Mitchell et al. 2010). Ob auch die pflanzlichen PATs die beschriebenen Motive ([KR]PPR Motiv, NPY, DPG und NxTTxE) aufweisen, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

1.4.2 Der Mechanismus der Protein-S-Acylierung und ihre Spezifität

Die Übertragung von S-Acylgruppen vom Enzym zum Substrat erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt, der Autoacylierung, wird zuerst ein S-Acyl-PAT Intermediat gebildet, bei dem die S-Acylgruppe mittels Thioveresterung an den DHHC Cysteinrest des PAT-Enzyms gebunden wird (Linder und Deschenes 2003; Mitchell et al. 2010). Damit ein Cysteinrest S-acyliert werden kann, muss aus der Thiolgruppe des Cysteins zunächst ein Thiolat durch Abspaltung des Wasserstoffatoms gebildet werden (Abb. 5). Die Thiolatbildung ist bei einem cytosolischen pH von 7,2 – 7,4 unwahrscheinlich. Das Potential einer Thiolatbildung kann aber durch Reduzierung der Säurekonstante (pK_S) der Thiolgruppe erhöht werden. Diese pK_S -Reduzierung kann durch benachbarte basische oder aromatische Aminosäuren erfolgen (Bizzozero et al. 2001; Dietrich und Ungermann 2004; Hemsley und Grierson 2008). Die Thioesterbindung zwischen dem Cysteinrest des Proteins und der S-Acylgruppe erfolgt anschließend durch einen nukleophilen Angriff des Thiolats auf den α -Kohlenstoff des Lipiddonors (Dietrich und Ungermann 2004). Die pK_S der Thiolgruppe kann nicht nur intramolekular, sondern kann auch intermolekular über Protein-Protein Interaktionen herabgesenkt werden. So ist beispielsweise die Wahrscheinlichkeit einer S-Acylierung des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Proteins SNAP-25 (*syntaxin and 25-kDa synaptosomal protein*) *in vitro* um das 100-fache erhöht, wenn es an das SNARE Syntaxin 1 gebunden ist (Veit 2000; Dietrich und Ungermann 2004).

Als Lipid-Donor bei der Protein-S-Acylierung dienen sogenannte aktivierte Fettsäuren. Die Aktivierung von Fettsäuren erfolgt durch die Bindung dieser an das Coenzym A (resultierend in Acyl-CoA), also Palmityl-CoA oder auch Stearyl-CoA. Durch ihre Hydrophobizität sind die aktivierten Fettsäuren vermutlich in Zellmembranen eingelagert (Resh 1999). Unterschiedliche PATs weisen verschiedene Acyl-CoA Affinitäten auf, die wiederum zur Regulation der Protein-S-Acylierung beitragen. Je nach Kohlenstoffkettenlänge der Fettsäure werden verschiedene PAT-Enzyme schneller oder langsamer autoacyliert. Dadurch erfolgt auch der Lipidtransfer der verschiedenen Fettsäuren auf die Substratproteine unterschiedlich schnell. Darüber hinaus führen sich ändernde Acyl-CoA Verfügbarkeiten verschiedener Kohlenstoffkettenlängen in der

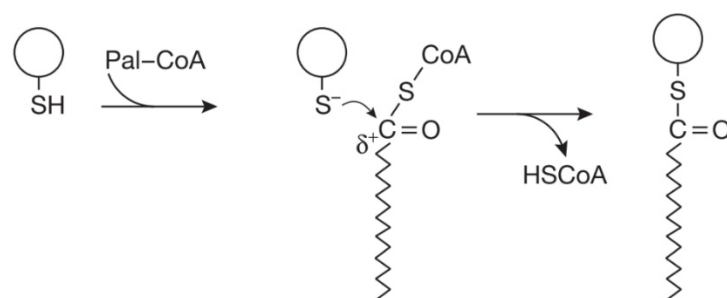


Abb. 5: Der Mechanismus der S-Acylierung eines Cysteins. Die reduzierte Thiolgruppe (SH) eines Cysteins wird deprotoniert und bildet ein Thiolat (S⁻). Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff des Thiolats auf den α -Kohlenstoff der aktivierten Fettsäure (Pal-CoA). Daraus resultiert eine Thioesterbindung zwischen der S-Acylgruppe (hier Palmitat) und dem Cysteinrest (aus Dietrich und Ungermann 2004).

Zelle zur Aktivität unterschiedlicher PATs und damit zur Regulation der Protein-S-Acylierung (Jennings und Linder 2012).

Oftmals wird das Cystein des DHHC Motivs als einzige Autoacylierungsstelle der PATs beschrieben. Mittlerweile gibt es aber Hinweise auf katalytisch aktive PAT-Enzyme in Hefe, in denen vermutlich andere Cysteine innerhalb der CRD als Autoacylierungsakzeptoren fungieren. So ist die Hefe PAT Pfa4p auch ohne das DHHC Cystein noch in der Lage ihr Substratprotein Chs3p (Chitin Synthase 3) zu S-acylieren (González Montoro et al. 2015). Die Aktivität der PATs wird außerdem durch Oligomerisierung dieser Enzyme beeinflusst. Liegen die Säuger PATs DHHC2 und DHHC3 als Dimere vor, sind sie weniger aktiv als die jeweiligen Monomere (Lai und Linder 2013).

Eine S-Acylierung wurde unter anderem bei 47 Proteinen aus der Hefe *S. cerevisiae*, bei etwa 125 Proteinen aus humaner Jurkat T-Zellkultur und bei etwa 600 Proteinen aus *A. thaliana* nachgewiesen (Roth et al. 2006; Martin und Cravatt 2009; Greaves und Chamberlain 2011; Hemsley et al. 2013). Die Zahl der S-acylierenden Enzyme ist jedoch deutlich geringer (sieben PATs in Hefe, 23 PATs in Säugetieren, 24 PATs in *A. thaliana* [(Roth et al. 2002; Linder und Deschenes 2004; Batistič 2012; Korycka et al. 2012])). Somit müssen einige PAT-Enzyme für die S-Acylierung verschiedener Proteine verantwortlich sein. Eine Proteomanalyse mit allen sieben Hefe *pat* Einzelmutanten hat ergeben, dass Hefe PATs bestimmte Proteingruppen bevorzugt S-acylieren. So führt ein Funktionsverlust der PAT Erf2p zu einer stark reduzierten S-Acylierung von Ras Proteinen oder das Fehlen der Hefe PAT Swf1p zu einer Reduktion der S-Acylierung von SNARE Proteinen (Valdez-Taubas und Pelham 2005; Roth et al. 2006; Greaves und Chamberlain 2011). Darüber hinaus werden einige Substratproteine nicht-selektiv durch nur ein PAT-Enzym S-acyliert, sondern können durch mehrere PATs lipidmodifiziert werden. So wurde bei PAT-Überexpressionsstudien in Hefe die S-Acylierung des vakuolären Proteins Vac8p (*Vacuolar releated protein 8*) durch fünf der insgesamt sieben Hefe PATs nachgewiesen (Hou et al. 2009; Greaves und Chamberlain 2011). Es gibt jedoch auch Proteine, die nur von einer bestimmten PAT spezifisch S-acyliert werden. Ein Funktionsverlust der Hefe PAT Pfa4p führt beispielsweise dazu, dass die Chitin Synthase 3 (Chs3p) nicht mehr S-acyliert wird (Lam et al. 2006; Chamberlain und Shipston 2015). Zusätzlich resultierte die Aktivität der drei jeweils überexprimierten Hefe PATs Swf1p, Pfa3p und Erf2p in der *pfa4* Mutante nicht in einer S-Acylierung von Chs3p (González Montoro et al. 2011; Chamberlain und Shipston 2015).

Wie die PAT-Substrat-Erkennung erfolgt, ist nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass die hoch variablen N- und C-Termini der PATs die spezifische Substrat-S-Acylierung vermitteln, während die DHHC-CRD für die allgemeine katalytische Aktivität der PATs verantwortlich ist. (González Montoro et al. 2011; Batistič 2012). Die Substrat-Erkennung durch die PATs muss nicht anhand der S-Acylierungsstellen in den Proteinen erfolgen. So können einige PATs ihre Substrate an Proteinbereichen erkennen, die weiter von den S-acylierten Cysteinen entfernt

Die bereits beschriebenen Motive der nicht-pflanzlichen PATs wurden auch in den *Arabidopsis* PATs identifiziert (zusammengefasst in Tabelle 1 [Batistič 2012]). Einige Motive sind nur in bestimmten phylogenetischen Gruppen zu finden. So besitzen die PATs der Gruppen A und B, sowie die nicht-gruppiereten Enzyme das [KR]PPR Motiv, während das Motiv in den Enzymen der Gruppe C fehlt. In den PATs der Gruppe A ist darüber hinaus eine N-terminale Domäne identifiziert worden, die aus tierischen und pilzlichen PATs nicht bekannt ist. Diese N-terminale Domäne besteht aus mehreren basischen Aminosäuren und Glycin-Resten und wird daher als BG Domäne bezeichnet (Batistič 2012). Bis auf die DHHC-CRD Domäne sind die Funktionen der anderen Motive der pflanzlichen PATs bisher jedoch nicht untersucht worden.

Tabelle 1: Die Motive der PATs und ihre möglichen Funktionen. Die Tabelle fasst die verschiedenen Motive der PAT-Enzyme zusammen und gibt an, in welchen *Arabidopsis* PATs sie gefunden wurden. Zusätzlich sind bereits durchgeführte Aminosäuresubstitutionen in diesen Motiven und deren Effekte angegeben. Diese Effekte erlauben Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der jeweiligen Motive.

Motiv	Vorkommen in AtPATs	Mutationen und deren Effekte	Funktion
DHHC-CRD	PAT01 - 24 (Batistič 2012)	AtPAT24 ^{DHHA} : keine Autoacylierung in Hefe (Hemsley et al. 2005) AtPAT10 ^{DHHA} : keine Autoacylierung <i>in vitro</i> ; keine Komplementation des <i>pat10</i> Phänotyps (Qi et al. 2013) Hefe PAT Pfa4p ^{DHHA} : S-acyliert bei Überexpression noch ihr Substrat in Hefe (González Montoro et al. 2015) Hefe PAT Pfa4p ^{DHHR} : S-acyliert bei Überexpression noch ihr Substrat in Hefe (González Montoro et al. 2015)	Verantwortlich für die katalytische Aktivität einiger, aber nicht aller PATs; potentiell Zn ²⁺ Koordination
[KR]PPR (liegt innerhalb der DHHC-CRD Domäne)	PAT01 - 09, 12, 13, 16 Verändert in PAT10, 11, 14, 15, 17, 23, 24 Nicht vorhanden in PAT18 - 22 (Batistič 2012)	Hefe PAT Erf2p ^{APPR} : kein Effekt (Mitchell et al. 2010) Hefe PAT Erf2p ^{RPPA} : keine Komplementation des Hefe <i>Ras2</i> Wachstumsphänotyps (Mitchell et al. 2010) In AtPATs nicht untersucht	Essentiell für die katalytische Aktivität der Hefe PAT Erf2p
DPG	PAT01 - 9, 12 - 17, 19, 21, 23, 24 Verändert in PAT10, 18, 20, 22 Nicht vorhanden in PAT11 (Batistič 2012)	Hefe PAT Erf2p ^{APG} : kein Effekt (Mitchell et al. 2010) Hefe PAT Erf2p ^{DAG} : kein Effekt (Mitchell et al. 2010) In AtPATs nicht untersucht	Bisher keine Funktion bekannt

Motiv	Vorkommen in AtPATs	Mutationen und deren Effekte	Funktion
NxTTxE	Nx[TS]TxE in PAT01 - 10, 12 - 17, 23, 24 Verkürzt als [TS]Tx[DE] in PAT18 -22 Nicht vorhanden in PAT11 (Batistič 2012)	Hefe PAT Erf2p ^{NxTTxA} : kein Effekt (Mitchell et al. 2010) In AtPATs nicht untersucht	Bisher keine Funktion bekannt
NPY(xxGxxxN)	PAT01 - 09, 23 und 24 Verkürzt als GxxxN Motiv in PAT10, 12 - 17 Nicht vorhanden in PAT11, 18 - 22 (Batistič 2012)	Hefe PAT Swf1p ^{NPA} : keine Komplementation des Hefe <i>swf1</i> Wachstumsphänotyps und keine S-Acylierung des Substrates (González Montoro et al. 2009) In AtPATs nicht untersucht	Essentiell für die katalytische Aktivität einiger Hefe PATs
BG Domäne (bisher nur in AtPATs beschrieben)	PAT01 – 09 Nicht vorhanden in PAT10 - 24 (Batistič 2012)	Bisher nicht untersucht	Funktion noch unbekannt

1.5.1 Die PAT-Enzyme aus *A. thaliana* zeigen eine diverse subzelluläre Lokalisation

Ein Großteil der 24 *Arabidopsis* PAT-codierenden Gene wird ubiquitär im Organismus exprimiert und nur wenige zeigen eine spezifische Expression während bestimmter Entwicklungsstadien oder in bestimmten Pflanzenorganen (Batistič 2012). Zu den Gewebe-spezifisch exprimierten Genen gehört *PAT24*, welches verstärkt in Pollen exprimiert wird. Die Expression von *PAT02* erfolgt vor allem während der Blütenentwicklung (Batistič 2012). Transiente Expressionen in *Nicotiana benthamiana* Epidermiszellen haben ergeben, dass die AtPATs subzellulär an verschiedenen Membranen verteilt sind. Die Hälfte der PATs ist Plasmamembran-lokalisiert (zwölf PATs), vier PATs befinden sich am ER, insgesamt sieben PATs in Golgi-Vesikeln, sechs PATs an endosomalen Kompartimenten und zwei PATs lokalisieren an der Vakuolenmembran (Abb. 7 [Batistič 2012]). Zwar zeigen die PATs aus Hefe ebenfalls eine diverse subzelluläre Verteilung, hier lokalisiert allerdings nur ein Enzym an der Plasmamembran, eins an der Vakuolenmembran, drei am ER und zwei am Golgi (Roth et al. 2002; Babu et al. 2004; Smotrys et al. 2005; Valdez-Taubas und Pelham 2005; Ohno et al. 2006). Die DHHC Enzyme aus Säugetieren oder *Drosophila melanogaster* sind überwiegend ER- oder Golgi-lokalisiert und es wurde keins dieser DHHC Enzyme am Lysosom lokalisiert, dem funktional teilweise äquivalenten Organell der pflanzlichen Vakuole (Ohno et al. 2006; Bannan et al. 2008). Dementsprechend findet in tierischen Zellen die Protein-S-Acylierung hauptsächlich am Golgi statt. Von dort aus werden die lipidmodifizierten Proteine im Anschluss über den Vesikelverkehr zu ihrem

Plasmamembran:
PAT04, 05, 06, 07, 08, 09,
12, 13, 19, 20, 21 und 22
ER:
PAT03, 15, 17, 18
Golgi-Vesikel:
PAT10, 16 und 23
**Golgi-Vesikel und
Endosomen:**
PAT14, 16, 23 und 24
Endosomen:
PAT01 und 02
Tonoplast:
PAT10 und 11

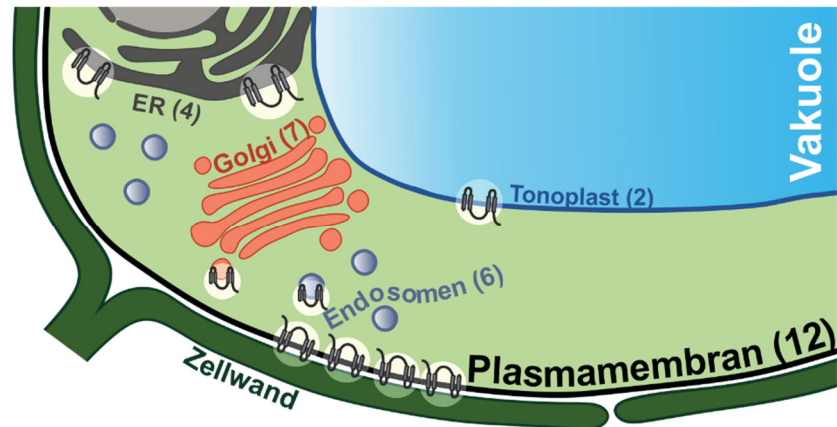


Abb. 7: Die subzelluläre Lokalisation der PATs in *A. thaliana*. Mit zwölf der 24 PATs ist der Großteil dieser Enzyme an der Plasmamembran lokalisiert. Die anderen PATs lokalisiert am endoplasmatischen Retikulum (ER), in Golgi-Vesikeln, in Endosomen oder an der Vakuolenmembran (siehe Auflistung links [Batistič 2012]). Für jedes Kompartiment bzw. die umschließende Membran ist die Anzahl der dort lokalisierten PATs in Klammern angegeben.

Zielkompartiment transportiert (Rocks et al. 2010; Batistič 2012). Durch die Plasmamembran- oder Tonoplast-lokalisierten PAT-Enzyme in Pflanzen könnte ein Mechanismus ermöglicht werden, bei dem die Substratproteine direkt an diesen Zielmembranen S-acyliert werden. Alternativ könnten pflanzliche PATs ihre Substratproteine aus dem Cytosol direkt zur Plasma- oder Vakuolenmembran rekrutieren und damit den vesikulären Proteintransport umgehen. Somit zeigen die Protein-S-Acyltransferasen aus Pflanzen, Tieren und Hefen zwar strukturelle Ähnlichkeiten, die Mechanismen der pflanzlichen Protein-S-Acylierung ist im Vergleich zu denen in Tieren und Hefen jedoch scheinbar divergent (Batistič 2012).

1.5.2 Die physiologischen Funktionen der Protein-S-Acyltransferasen in *Arabidopsis thaliana*

Die genauen physiologischen Funktionen der 24 PATs aus *A. thaliana* sind bisher noch wenig erforscht. Bisher wurden erst vier AtPATs genauer charakterisiert. Bei der Untersuchung von veränderten Wurzelhaarphänotypen verschiedener *A. thaliana* EMS-Mutanten, wurde eine Mutante entdeckt, die verkürzte und breitere, an der Basis verzweigte Wurzelhaare aufweist. Diese Mutante wurde als *TIP GROWTH DEFECTIVE 1 (tip1)* bezeichnet (Abb. 8A [Schiefelbein et al. 1993]). Erst 12 Jahre später wurde TIP1 als erste Protein-S-Acyltransferase aus *A. thaliana* beschrieben (Hemsley et al. 2005). Um eine einheitliche Nomenklatur zu etablieren, wurde TIP1 später in PAT24 umbenannt (Batistič 2012). Dabei handelt es sich um ein PAT-Enzym, welches

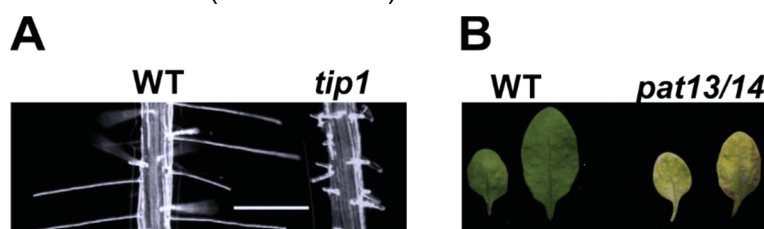


Abb. 8: Die Phänotypen der *pat24* und *pat13/14* Verlustmutanten. A: *tip1* Wurzelhaarphänotyp (aus Hemsley et al. 2005). **B:** verfrühte Seneszenz in *pat13/14* Blättern (aus Lai et al. 2015).

als Regulator bei der korrekten Ausbildung von Pflanzenzellen fungiert (Schiefelbein et al. 1993; Ryan et al. 1998; Hemsley et al. 2005).

Weiterhin wurde die Funktion der Protein-S-Acyltransferasen PAT13 und PAT14 untersucht. Diese beiden Enzyme haben eine Funktion in der Seneszenz-Regulation in *A. thaliana* Blättern. Die *pat13/14* Doppelmutante weist schon nach 3 Wochen seneszente Blätter auf (Abb. 8B [Lai et al. 2015]). Zudem generiert die Doppelmutante eine erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS), welche in der pflanzlichen Seneszenz involviert sind (Zimmermann und Zentgraf 2005; Lai et al. 2015).

1.5.3 Die Funktion der Golgi- und Tonoplast-lokalisierten Protein-S-Acyltransferase 10 aus *Arabidopsis thaliana*

Zwei der insgesamt 24 Protein-S-Acyltransferasen aus *A. thaliana* sind an der vakuolären Membran lokalisiert, PAT10 und PAT11. PAT10 weist im Gegensatz zu PAT11 eine duale Lokalisation auf, da sie zusätzlich zur Tonoplast-Lokalisation auch an Golgi-Vesikeln zu finden ist (Batistič 2012; Qi et al. 2013). Ob PAT10 an beiden Membranen Substratproteine S-acyliert, ist jedoch nicht bekannt. Das *AtPAT10* Gen wird ubiquitär exprimiert und wird es ausgeschaltet, hat dies pleiotropische Auswirkungen in *A. thaliana* (Batistič 2012; Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013). Die *pat10* Pflanzen bilden Nekrosen im Bereich der Blattspitzen, zeigen Verzögerungen in ihrer Entwicklung und sind kleiner als Wildtyp-Pflanzen (Abb. 9A). Dies ist auf eine geringere Anzahl von Zellen und eine reduzierte Zellexpansion und -teilung zurückzuführen (Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013). Zudem führt das Ausschalten von *PAT10* zu einer reduzierten Anzahl keimender Pollenkörner, die entstehenden Pollenschläuche sind kürzer und der Embryosack zeigt nach der Befruchtung eine graduelle Degeneration (Zhou et al. 2013). Darüber hinaus ist die Entwicklung der Leitbündel und interfazikulären Gewebe in *pat10* Pflanzen gestört (Qi et al. 2013; Zhou et

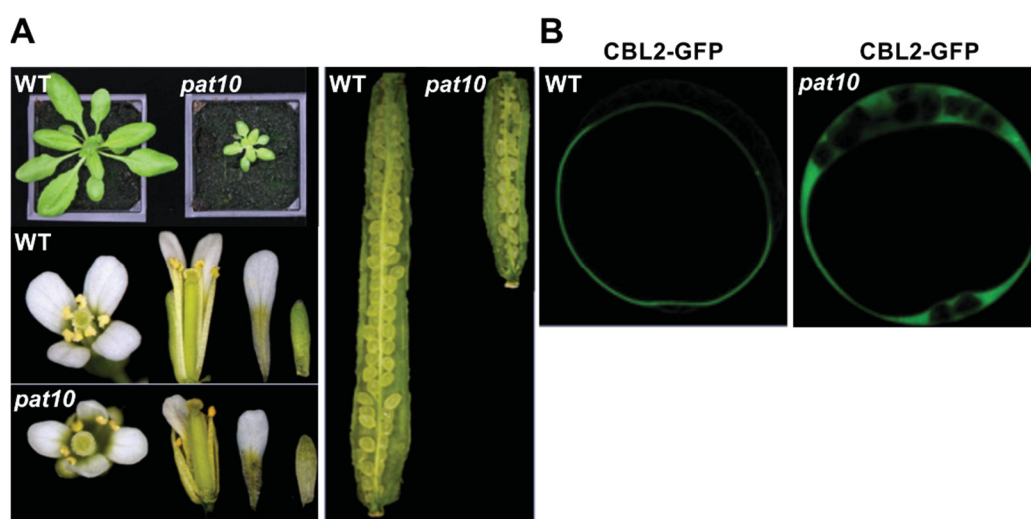


Abb. 9: Die phänotypischen Merkmale der *pat10* Verlustmutanten. **A:** Im Vergleich zu *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (WT) sind *pat10* Pflanzen kleiner und zeigen eine eingeschränkte Entwicklung der Reproduktionsorgane (aus Qi et al., 2013). **B:** In *Arabidopsis* Wildtyp (WT)-Protoplasten ist CBL2-GFP Tonoplast-lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigt CBL2-GFP eine cytosolische Lokalisation in Protoplasten der *pat10* Pflanzen (aus Zhou et al. 2013).

al. 2013). Ein PAT10 Protein, welches eine Mutation in der zentralen DHHC-CRD Domäne beinhaltet (PAT10^{DHHA}), komplementiert diese diversen Entwicklungsstörungen der *pat10* Pflanzen nicht (Qi et al. 2013). Dies ist somit ein Hinweis darauf, dass die S-Acyltransferase-Aktivität von PAT10 essentiell für die korrekte Entwicklung der Pflanzen ist. Ein Funktionsverlust von PAT10 führt bei *A. thaliana* außerdem zu einer hypersensitiven Reaktion auf Salzstress. Bei erhöhten Konzentrationen von Natriumchlorid (NaCl) und Lithiumchlorid (LiCl) zeigen *pat10* Pflanzen ein stärker eingeschränktes Wachstum als Wildtyp-Pflanzen. Zudem sind einige Salzstress-induzierte Gene in *pat10* Pflanzen stärker exprimiert als im Wildtyp (Zhou et al. 2013). Die Assoziation von PAT10 mit der Vakuolenmembran führte zu der Annahme, dass die Substratproteine dieses Enzyms durch S-Acylierung ebenfalls an den Tonoplast gebunden werden (Batistič 2012). Bekannte Zielproteine von PATs sind Mitglieder einer Gruppe von Calcium-bindenden Proteinen, die Calcineurin B-ähnlichen Proteine (*Calcineurin B-like proteins*, CBLs). Einige der CBLs werden aufgrund einer S-Acylierung im Tonoplasten verankert (Batistič et al. 2008; Batistič und Kudla 2009; Batistič et al. 2012). Diese Tonoplast-lokaliserten CBLs 2, 3 und 6 zeigen in *pat10* Protoplasten keine Assoziation mit der vakuolären Membran und stellen daher Substratproteine der Protein-S-Acyltransferase PAT10 dar (Abb. 9B [Batistič 2012; Zhou et al. 2013]).

1.6 Vorgehensweisen zur Untersuchung der Protein-S-Acylierung

1.6.1 Inhibition der Protein-S-Acylierung durch den Einsatz von Chemikalien

Die lipidbasierten Chemikalien Cerulenin, Tunicamycin, 2-Fluorpalmitat und 2-Brompalmitat können dazu genutzt werden, die S-Acylierung von Proteinen direkt zu untersuchen. Sie fungieren jedoch nicht als spezifische S-Acylierungsinhibitoren (DeJesus und Bizzozero 2002; Draper und Smith 2009). Es wurde bereits eine S-Acylierungsinhibition des Myelin Proteolipid Protein (PLP) aus Rattenhirn und kleiner G-Proteine (p21) aus humaner Zellkultur durch den Einsatz des Antibiotikums Cerulenin nachgewiesen (Lawrence et al. 1999; DeJesus und Bizzozero 2002). Der Mechanismus der Inhibition durch Cerulenin ist nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass die Thiolgruppen von PAT-Enzymen und Substratproteinen kovalent alkyliert werden und der S-Acylierungsprozess dadurch unterbunden wird (DeJesus und Bizzozero 2002; Draper und Smith 2009). Cerulenin inhibiert neben der Protein-S-Acylierung allerdings auch die Sterol- und Fettsäuresynthese (Nomura et al. 1972; Draper und Smith 2009). Das bakterielle Toxin Tunicamycin wird hauptsächlich zur Inhibition der N-Glykosylierung von Proteinen verwendet (Tkacz und Lampen 1975; Draper und Smith 2009; Bull und Thiede 2012). Darüber hinaus wurde bereits eine Inhibition der S-Acylierung neuronaler Proteine bei Zugabe von Tunicamycin beobachtet (Patterson und Skene 1994; DeJesus und Bizzozero 2002; Draper und Smith 2009). Wie dieses Toxin die S-Acylierung von Proteinen inhibiert, ist jedoch unbekannt. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Palmitoyl-CoA, kompetiert Tunicamycin

möglicherweise mit diesem Lipiddonor um die Bindung an die PATs (Patterson und Skene 1994; Resh 2006; Draper und Smith 2009).

2-Fluorpalmitat (2-FI) und 2-Brompalmitat (2-Br) sind Analoga der Palmitinsäure. Zunächst wurde angenommen, dass 2-Br in der Zelle anstelle des Palmitats auf Substratproteine übertragen werden kann. Aufgrund der niedrigeren Hydrophobizität des 2-Br im Vergleich zum Palmitat, kann das 2-brompalmitylierte Protein jedoch nicht in Membranen verankert werden (Draper und Smith 2009). Inzwischen wird jedoch eine irreversible Alkylierung von Proteinen durch 2-Br vermutet. Dabei werden Cysteinreste durch die elektrophile α -Halo-Carbonyl-Gruppe des 2-Br S-alkyliert. In dem Fall bildet sich keine reversible Thioesterbindung wie bei der S-Acylierung, sondern eine stabile und irreversible S-Alkylierung. Durch die Irreversibilität der S-Alkylierung ist der Transfer von 2-Br durch das PAT-Enzym auf das Substratprotein nicht möglich (Davda et al. 2013). Für das 2-FI wird eine Funktionsweise ähnlich zum 2-Br vermutet, bisher wurde jedoch noch keine Inhibition der S-Acylierung durch Verwendung von 2-FI gezeigt (DeJesus und Bizzozero 2002). Durch 2-Br werden auch reaktive Cysteine anderer Proteine unspezifisch alkyliert. Somit bewirkt auch diese Substanz keine spezifische Inhibition der Protein-S-Acylierung. Es werden unter anderem auch Mono-, Di-, und Triacylglycerol Transferasen oder auch Fettsäure-CoA-Ligasen inhibiert. Aber auch Enzyme, die keine Lipide übertragen oder im Lipid-Metabolismus involviert sind, wie zum Beispiel NADPH Cytochrom-C Reduktasen und Glucose-6-Phosphatasen werden durch 2-Br unspezifisch inhibiert (Coleman et al. 1992; Davda et al. 2013). Bei der Interpretation von Ergebnissen, die aus Versuchen mit diesen unspezifischen Inhibitoren resultieren, sollte die unspezifische Reaktivität der Inhibitoren somit unbedingt berücksichtigt werden, insbesondere bei Phänotypen, die durch 2-Br induziert werden (Davda et al. 2013).

In Pflanzen wurde die Inhibition der Protein-S-Acylierung bisher ausschließlich mit 2-Br durchgeführt (Hemsley und Grierson 2008). Die Plasmamembran-Lokalisation GTP-bindender Proteine aus *A. thaliana* beispielsweise, RAC7, 8 und 10, wird bei Zugabe von 2-Br verhindert. Dies korreliert mit der cytoplasmatischen Lokalisation dieser Proteine, wenn zwei Cysteine mutiert sind, die als S-Acylierungsstellen vermutet werden (Lavy et al. 2002).

Auf der Suche nach Chemikalien, die die Protein-S-Acylierung spezifisch inhibieren, wurden zellbasierte Substanzscreenings durchgeführt. Dabei wurden verschiedene chemische nicht-lipidbasierte Verbindungen gefunden, die als Komponenten I bis V bezeichnet wurden (Ducker et al. 2006). Diese Komponenten zeigten einen Einfluss auf die Lokalisation eines Farnesyl-S-Acyl-GFP Fusionsproteins (Komponenten I bis IV) oder eines Myristyl-S-Acyl-GFP Fusionsproteins (Komponente V [Ducker et al. 2006; Lobo Planey 2013]). Da diese Fusionsproteine jedoch kombinierte Lipidmodifikationsmotive aufweisen, wurde eine spezifische Inhibition der S-Acylierung nicht nachgewiesen. Zudem konnte die inhibitorische Wirkung der Komponenten I bis IV anhand der Autoacylierung von PAT-Enzymen *in vitro* aus einer anderen Studie nicht bestätigt werden (Jennings et al. 2009). Lediglich Komponente V wies eine reversible Inhibition der PAT-

Autoacylierung auf, die jedoch im Vergleich zu 2-Br schwächer ausgeprägt war (Jennings et al. 2009; Lobo Planey 2013).

Trotz vieler Untersuchungen zu Inhibitoren der Protein-S-Acylierung wurde bislang noch keine chemische Verbindung gefunden, die als spezifisch inhibierende Substanz eingesetzt werden kann. Zur Erforschung der Protein-S-Acylierung hat sich der Einsatz von 2-Br als konventioneller Inhibitor etabliert (Davda et al. 2013).

1.6.2 Methoden zum Nachweis der Protein-S-Acylierung

Um die Autoacylierung von PAT-Enzymen und die S-Acylierung von Proteinen nachzuweisen, wurden verschiedene Techniken entwickelt. Eine oft angewendete Methode ist das Arbeiten mit radioaktiv markierten Lipiden, wie [³H] Palmitat oder ¹²⁵I-IC16 Palmitat (16-Jod-Hexadecansäure [Resh 2006]). Um die S-Acylierung *in vivo* zu untersuchen, werden die radioaktiven Lipide Zellkulturen appliziert und können so von den Zellen metabolisiert werden. Proteine, die radioaktiv markierte Lipide gebunden haben, werden autoradiografisch detektiert. Es lassen sich somit sowohl die PAT-Autoacylierung, als auch die S-Acylierung von Substraten autoradiografisch nachweisen (Resh 2006; Draper und Smith 2009). Auf diese Weise lässt sich die Protein-S-Acylierung zwar in lebenden Zellen untersuchen, die Bindung des radioaktiven Materials an die Proteine und auch die autoradiografische Aufnahme der Signale sind jedoch mit großem Zeitaufwand verbunden (Draper und Smith 2009). Um das Arbeiten mit radioaktivem Material zu umgehen, wurde die sogenannte ABE Methode (*acyl-biotin exchange*) zur

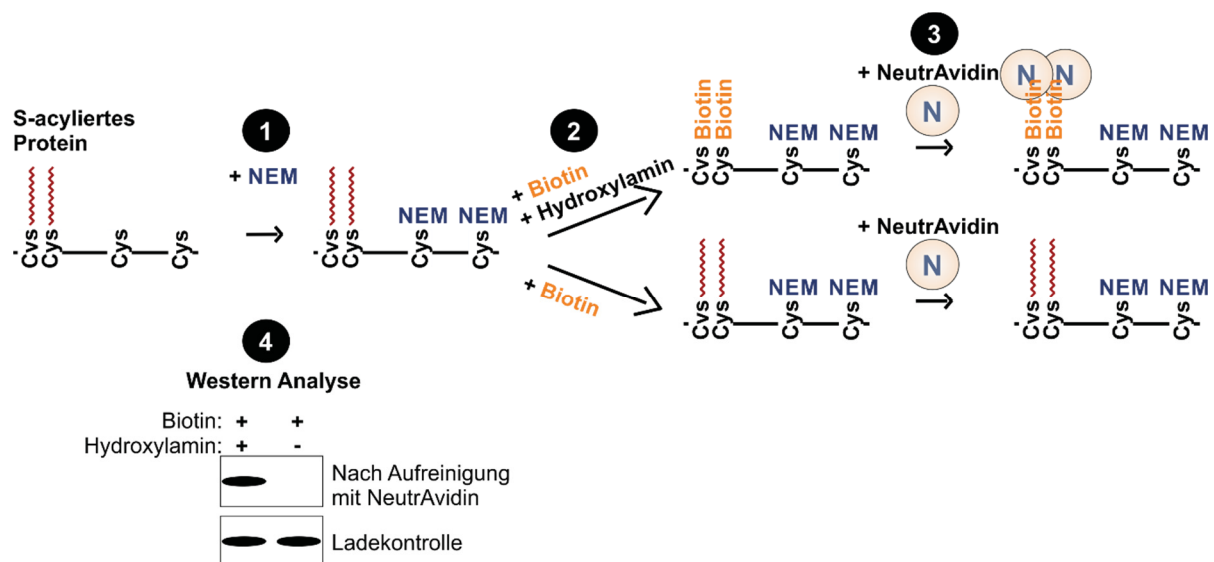


Abb. 10: Schema der Biotin Switch Methode. Mit dieser Methode kann die S-Acylierung von Proteinen biochemisch nachgewiesen werden. 1. Durch die Zugabe von N-Ethylmaleimid (NEM) werden freie nicht-acylierte Cysteine blockiert. 2. Die Ansätze werden aufgeteilt. Zu der einen Hälfte werden Biotin und Hydroxylamin gegeben. Das Hydroxylamin entfernt die S-Acyliergruppen vom Protein und die so frei gewordenen Cysteine werden mit Biotin markiert. Zur anderen Hälfte wird nur Biotin gegeben, welches aufgrund der S-acylierten oder durch NEM blockierten Cysteine keine freien Cysteine markiert. 3. Die biotinylierten Proteine werden mit NeutrAvidin immobilisiert. 4. Die Detektion der biotinylierten Proteine erfolgt mittels Western Analyse. Bei der Ladekontrolle handelt es sich um Ansätze, die vor der Aufreinigung mit NeutrAvidin entnommen wurden (verändert aus Hemsley et al. 2008).

Untersuchung von Protein-S-Acylierungen entwickelt, die auch als *Biotin Switch* Methode bekannt ist (Abb. 10 [Drisdell und Green 2004; Hemsley et al. 2008; Charron et al. 2009]). Dabei werden zunächst freie, nicht-acylierte Thiolgruppen der Cysteinreste von Proteinen durch den Einsatz von N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Anschließend erfolgt die Entfernung der S-Acyl-Gruppen von den lipidmodifizierten Cysteinen durch die Zugabe von Hydroxylamin und die anschließende Markierung der frei gewordenen Thiolgruppen mit Biotin. Durch das vorherige Blockieren der freien Cysteine werden somit ausschließlich S-acylierte Cysteine biotinyliert. Die biotinylierten Proteine können anschließend mit einer NeutrAvidin Matrix affinitätschromatografisch aufgereinigt und detektiert werden (Hemsley et al. 2008). Durch die Anwendung der *Biotin Switch* Methode mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der biotinylierten Proteine wurden S-acylierte Proteine in Hefe, in Neuronen aus Rattenhirn und in einer humanen Prostatakrebszelllinie entdeckt (Roth et al. 2006; Kang et al. 2008; Charron et al. 2009; Yang et al. 2010; Hemsley et al. 2013). In *A. thaliana* wurden mit Hilfe dieser Methode etwa 600 S-acylierte Proteine identifiziert (Hemsley et al. 2013).

1.7 Calcineurin B-ähnliche Proteine aus *A. thaliana* als Substrate der Protein-S-Acylierung

Unter den 600 S-Acylierungssubstraten aus *A. thaliana* befinden sich Proteine, die an der Endocytose, der Organisation des Cytoskeletts oder auch an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Desweiteren wurden Proteine aus verschiedenen Signaltransduktionswegen als S-Acylierungssubstrate identifiziert, wie zum Beispiel kleine GTPasen, heterotrimere G-Proteine oder auch Proteine der Calcium-Signaltransduktion (Kim et al. 2005; Adjobo-Hermans et al. 2006; Sorek et al. 2007; Batistič et al. 2008; Hemsley 2009; Hemsley et al. 2013).

Weitere Substrate der Protein-S-Acylierung in *A. thaliana* sind Mitglieder der CBL-Familie. Diese Calciumsensor-Proteine sind ein Bestandteil der pflanzlichen Calcium-Signaltransduktion (Kolukisaoglu et al. 2004). Die zehn CBLs aus *A. thaliana* bilden zusammen mit 26 spezifisch interagierenden Proteinkinasen, den CIPKs (CBL-interagierende Proteinkinasen) ein komplexes Netzwerk, welches an der Wahrnehmung und Weiterleitung zellulärer Calcium-Signale beteiligt ist (Kudla et al. 1999; Kolukisaoglu et al. 2004; Batistič und Kudla 2009; Batistič et al. 2010). Als Calcium-Signale werden temporäre und lokale Konzentrationsänderungen des zentralen Botenstoffs Calcium (Ca^{2+}) beschrieben. Sie können unter anderem als Reaktion auf verschiedene biotische oder abiotische Reize aus der Umwelt entstehen. Durch die Wahrnehmung und Weiterleitung dieser Calcium-Signale wird eine Anpassung des Organismus an sich ändernde Umweltbedingungen ermöglicht (Sanders et al. 2002; Steinhorst und Kudla 2013).

Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen erfolgt in CBLs über typische Ca^{2+} -Bindemotive, die sogenannten EF-Hand-Motive. Die CBLs besitzen keine eigene enzymatische Aktivität, bilden über eine spezifische Interaktion mit den CIPKs aber einen katalytisch aktiven Interaktionskomplex. Das

Calcium-Signal wird somit von den CBLs wahrgenommen, während die CIPKs das Calcium-Signal mit Hilfe ihrer Kinaseaktivität durch Phosphorylierung ihrer Substratproteine weiterleiten können (Shi et al. 1999; Steinhorst und Kudla 2013). Die zehn *A. thaliana* CBLs sind subzellulär unterschiedlich lokalisiert und rekrutieren die cytoplasmatisch lokalisierten CIPKs an verschiedene Membranen in der Zelle. Vermittelt wird die Lokalisation der CBLs über ihre N-Termini (Abb. 11 [Batistič et al. 2010]). CBL1, 4, 5 und 9 weisen ein N-terminales duales Lipidmodifikationsmotiv mit einer N-Myristylierungsstelle und angrenzendem S-Acylierungsmotiv auf (MGCXXS [Batistič und Kudla, 2009; Batistič et al. 2010]). Die duale Lipidmodifikation von CBL1 vermittelt die Plasmamembranbindung und ist für die korrekte Funktion des Calciumsensors essentiell. Die Myristylierung ist dabei Voraussetzung für die S-Acylierung, da ein verändertes Protein ohne Glycinrest an Position 2, aber mit vorhandenem S-acylierbaren Cysteinrest (CBL1^{G2A}), nicht lipidmodifiziert wird (Batistič et al. 2008). Auch die CBLs 4, 5 und 9 sind Plasmamembran-assoziiert und es wird ein ähnlicher Mechanismus der Plasmamembranbindung dieser Proteine vermutet (Batistič et al. 2010). Im Gegensatz zu den Plasmamembran-lokalisierten Calciumsensoren besitzen die CBLs 2, -3, -6 und -7 kein Myristylierungsmotiv (Batistič und Kudla, 2009; Batistič et al. 2010). In den N-Termini von CBL2, -3 und -6 sind jeweils drei S-acylierbare Cysteinreste vorhanden. (Batistič 2012). Diese drei CBLs sind am Tonoplasten der Pflanzenzellen lokalisiert (Batistič et al. 2012). Studien mit CBL2 haben

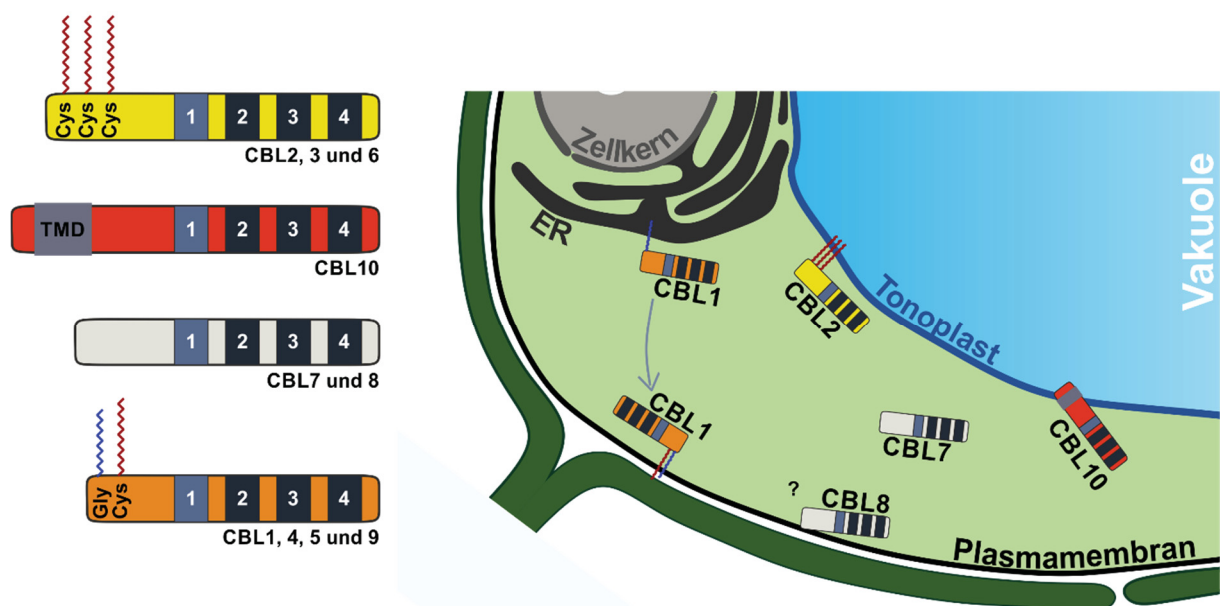


Abb. 11: Die N-Termini der CBLs bestimmen ihre subzelluläre Lokalisation. Die drei CBLs 2, 3 und 6 werden durch die S-Acylierung an drei N-terminal positionierten Cysteinen an den Tonoplasten gebunden. In der Zelle ist beispielhaft nur CBL2 dargestellt. Die Tonoplastbindung von CBL10 erfolgt vermutlich über eine Transmembrandomäne (TMD [Batistič et al. 2010]). CBL7 und 8 besitzen keine bekannten N-terminalen Lipidmodifikationsmotive. CBL7 verbleibt im Cytosol und der Mechanismus der Plasmamembranbindung von CBL8 ist noch unbekannt. Die Plasmamembran-lokalisierten CBLs 1, 4, 5 und 9 besitzen ein duales Lipidmodifikationsmotiv (N-Myristylierung und S-Acylierung [Batistič et al. 2010]). Beispielhaft ist CBL1 gezeigt, welches durch N-Myristylierung an das ER gebunden wird und durch zusätzliche S-Acylierung in der Plasmamembran verankert wird (Batistič et al. 2008). Alle CBLs besitzen vier EF-Hand-Motive (1-4), mit denen sie Ca²⁺-Ionen koordinieren. Die erste EF-Hand unterscheidet sich von den anderen, da sie aus 14 Aminosäuren anstatt zwölf Aminosäuren besteht (Batistič und Kudla 2004).

ergeben, dass die N-terminalen Cysteine S-acyliert werden und der Calciumsensor dadurch an die Vakuolenmembran gebunden wird. Darüber hinaus wurde mittels Massenspektrometrie die Bindung der Fettsäuren Palmitat und Stearat an dieses Protein nachgewiesen (Batistič et al. 2012). Beim Sequenzvergleich der N-Termini der AtCBLs 2, 3 und 6 und weiteren potentiell Tonoplast-lokalisierten CBLs aus anderen Pflanzenarten (*Oryza sativa*, *Picea sitchensis*, *Phaseolus vulgaris* und *Vitis vinifera*) wird deutlich, dass zwei Cysteinreste (an Position 4 und 18) konserviert sind. Während AtCBL2 und 3 an Position 12 einen weiteren Cysteinrest aufweisen, besitzt AtCBL6 das dritte S-acylierbare Cystein an Position 19. Somit unterscheidet sich die Anordnung der potentiellen S-Acylierungsmotive in den drei Tonoplast-lokalisierten CBLs (Batistič et al. 2012).

Durch ihre subzellulär diversen Lokalisationen und ihre Interaktion mit verschiedenen CIPKs tragen die CBLs zu einem komplexen Signalnetzwerk bei, welches die simultane Decodierung verschiedener Ca^{2+} -Signale an unterschiedlichen Ca^{2+} -Speichern in der Zelle ermöglicht und damit zu einer spezifischen Antwort der Pflanze auf die jeweiligen Reize beiträgt (Batistič et al. 2010; Schlücking et al. 2013).

1.7.1 Die Funktion der Tonoplast-lokalisierten Calciumsensor-Proteine CBL2 und CBL3

Die Gene von CBL2 und CBL3 sind vor allem in Wurzeln, aber auch in oberirdischen Geweben wie Blättern oder Blüten exprimiert (Tang et al. 2012; Eckert et al. 2014). Unterschiede zeigen sich dabei in den Blüten, wo *CBL2* größtenteils in den Antheren und im Stigma exprimiert ist, *CBL3* hingegen eine starke Expression in der vollständigen Blüte zeigt (Eckert et al. 2014). Desweiteren wurde bereits eine starke Expression von *CBL2*, aber nicht von *CBL3*, in Schließzellen von *A. thaliana* Kotyledonen beobachtet (Tang et al. 2012). *CBL2* und *CBL3* sind außerdem in Pollen und Pollenschläuchen exprimiert, wobei *CBL3* hier eine deutlich stärkere Expression aufweist (Mähs et al. 2013). Damit korrelierend wurde eine Funktion beider Proteine in der Keimung von Pollenschläuchen, sowie im polaren Pollenschlauchwachstum festgestellt (Steinhorst et al. 2015).

Darüber hinaus sind CBL2 und CBL3 für die korrekte Pflanzenentwicklung und -reproduktion essentiell. So resultiert der gleichzeitige Funktionsverlust beider Proteine in einer *A. thaliana* *cb1/2/3* Doppelmutante in einem deutlich sichtbaren Phänotyp, der durch zwergwüchsige Pflanzen mit nekrotischen Blattspitzen, kleineren Samen und verminderter Samenbildung, kürzeren Antheren und Defekten in der Embryonalentwicklung gekennzeichnet ist (Abb. 12 [(Tang et al. 2012; Eckert et al. 2014)]). Neben ihrer Funktion in der pflanzlichen Entwicklung und Reproduktion, sind CBL2 und CBL3 auch am Transport von Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) in die Vakuole beteiligt (Tang et al. 2015). Durch die Funktion beider Calciumsensoren kann eine cytotoxische Mg^{2+} -Anreicherung im Cytoplasma bei hoher Mg^{2+} -Konzentration im Boden verhindert werden (Tang et al. 2015). Mit 92 % identischer Aminosäuresequenz sind sich CBL2 und CBL3 sehr ähnlich und die oben beschriebenen phänotypischen Eigenschaften der *cb1/2/3*

Pflanzen treten nur dann auf, wenn beide Calciumsensoren fehlen. Bei einem Funktionsverlust von nur einem der beiden CBLs kann das vorhandene CBL die Funktion des fehlenden Calciumsensors unter normalen Wachstumsbedingungen wahrscheinlich teilweise kompensieren und die Phänotypen der Einzelmutanten ähneln dem von nicht-gestressten Wildtyp-Pflanzen (Kolukisaoglu et al. 2004; Batistič et al. 2012; Tang et al. 2012; Eckert et al. 2014). CBL2 und CBL3 sind funktional allerdings nur teilweise redundant und unter bestimmten Stressbedingungen wurden auch *cb12*- oder *cb13*-spezifische Phänotypen beobachtet. So zeigen *cb13* Pflanzen einen K^+ -Mangel-toleranten Phänotyp, während *cb12* und Wildtyp-Pflanzen bei K^+ -Mangel eine deutlich sichtbare Chlorose aufweisen (Liu et al. 2013). CBL3 ist also für die pflanzliche Kalium (K^+)-Homöostase essentiell. *A. thaliana* *cb12* Verlustmutanten zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine hypersensitive Reaktion in Anwesenheit des Phytohormons Abscisinsäure (ABA [Batistič et al. 2012]). CBL2 ist somit an der Wahrnehmung und Weiterleitung von Ca^{2+} -Signalen aus der Vakuole beteiligt, die durch das Phytohormon ABA induziert werden. Dieser *cb12* Phänotyp kann nur durch ein S-acylierbares CBL2 komplementiert werden, wodurch die Relevanz der S-Acylierung für die korrekte Funktion von CBL2 verdeutlicht wird (Batistič et al. 2012).



Abb. 12: Die phänotypischen Merkmale der *Arabidopsis* *cb12/3* Doppelmutante. Der Verlust der Calciumsensoren CBL2 und 3 führt zu kleineren Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem sind die Entwicklung der Reproduktionsorgane und der Samen beeinträchtigt. Maßstabskala: 10 mm (aus Eckert et al. 2014).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

In *Arabidopsis thaliana* wurden 24 Protein-S-Acyltransferasen und über 600 S-acylierte Proteine identifiziert (Batistič 2012; Hemsley et al. 2013). Über die physiologischen Funktionen der pflanzlichen PAT-Enzyme und die Identität ihrer Substrate ist jedoch noch nicht viel bekannt. Es ist zwar möglich, die Substrat-spezifische S-Acylierung mit Hilfe von *A. thaliana* Mutantenlinien zu untersuchen, bei denen jeweils ein PAT-codierendes Gen durch T-DNA-Insertion zerstört wurde. Jedoch können einige Substrate nicht-selektiv von verschiedenen PAT-Enzymen S-acyliert werden, was die Untersuchung von *pat* Mehrfachmutanten notwendig macht (Hou et al. 2009). Es ist allerdings nicht bekannt, welche PAT-Enzyme funktional überlappend sind und ausgeschaltet werden müssen. Aufgrund dieser sich teilweise überschneidenden Aktivität der PATs, waren zu Beginn dieser Arbeit keine *in planta* Methoden bekannt, mit denen die S-

Acylierung bestimmter Substrate auf die Aktivität einzelner PATs direkt zurückgeführt werden konnte. Aus diesem Grund sollte hier eine Methode zur Ermittlung funktionaler PAT-Enzym-Substrat Kombinationen entwickelt werden. Als S-Acylierungssubstrat wurde hierzu das Tonoplast-lokalisierte Calciumsensor-Protein CBL2 ausgewählt. Aufgrund sichtbarer Lokalisationsänderungen im S-acylierten und nicht-acylierten Zustand, sowie des Fehlens weiterer Lipidmodifikationsmotive, eignet sich dieser Calciumsensor zur genaueren Untersuchung der Protein-S-Acylierung an der Vakuolenmembran (Batistič et al. 2012). Das Protein sollte in einem Expressionssystem mit reduzierter endogener S-Acylierungsaktivität überexprimiert werden. Dazu eignet sich die Expression in der Hefe *S. cerevisiae*. Diese besitzt sieben PAT-Enzyme und bleibt aber auch dann überlebensfähig, wenn sechs dieser Enzyme nicht funktional sind (Roth et al. 2006; Hou et al. 2009). Durch die stark verringerte endogene Protein-S-Acylierung in der Hefe *pat* Sechsfachmutante, kann möglicherweise ein nicht-acylierter Zustand des überexprimierten pflanzlichen Substrats erreicht werden. In dem Fall können durch die Koexpression verschiedener PAT-Enzyme zusammen mit CBL2 in Hefezellen, mögliche CBL2-S-acylierende PAT-Enzyme ermittelt werden. *In planta* ist die Inhibition der endogenen S-Acylierungsmaschinerie durch den Einsatz von 2-Brompalmitat (2-Br) möglich (Lavy et al. 2002; Hemsley und Grierson 2008; Batistič et al. 2012). Aus diesem Grund sollte die Inhibition der endogenen S-Acylierung durch 2-Br und die gleichzeitige Koexpression von AtPATs und CBL2 in epidermalen Zellen von *N. benthamiana* versucht werden. Möglicherweise können so funktionale PAT-Enzym-Substrat Paare *in planta* ermittelt werden. Durch Etablierung dieser neuen Methoden wäre zukünftig nicht nur die Identifikation bestimmter Substrat-S-acylierender PAT-Enzyme *in vivo* möglich. Auch kann der Mechanismus der Substrat-spezifischen S-Acylierung anhand bestimmter PAT-Enzym-Substrat Paare damit untersucht werden.

2 Material

2.1 Wachstumsmedien

2.1.1 Medien für *Escherichia coli*

Lysogeny Broth (LB)-Medium:

1 % (w/v)	NaCl
1 % (w/v)	Bactotrypton
0.5 % (w/v)	Hefeextrakt

Für LB-Festmedium wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf etwa 60 °C heruntergekühlt, bevor die jeweiligen Antibiotika hinzugefügt wurden.

Antibiotika Arbeitskonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml

2.1.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast extract Peptone Dextrose (YPD)-Medium:

2 % (w/v)	Pepton
1 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	Glucose

Die Glucose Lösung wurde separat angesetzt und die Lösungen nach dem Autoklavieren gemischt. Für YPD-Festmedium wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar hinzugegeben.

Synthetic Defined (SD)-Medium:

0,67 % (w/v)	Yeast Nitrogen Base (YNB)
2 % (w/v)	Glucose
	Complete Supplement Mixture (CSM; Aminosäure Supplementation) den Herstellerangaben entsprechend

Die Glucose Lösung wurde separat angesetzt und die Lösungen nach dem Autoklavieren gemischt. Für SD-Festmedium wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar hinzugegeben.

2.1.3 Medien für *Agrobacterium tumefaciens*

Yeast Extract Broth (YEB)-Medium:

0,5 % (w/v)	Rinderextrakt
0,1 % (w/v)	Hefeextrakt
0,1 % (w/v)	Pepton
0,5 % (w/v)	Saccharose

Der pH wurde mit NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt. Für YEB-Festmedium wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf etwa 60 °C heruntergekühlt, bevor 2 mM steriles MgSO₄ und die jeweiligen Antibiotika hinzugegeben wurden.

Antibiotika Arbeitskonzentrationen:

Kanamycin:	25 µg/ml
------------	----------

Gentamycin: 25 µg/ml
Rifampicin: 100 µg/ml

2.1.4 Medium für *Arabidopsis thaliana*

0.5 Murashige & Skoog (MS)-Festmedium:

0,22 % (w/v) MS inkl. Vitamin B5

Der pH wurde mit KOH auf 5,8 eingestellt und 0,7 % (w/v) Agar hinzugefügt.

Pflanzen Anzuchterde:

1. Einheitserde® Typ VM (Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG) für 1 Stunde bei 80 °C erhitzen
2. Erde abkühlen lassen und mit H₂O anfeuchten
3. 7,5 g pro 5 L Erde *Osmocote® Exact® Mini* Dünger (Scotts) zugeben, gut vermischen und die Erde in Töpfe füllen
4. 1 TL *Steinernema feltiae* Nematoden (SAUTTER & STEPPER GmbH) in 3 – 4 L H₂O lösen und die Erde damit benetzen

2.2 Oligonukleotide

Die hier verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA Fragmenten wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH oder der Firma Sigma-Aldrich Corporation synthetisiert. Für die einfache Amplifikation von DNA Fragmenten wurden die Oligonukleotide so konstruiert, dass die Hybridisierungstemperatur etwa 58 °C beträgt. Zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur wurde das Programm OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) verwendet. Für DNA-Mutagenesen wurden die Oligonukleotide den Angaben des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene California entsprechend konstruiert, sodass diese eine Hybridisierungstemperatur von mindestens 78 °C aufweisen, die gewünschte Mutation möglichst mittig liegt und der Guanin Cytosin (GC)-Gehalt mindestens 40 % beträgt. Die hier verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle A1 (siehe Anhang) zusammengefasst.

2.3 Plasmide

In dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide für die transiente oder stabile Proteinexpressionen *in planta* oder für die Proteinexpression in Hefezellen verwendet. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Plasmide zeigt die Tabelle A2 (siehe Anhang).

2.4 Verwendete rekombinante DNA

Eine detaillierte Auflistung der hier generierten rekombinanten DNA, bei der die jeweilige cDNA der entsprechenden Gene nach enzymatischer Restriktion in verschiedene Plasmide ligiert wurde, findet sich in Tabelle A3 (siehe Anhang).

2.5 Organismen

2.5.1 *Escherichia coli*

Zur Plasmidgeneration und -vervielfältigung wurden zwei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet (Tab. 2). Der *E. coli* Stamm SURE wurde ausschließlich bei Plasmiden mit Ampicillin Resistenzgen verwendet, da im Genom dieses Stamms das Kanamycin Resistenzgen vorhanden und somit keine Selektion auf Kanamycin Medium möglich ist.

Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme. Zusätzlich sind der jeweilige Genotyp und die Quellenangaben aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Quelle
XL1-BLUE	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lac^r ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Bullock et al. 1987
SURE	<i>e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan^r) uvrC[F'proAB lac^r ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Doherty et al. 1993

2.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für transiente Proteinexpressionen in *Nicotiana benthamiana* und *Arabidopsis thaliana* und stabile Proteinexpressionen in *A. thaliana* wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 pMP90 verwendet (Koncz und Schell 1986). Zur effizienteren transienten Proteinexpression wurde zusätzlich der Stamm 19K co-infiltriert, der durch das p19 Protein als Suppressor des Gen-Silencing fungiert (Voinnet et al. 2003).

2.5.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Proteinexpression in Hefezellen wurden verschiedene Hefe Protein-S-Acyltransferase (PATp) Einfach- oder Mehrfach-Funktionsverlustmutanten, sowie der zugehörige Wildtyp-Hefestamm verwendet (Tab. 3). In den Einzel- und Mehrfachmutanten wurden verschiedene *PAT* Gene deletiert. In den beiden Hefe *pat* Sechsfachmutanten liegt jeweils das Hefe PAT Gen *ERF2* oder *SWF1* unter der Kontrolle eines induzierbaren Galactokinase 1 (GAL1) Promotors vor. Somit sind hier sechs der sieben Hefe PATs ausschließlich auf Galactose-freiem Medium ausgeschaltet.

Tabelle 3: Die verschiedenen *S. cerevisiae pat* Einzel- und Mehrfachmutanten mit zugehörigem Wildtyp-Stamm. Aufgelistet sind zusätzlich der jeweilige Genotyp des Hefestamms und die Quellenangaben.

Stamm	Genotyp	Quelle
LRB759	<i>MATα ura3-52 leu2 his3</i>	(Panek et al. 1997; Roth et al. 2002, Roth et al. 2006)
<i>erf2Δ</i>	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 erf2Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>swf1</i> Δ	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 swf1Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006
<i>akr1</i> Δ	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 akr1Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006
<i>akr2</i> Δ	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 akr2Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006
<i>pfa3</i> Δ	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pfa3Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006
<i>pfa4</i> Δ	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pfa4Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006
<i>pfa5</i> Δ	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 pfa5Δ::kanMX</i>	Roth et al. 2006
NDY1695 (Hefe PAT Vierfachmutante)	<i>MATα ura3-52 leu2 his3 akr2Δ pfa3Δ pfa4Δ pfa5Δ::G418^R lys2Δ::YCK2(CCIIS)</i>	Roth et al. 2006
NDY1690 (Hefe PAT Fünffachmutante)	<i>MATα ura3-52 leu2 his3 akr1Δ akr2Δ pfa3Δ pfa4Δ pfa5Δ::G418^R lys2Δ::YCK2(CCIIS)</i>	Roth et al. 2006
NDY1693 (Hefe PAT Sechsfachmutante)	<i>MATα ura3-52 leu2 his3 akr1Δ akr2Δ pfa3Δ pfa4Δ pfa5Δ::G418^R GAL1_P-ERF2 lys2Δ::YCK2(CCIIS)</i>	Roth et al. 2006
NDY1712 (Hefe PAT Sechsfachmutante)	<i>MATα ura3-52 leu2 his3 akr1Δ akr2Δ pfa3Δ pfa4Δ pfa5Δ::G418^R GAL1_P-SWF1 lys2Δ::YCK2(CCIIS)</i>	Roth et al. 2006

2.5.4 Pflanzen

Zur transienten und stabilen Proteinexpression wurde der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Columbia* (Col-0) verwendet. Bei den beiden *pat10* T-DNA Insertionslinien *pat10.1* (SALK_024964) und *pat10.3* (SALK_018436) handelt es sich ebenfalls um Pflanzen des Col-0 Ökotyps (Qi et al. 2013). Transiente Proteinexpressionen in Tabak Epidermiszellen erfolgten im *Nicotiana benthamiana* Wildtyp. Zusätzlich wurden die Pollenschläuche des *Nicotiana tabacum* Wildtyps zur transienten Proteinexpression verwendet.

2.6 Antikörper

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit verschiedenen Antikörpern (Tab. 4). An die sekundären Antikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, mit der die Proteine im Anschluss sichtbar gemacht werden können.

Tabelle 4: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper. Zu jedem Antikörper sind das jeweilige Antigen, der Herstellungsorganismus, die eingesetzte Arbeitsverdünnung und der Hersteller aufgelistet.

Primärer Antikörper	Antigen	Herstellungsorganismus	Verdünnung	Hersteller
anti-GFP	Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	Ratte	1:4.000	ChromoTek GmbH

Primärer Antikörper	Antigen	Herstellungsorganismus	Verdünnung	Hersteller
mono-HA	HA-Peptid (YPYDVPDYA)	Maus	1:4.000	Covance Inc.
penta-His	6xHistidin-Pepid (HHHHHH)	Maus	1:1.000	QIAGEN GmbH
Sekundärer Antikörper	Herstellungsorganismus		Verdünnung	Hersteller
anti-Maus-HRP	Ziege		1:20.000	Bio-Rad Laboratories GmbH
anti-Ratte-HRP	Ziege		1:10.000	life technologies™

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden zur Generierung rekombinanter DNA

3.1.1 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können verschiedene DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde der Agarose der Fluoreszenzfarbstoff HDGreen+™ (Intas Science Imaging Instruments GmbH) zugegeben, wodurch gefärbte DNA unter UV-Licht fluoresziert.

1. 1 % - 2 % (w/v) Agarose mit 1 x TAE-Puffer aufkochen und auf dem Magnetrührer abkühlen lassen
2. 5 µl/100 ml HDGreen+™ zugeben und gut verrühren lassen
3. Die flüssige Agarose in einen dafür vorgesehenen Schlitten mit eingesetztem Kamm gießen und erhärten lassen
4. Agarosegel in eine Gelkammer legen, vollständig mit 1 x TAE-Puffer überschichten und den Kamm ziehen
5. Die aufzutrennenden Proben mit DNA-Ladepuffer versetzen und neben einen Längenstandard in die Geltaschen pipettieren
6. Gelelektrophorese bei einer Spannung von maximal 10 Volt/cm für 15 – 20 Minuten
7. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert

1 x TAE-Puffer:

40 mM Tris/HCl, pH 8,0
 20 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA, pH 8,0

10 x DNA-Ladepuffer:

1 M EDTA, pH 8,0
 50 % (v/v) Glycerin
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

3.1.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente müssen nach der Gelelektrophorese oder nach der Amplifikation mittels PCR gereinigt werden, um Agarose-Gelresten, Enzyme oder Salze zu entfernen. Dazu wurde das Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up der Firma MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG verwendet. Die Aufreinigung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

3.1.3 Enzymatische Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Enzymen und zugehörigem Puffer der Firma New England BioLabs® durchgeführt. Die Ansätze wurden für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei optimaler Temperatur für die jeweiligen Enzyme durchgeführt.

Restriktionsansatz (50 µl):

1 – 5 µg	DNA
5 µl	10 x CutSmart™ Puffer (+ BSA)
3 – 5 U/µg DNA	Restriktionsenzym
ad 50 µl	ddH ₂ O

3.1.4 Ligation von DNA

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente, die zueinander kompatible Überhänge aufweisen, mit Hilfe der DNA-Ligase verknüpft. Diese wurde mit dem zugehörigen Ligase-Puffer von der Firma Invitrogen™ bezogen. Die Ligationsansätze wurden für 4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 15 °C inkubiert.

Ligationsansatz (20 µl):

1 mol	Plasmid-DNA
5 mol	Insert-DNA
4 µl	5 x Ligase-Puffer
1 U	T4 DNA-Ligase

3.1.5 Fällung von DNA

Die Fällung von DNA dient der Reinigung bzw. der Konzentrierung der Nukleinsäuren. Puffer und andere Substanzen werden dabei entfernt und die DNA wird konzentriert.

1. Die Probe mit 2,5 Volumina eiskaltem 99,8 %igen Ethanol vermischen
2. Inkubation für 30 Minuten bei – 20 °C
3. Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 20.817 g
4. Der Überstand wird entfernt und das DNA-Pellet wird mit 600 µl 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen
5. Zentrifugation für weitere 10 Minuten bei 4 °C und 20.817 g
6. Der Überstand wird entfernt und das DNA-Pellet im 37 °C Heizblock für 15 – 20 Minuten vollständig getrocknet
7. Das DNA-Pellet in 13 µl ddH₂O unter Schütteln bei 37 °C und 1.400 rpm in einem ThermoMixer® der Firma Eppendorf lösen

3.1.6 Transformation elektrisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Hier wurden elektrokompetente *E. coli* Zellen (SURE oder XL1-Blue) dazu genutzt, um Plasmide zu vervielfältigen. Dazu wurden die Bakterienzellen einem elektrischen Feld ausgesetzt und die Plasmide somit in die Zellen transformiert. Durch eine kurzzeitig angelegte Spannung wird die Membran der *E. coli* Zellen für die einzubringende DNA permeabel gemacht.

1. Pro Transformation wird eine Elektroporationsküvette auf Eis gestellt und 1 ml LB-Flüssigmedium (ohne Selektionsantibiotika) vorbereitet
2. Kompetente *E. coli* Zellen gegebenenfalls mit ddH₂O verdünnen und langsam auf Eis auftauen lassen
3. 8 µl Ligationsansatz in die Küvette vorlegen, 50 µl der kompetenten Zellen zugeben und die Ansätze für 1 – 2 Minuten auf Eis inkubieren
4. Die Zellen werden im Elektroporator MicroPulser™ der Firma BioRad Laboratories einem Spannungsstoß von 2,5 kV für 0,6 ms ausgesetzt und direkt im Anschluss im vorbereiteten LB-Flüssigmedium aufgenommen
5. Regeneration der *E. coli* Zellen für 45 Minuten bei 37 °C und 1.000 rpm in einem ThermoMixer® der Firma Eppendorf
6. Pelletieren der Zellen für 45 Sekunden bei 14.000 g
7. Zellen in ca. 50 µl LB-Flüssigmedium resuspendieren und auf festem LB-Selektionsmedium ausplattieren
8. Inkubation über Nacht bei 37 °C

3.1.7 Transformation elektrisch kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Die Transformation elektrisch kompetenter *A. tumefaciens* Zellen (GV3101 pMP90) erfolgte im Wesentlichen wie die Transformation der *E. coli* Zellen (Abschnitt 3.1.6), mit folgenden Änderungen: es wurden 1 µl Plasmid-DNA (ca. 50 ng) pro Transformation eingesetzt, die Regeneration der frisch transformierten Zellen erfolgte bei 28 °C und 850 rpm in einem ThermoMixer® der Firma Eppendorf für mindestens 2 Stunden in flüssigem YEB-Medium; 50 µl einer Transformation wurden auf festem YEB-Selektionsmedium ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

3.1.8 Dimethylsulfoxid (DMSO)-Dauerkulturen

E. coli Zellen können als DMSO-Dauerkulturen angelegt und somit langfristig gelagert und konserviert werden. Das DMSO dient dabei als Gefrierschutzmittel.

1. Die *E. coli* Zellen werden über Nacht in selektivem Flüssigmedium angezogen
2. 930 µl der über Nacht Kultur werden mit 70 µl DMSO vermischt
3. Die Dauerkulturen werden für ca. 30 Minuten auf Eis inkubiert
4. Nach erneutem Durchmischen werden die Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert

3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* Zellen

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid Easy Pure (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) und den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

3.1.10 DNA Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon Deutschland durchgeführt und die Proben den Angaben dieser Firma entsprechend vorbereitet und versendet. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software Lasergene der Firma DNASTAR, Inc. analysiert.

3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden DNA-Fragmente mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase *in vitro* amplifiziert. Durch den Einsatz der Phusion®-Polymerase (Finnzymes, Inc.) bzw. der Q5® Polymerase (New England BioLabs® Inc.) wurde die Fehlerrate bei der Amplifikation gering gehalten. Beide Enzyme weisen durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine *proof reading* Funktion auf, durch welche falsch eingebaute Nukleotide aus dem neu entstehenden DNA-Strang entfernt werden können. Um die korrekte Insertion von DNA in ein Plasmid direkt an den transformierten *E. coli* Zellen zu überprüfen, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Dabei wurde ein Plasmid-spezifisches und ein Insert-spezifisches Oligonukleotid kombiniert und jeweils eine Bakterienkolonie vom selektiven Medium in den PCR-Reaktionsmix überführt. Für Kolonie PCRs oder zur Überprüfung von T-DNA Insertionen in pflanzliche DNA wurde die GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega Corporation) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einem RoboCycler® Gradient 96 der Firma Stratagene California, in einem TPersonal Thermocycler der Firma Biometra GmbH oder in einem Mastercycler® nexus der Firma Eppendorf durchgeführt. In der Tabelle 5 sind die jeweiligen PCR Ansätze und Standard PCR-Programme für die jeweiligen Polymerasen zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammensetzung der PCR-Ansätze, die mit der Phusion®-Polymerase bzw. der Q5® Polymerase und der GoTaq® G2 Polymerase durchgeführt wurden. Zusätzlich sind die jeweiligen Standard PCR-Programme aufgeführt.

50 µl - Ansatz	Phusion®-Polymerase/Q5® Polymerase	GoTaq® G2 DNA Polymerase
Puffer	10 µl 5x Phusion® Puffer/5x Q5 Puffer	10 µl 5x <i>Colorless GoTaq®</i> Puffer
MgCl₂	/	5 µl (25 mM)
Oligonukleotid 1	1 µl (10 pmol/µl)	1 µl (10 pmol/µl)
Oligonukleotid 2	1 µl (10 pmol/µl)	1 µl (10 pmol/µl)
dNTP-Mischung	4 µl	2 µl
template DNA	50 - 100 ng	100 – 200 ng oder 1 Kolonie

50 µl - Ansatz	Phusion®-Polymerase/Q5® Polymerase		GoTaq® G2 DNA Polymerase	
ddH ₂ O	32,5 µl		ad 50 µl	
Polymerase	0,5 µl (2 U/µl)		0,1 µl (5 U/µl)	
PCR-Programm	Phusion®-Polymerase/Q5® Polymerase		GoTaq® G2 DNA Polymerase	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
Schritt 1 (Initiale Denaturierung)	98 °C	1 Minute	94 °C	3 Minuten
Schritt 2 ¹ (Denaturierung)	98 °C	30 Sekunden	94 °C	45 Sekunden
Schritt 3 ¹ (Annealing ²)	58 °C	45 Sekunden	58 °C	30 - 90 Sekunden
Schritt 4 ¹ (Elongation)	72 °C	15 - 30 Sekunden/kb	72 °C	30 Sekunden/kb
Schritt 5 (Finale Elongation)	72 °C	5 Minuten	72 °C	5 Minuten

3.2 Arbeiten mit Pflanzen

3.2.1 Transiente Proteinexpression in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana*

Zur transienten Proteinexpression in *N. benthamiana* Epidermiszellen wurden die entsprechenden Plasmide in *A. tumefaciens* transformiert und diese schließlich zusammen mit dem 19K Stamm in Tabak Blätter infiltriert. Die Infiltration erfolgte in die Blätter von 5 – 6 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen. Diese wurden zuvor in einem 12-Stunden-Licht/12-Stunden-Dunkelheit Zyklus mit 60 %iger Luftfeuchtigkeit und bei 20 °C in einem Gewächshaus kultiviert.

1. *Agrobacterium* Kulturen in 3 ml YEB-Flüssigmedium animpfen und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler innova® 44 der Firma New Brunswick Scientific GmbH schütteln
2. OD₆₀₀ Messung der Kulturen. Dabei wird das Volumen berechnet, welches zum Erreichen einer bestimmten OD₆₀₀ (Plasmid-enthaltende Agrobakterien: End-OD₆₀₀ 0,2 – 1; 19K: End-OD₆₀₀ 0,3) eingesetzt werden muss
3. Die jeweiligen Volumina der *Agrobacterium* Suspensionen für 15 Minuten bei 5.000 g und Raumtemperatur sedimentieren
4. Plasmid-enthaltende und 19K Agrobakterien in je 1 ml Aktivierungsmedium resuspendieren und jeweils 1 ml Plasmid-enthaltende Lösung mit 1 ml 19K Lösung kombinieren (2 ml *Agrobacterium*-Lösung reichen zur Infiltration von etwa 2 Tabak Blättern)

¹ Schritt 2 - 4: 30 - 35 Zyklen

² die Annealing Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m-Wert) der eingesetzten Oligonukleotide

5. 2 – 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
6. Zur Agroinfiltration wird die Blattunterseite von 5 – 6 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen zunächst mit einer Rasierklinge sanft angeritzt
7. Die *Agrobacterium*-Lösung mit einer Spritze (ohne Nadel) aufziehen und an der verletzten Stelle in das Blatt injizieren

Aktivierungsmedium:

10 mM	MES/KOH pH 5,6
10 mM	MgCl ₂
150 µM	Acetosyringon

3.2.2 Proteinexpression in Pollenschläuchen von Nicotiana tabacum

Um Proteine transient in Pollenschläuchen zu exprimieren, wurden *Nicotiana tabacum* Pollenkörner mit Plasmid-DNA-beladenen Goldpartikeln durch den Einsatz einer *Particle Gun* beschossen. Die *Nicotiana tabacum* Pflanzen wurden in einem 12-Stunden-Licht/12-Stunden-Dunkelheit Zyklus mit 60 %iger Luftfeuchtigkeit und bei 20 °C in einem Gewächshaus kultiviert.

Beladen der Goldpartikel mit Plasmid-DNA:

1. Ca. 1,25 mg Goldpartikel der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (Durchmesser 1 µm) in 25 µl H₂O für 3 Minuten vortexen
2. 10 µl 0,1 M Spermidin zugeben und 1 Minute vortexen
3. 3 µg pro Plasmid-DNA zugeben und 1 Minute vortexen
4. 25 µl 2,5 M CaCl₂ unter Vortexen zugeben und weitere 3 Minuten vortexen
5. Goldpartikel für 10 Sekunden und 8.100 x g sedimentieren und den Überstand abnehmen
6. Goldpartikel in 200 µl eiskaltem EtOH (99,8 %) waschen und erneut für 10 Sekunden bei 8.100 x g sedimentieren, Überstand abnehmen
7. Goldpartikel in 18 µl eiskaltem EtOH (99,8 %) resuspendieren und bis zum Beschuss bei 4 °C lagern

Vorbereitung der Tabak Pollenkörner:

1. 3 Kreise aus Whatman Papier ausschneiden (ca. 4 cm Durchmesser), jeweils einen Kreis in Petrischale legen und mit dem Tabak Pollenmedium befeuchten (auf Eis aufbewahren)
2. Ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 6 ml Tabak Pollenmedium befüllen und auf Eis aufbewahren, ein weiteres 50 ml Reaktionsgefäß mit einem Stück Mull Gewebe für das Filtern der Pollenkörner bereit halten
3. 8 Tabakblüten pro Probe in den vorbereiteten 6 ml Tabak Pollenmedium ernten. Dazu die Blüte über dem Reaktionsgefäß fast vollständig abschneiden, so dass die Antheren mit den Pollenkörnern in das Medium fallen
4. Pollen durch Vortexen resuspendieren
5. Pollen durch das Mull Gewebe filtern, um die größeren Pflanzenteile zu entfernen

6. Pro Beschuss etwa 1,5 ml der im Medium resuspendierten Pollen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer Nutsche auf einem Zellulose-Acetat Filter (Porengröße 0,2 µm; Sartorius Stedim) sedimentieren
7. Filter mit den Pollen auf die vorbereiteten Whatman Kreise in den Petrischalen legen und auf Eis aufbewahren

Tabak Pollenmedium:

5 % (w/v)	Saccharose
12,5 % (w/v)	PEG 6000
0,03 % (w/v)	Caseinhydrolysat
15 mM	MES/KOH pH 5,9
1 mM	CaCl ₂
1 mM	KCl
0,8 mM	MgSO ₄
1,6 mM	H ₃ BO ₄
30 µM	CuSO ₄
10 µg/ml	Rifampicin

Beschuss von Tabak Pollen mit der *Particle Gun*:

1. Pro Beschuss jeweils einen *Macrocarrier* (Bio-Rad Laboratories GmbH), einen *Macrocarrier*-Halter, eine *Rupture Disc* (1350 psi, Bio-Rad Laboratories GmbH) und einen *Stopping Screen* (Bio-Rad Laboratories GmbH) in Isopropanol waschen und unter der Sterilbank trocknen lassen
2. Den *Macrocarrier* in den zugehörigen Halter einspannen, die Plasmid-DNA-beschichteten Goldpartikel in die Mitte des *Macrocarriers* pipettieren und unter der Sterilbank trocknen
3. Den *Macrocarrier* mit den Goldpartikeln, den *Stopping Screen* und die *Rupture Disc* in die PDS-1000/100 *Particle Gun* (Bio-Rad Laboratories GmbH) einbauen
4. Die Petrischale mit den gefilterten Pollen in einem Abstand von 6 cm unter dem *Macrocarrier* in die *Particle Gun* legen
5. Gerät anschalten, Helium Gashahn aufdrehen und Vakuum anlegen
6. Beschuss auslösen, bei dem die Plasmid-DNA-beschichteten Goldpartikel auf die Pollenkörner geschossen werden
7. Petrischalen mit den Pollen nach dem Beschuss auf Eis aufbewahren

In vitro Kultivierung der transformierten Tabak Pollen:

1. Tabak Pollen nach dem Beschuss mit einem Spatel in 240 µl Tabak Pollenmedium resuspendieren
2. Tabak Pollen in 60 µl-Tropfen auf Objektträger pipettieren. Die Objektträger werden auf Zahnstochern in viereckige Petrischalen platziert, welche wiederum mit feuchtem Zellstoff ausgelegt sind
3. Petrischalen mit Objektträgern in eine Styroporkiste (ebenfalls mit feuchtem Zellstoff ausgelegt) platzieren und für 4 Stunden bei 28 °C inkubieren

4. Fluoreszenzmikroskopie

3.2.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana Pflanzen wurden auf Erde oder auf 0.5 MS Medium angezogen. Vorher wurden die Samen mit Chlorgas sterilisiert.

Samen Sterilisation:

1. Samen in 1,5 ml Reaktionsgefäß füllen und dieses geöffnet in einen Exsikkator stellen
2. Das Chlorgas wird im Exsikkator durch Zugabe von 3 ml HCl zu 100 ml 12 %iger Hypochlorit-Lösung gebildet
3. Samen 2 – 3 Stunden im Exsikkator inkubieren

Die sterilisierten Samen wurden anschließend auf Anzuchterde oder auf 0.5 MS-Festmedium ausgelegt. Zur Stratifikation wurden die Samen 2 – 3 Tage in Dunkelheit bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Samen zur Pflanzenanzucht unter Langtagkonditionen (16 Licht bei 23 °C / 8 Stunden Dunkelheit bei 18 °C, 110-130 $\mu\text{E/s}\cdot\text{cm}^2$ Lichtintensität) inkubiert.

3.2.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana* zur dauerhaften Proteinexpression

Die stabile Proteinexpression in *A. thaliana* wurde mit Hilfe der sogenannten „*Floral Dip*“ Methode erreicht (Clough und Bent 1998). Dabei wurden ca. 6 Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen mit den noch geschlossenen Blüten in die entsprechende *Agrobacterium* Suspension getaucht und dadurch transformiert.

Tag 1: *Agrobacterium* Vorkultur (VK) in 5 ml YEB Flüssigmedium animpfen und üN bei 28 °C und 200 rpm schütteln

Tag 2: 500 μl der VK in 500 ml YEB Hauptkultur (HK, 1:1000) überführen und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm schütteln

Tag 3: HK bei 5.000 g für 25 min bei RT sedimentieren und anschließend in 400 ml 5 %iger Saccharose-Lösung resuspendieren, *Agrobacterium*-Lösung in 800 ml Plastikbecher füllen

Die zu transformierenden Pflanzen auf der Schale mit Deckel abdecken, um eine höhere Luftfeuchtigkeit zu erreichen

Vor dem Transformation schon geöffnete Blüten und Schoten abschneiden

50 μl /100 ml Silwet® zur Saccharose-Lösung geben, gut mischen und die Pflanzen für 5 – 10 Sekunden (oder eine „1 Mississippi, 2 Mississippi, 3 Mississippi“-Länge) bis zu den Blättern in die *Acrobacterium*-Lösung tauchen

Pflanzen auf der Schale wieder mit Deckel abdecken und über Nacht bei Dauerlicht inkubieren

Tag 4: Pflanzen ab jetzt ohne Deckel unter Langtagkonditionen inkubieren

Etwa eine Woche später wurden die Pflanzen in halbtransparenten Plastiktüten verpackt, die Pflanzen vollständig getrocknet und nach etwa 4 Wochen die Samen schließlich geerntet.

3.2.5 Transiente Proteinexpression in Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*

Zur transienten Proteinexpression in *A. thaliana* Epidermiszellen wurden 4 Tage alte Pflanzenkeimlinge mit einer *Agrobacterium* Suspension vakuuminfiltriert.

Tag 1: Samen sterilisieren, Metall Siebchen auf 35 mm 0.5 MS Schälchen legen, ca. 10 bis 15 Samen auf den Siebchen verteilen und die Schälchen für 2 Tage bei 4 °C in Dunkelheit inkubieren

Tag 3: Schälchen zukleben und in den Lichtschrank stellen (16-Stunden-Licht/8-Stunden-Dunkelheit Zyklus und 100 $\mu\text{E/s}\cdot\text{cm}^2$ Lichtintensität)

Tag 6: Die Agrobakterien mit den transformierten Plasmiden und 19K Stamm in 4 ml selektivem YEB-Flüssigmedium animpfen, über Nacht bei 28 °C und 200 rpm

Tag 7: Pro Schälchen 2,5 ml Aktivierungsmedium vorbereiten und die *Agrobacterium* Suspensionen auf jeweils eine End-OD₆₀₀ von 2 einstellen (mit 19K kombiniert), 3 Stunden bei RT stehen lassen

0,005 % (v/v) Tween 20 zu der *Agrobacterium* Suspension geben und auf die Keimlinge geben

3 x 2 Minuten Vakuum anlegen und die Schälchen mit der *Agrobacterium* Suspension 5 – 10 Minuten stehen lassen

Agrobacterium Suspension abnehmen, die Schälchen zukleben und wieder in den Lichtschrank stellen

Tag 10: Fluoreszenzmikroskopie

Aktivierungsmedium:

10 mM	MES/KOH pH 5,6
10 mM	MgCl ₂
450 μM	Acetosyringon
1 % (v/v)	Saccharose-Lösung

3.2.6 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* Blättern erfolgte mittels Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Präparation und anschließender DNA Fällung mit Ethanol.

1. Ca. 100 mg Pflanzenmaterial mit einer Metallkugel in 2 ml Reaktionsgefäß und sofort in flüssigen Stickstoff (N₂) geben
2. Zermahlen des Pflanzenmaterials für 2 x 30 Sekunden in einer RETSCH Mühle
3. 600 µl CTAB Puffer zugeben und vortexen bis die Probe vollständig aufgetaut ist
4. Inkubation bei 65 °C für 1 Stunde
5. Probe bei RT abkühlen lassen und 1 µl RNAse A (1mg/ml) zugeben
6. Inkubation bei 37 °C für 0,5 – 1 Stunde
7. 600 µl Chloroform (CHCl₃) zugeben, sanft schwenken und bei RT und 1.700 x g für 10 Minuten zentrifugieren
8. Wässrige Phase in neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
9. Ca. 2,5-faches Volumen (1 ml) eiskalten Ethanol (99,8 %) zugeben, sanft schwenken
10. Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 x g für 30 Minuten, Überstand verwerfen
11. Auf das DNA Pellet 500 µl EtOH (70 %) geben und bei 4 °C und 20.000 x g für 10 Minuten zentrifugieren, Überstand verwerfen
12. DNA Pellet bei 37 °C vollständig trocknen
13. Resuspension des DNA Pellets in etwa 60 µl H₂O

CTAB Puffer:

1 % (w/v)	Cetyltrimethylammoniumbromid
0.7 M	NaCl
0.5 % (v/v)	Polyvinylpyrrolidon 40 kDa
50 mM	Tris/HCl pH 8,0
10 mM	EDTA pH 8,0

3.2.7 RNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von RNA aus *A. thaliana* Blättern wurde mit dem *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Qualität der isolierten RNA wurde durch Bestimmung der Verhältnisse von OD₂₆₀/OD₂₈₀ und OD₂₆₀/OD₂₃₀ überprüft.

3.2.8 cDNA Synthese

Um aus der isolierten RNA die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren, wurde das iScript™ cDNA Synthese Kit der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet und den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

3.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Aufnahme der jeweiligen Plasmide erfolgte bei der Transformation von Hefezellen durch die Zugabe von Lithium-Acetat, einzelsträngiger Lachssperma-DNA (*salmon sperm* DNA; ssDNA) und Polyethylenglykol (PEG). Das monovalente Alkalikation Lithium (Li⁺) und die Zugabe von PEG führen zu einer Porosität der Zellwand, wodurch DNA aufgenommen werden kann. Die

ssDNA fungiert als Transporter, indem sie von den Hefezellen aufgenommen wird und dabei die Plasmid-DNA in die Hefezellen transportiert (Schiestl und Gietz 1989). Zusätzlich wurde die Transformationsrate durch einen Hitzeschock erhöht.

1. Hefestamm auf YPD-Medium ausstreichen und bei 30 °C für 2-3 Tage inkubieren
2. Kurz vor der Transformation ssDNA (1 mg/ml) für 5 Minuten bei 95 °C und auf Eis stellen
3. Pro Transformation folgenden Transformationsansatz vorbereiten:
 - 240 µl 50 % PEG
 - 36 µl LiAc (1M)
 - 15 µl ddH₂O
4. Pro Transformation eine Pipettenspitze frisch gewachsener Hefezellen in 500 µl 2 %iger Glukoselösung resuspendieren und die Zellen für 15 Sekunden bei 14.000 x g pelletieren
5. 5 µl der zu transformierenden DNA (mindestens 250 ng pro Konstrukt) in einem Reaktionsgefäß vorlegen und 50 µl ssDNA zugeben
6. DNA und ssDNA mit dem Transformationsansatz mischen und die Hefezellen darin resuspendieren
7. 30 Minuten Inkubation bei 30 °C
8. Hitzeschock für 20 Minuten bei 42 °C
9. Anschließend werden die Hefezellen erneut pelletiert und der Überstand verworfen
10. Das Hefepellet wird in 100 – 200 µl 2 %iger Glukoselösung resuspendiert und auf selektivem Wachstumsmedium ausplattiert
11. Nach 3-tägiger Inkubation bei 30 °C werden die transformierten Hefekolonien erneut auf selektivem Medium umgestrichen und nach 2 - 3 Tagen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen oder proteinbiochemische Analysen weiterverwendet

Lösungen für die Hefetransformation:

- 20 % (w/v) Glukoselösung (autoklaviert)
- 50 % (w/v) PEG 3350 (sterilfiltriert)
- 1 M Lithiumacetat (sterilfiltriert)
- ssDNA (Stammlösung 10 mg/ml):
ultraschall-gescherte Lachssperma-DNA (Fragmentgröße 300 – 700 bp)

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinisolierung aus Hefezellen

Die Hefezellen wurden zuerst mit einer alkalischen Natriumhydroxid (NaOH) Lösung behandelt, um die Effektivität der Proteinextraktion zu erhöhen. Anschließend wurden die Hefezellen in Hefeproteinextraktionspuffer (leicht veränderter SDS Ladepuffer) aufgeköcht (Kushnirov 2000).

1. Hefezellen mit einer Pipettenspitze vom Festmedium ablösen und in 100 µl ddH₂O resuspendieren, kurz vortexen
2. 100 µl 0,2 M NaOH zugeben, kurz vortexen und 10 Min bei RT inkubieren

3. Hefezellen für 1 Min bei 14.000 x g pelletieren, den Überstand verwerfen und das entstandene Hefepellet in 50 µl Hefeproteinextraktionspuffer lösen
4. 4 min bei 95 °C aufkochen
5. Hefezellrückstände für 10 min bei 10 °C und 10.000 x g zentrifugieren und Überstände für weitere Untersuchungen wie Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz oder Proteindetektion mittels Western Blot verwenden

Hefeproteinextraktionspuffer:

0,06 M	Tris/HCl pH 6,8
5 % (v/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
4 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,0025 % (w/v)	Bromphenolblau

3.4.2 Proteinfällung mit Methanol/Chloroform

Bei der Fällung von Proteinen können Salze und unerwünschte Substanzen entfernt und die Proteine somit gereinigt und konzentriert werden. Bei dieser Methode entstehen durch Zugabe von Methanol, Chloroform und H₂O eine wässrige Phase (oben) und eine organische Phase (unten), die durch die Interphase getrennt werden, in der sich die denaturierten Proteine ansammeln.

1. Proteinsuspension mit 3 Volumina Methanol, 1 Volumina Chloroform und 4 Volumina H₂O mischen und vortexen
2. 20 Minuten bei 10.000 x g und 14 °C zentrifugieren
3. Obere wässrige Phase entfernen und 4 Volumina Methanol zugeben, vortexen
4. Inkubation der Proben bei -20 °C für 10 – 20 Minuten
5. Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C, Überstand verwerfen
6. Proteinpellet auf dem 65 °C Heizblock für 10 Minuten trocknen
7. Proteinpellet in gewünschtem Puffer lösen

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Konzentrationsbestimmungen von Proteinen in Lösungen wurden mit Hilfe von Amidoschwarzbestimmungen durchgeführt. Die sauren Gruppen des Amidoschwarz reagieren dabei mit den Proteinen und färben diese dadurch an. Anschließend wird die Konzentration durch eine photometrische Messung bei 615 nm bestimmt.

1. 10 µl der Proteinsuspension mit 190 µl ddH₂O mischen
2. 4 Volumina der Amidoschwarz-Färbelösung zugeben, vortexen
3. Zentrifugation der Ansätze bei RT für 20 min und 20.000 x g, Überstand absaugen
4. Proteinpellet mit 1 ml Amidoschwarz-Waschlösung waschen
5. Zentrifugation bei RT für 10 min und 20.000 x g

6. Überstand absaugen und den Waschschrift wiederholen
7. Überstand absaugen und das Proteinpellet im Heizblock bei 37 °C trocknen
8. Proteinpellet in 1 ml 0,2 M NaOH lösen
9. Messung der Extinktion bei 615 nm
10. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgt anhand einer BSA Eichgerade

Amidoschwarz-Färbelösung:

10 % (v/v)	Essigsäure
90 % (v/v)	Methanol
0,1 % (w/v)	Amidoschwarz

Amidoschwarz-Waschlösung:

10 % (v/v)	Essigsäure
90 % (v/v)	Methanol

3.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden. Durch das SDS (Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*) werden die Proteine denaturiert und außerdem negativ geladen, wodurch eine Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekularmasse in einem elektrischen Feld ermöglicht wird.

Anfertigen der SDS-Gele:

1. Glasplatten mit Aceton, Abstandhalter und Kämmen mit Ethanol reinigen
2. Glasplatten mit seitlich platzierten Abstandhaltern aufeinanderlegen, mit Klammer befestigen und senkrecht aufstellen
3. Untere Kante mit 1 %iger Agarose (in H₂O aufgeköcht) abdichten und fest werden lassen
4. Für das Trenngel werden zuerst H₂O, Tris/HCl, Acrylamid und SDS in einem Gefäß gut vermischt
5. Anschließend werden Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben
6. Trenngel zwischen die beiden Glasplatten gießen, mit einem Isopropanol/H₂O Gemisch überschichten und das Trenngel ca. 30 – 45 Min. auspolymerisieren lassen
7. Die Komponenten des Sammelgels in der gleichen Reihenfolge wie für das Trenngel vermischen
8. Isopropanol/H₂O Gemisch entfernen und das Sammelgel auf das Trenngel gießen, Kamm im noch flüssigen Sammelgel platzieren
9. Sammelgel ca. 30 – 45 Min. auspolymerisieren lassen

Rezept für ein 12 %iges Trenngel:

3,5 ml	H ₂ O (Millipore, entgast)
2 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
2,4 ml	Acrylamid 40 %
40 µl	SDS 20 % (w/v)
40 µl	APS 10 % (w/v)
4 µl	TEMED

Rezept für ein 4 %iges SDS-Sammelgel:

1,6 ml	H ₂ O (Millipore, entgast)
0,625 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,25 ml	Acrylamid 40 %
12,5 µl	SDS 20 % (w/v)
37,5 µl	APS 10 % (w/v)
3,75 µl	TEMED

Gelelektrophorese:

1. Kamm vorsichtig aus dem Sammelgel ziehen und das SDS-Gel in die dafür vorgesehene Elektrophorese-Kammer stellen
2. Elektrophorese-Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllen, bis der Puffer das Gel vollständig bedeckt
3. Proteinproben mit SDS-Ladepuffer versetzen und neben den Proteinmarker IV (PEQLAB Biotechnologie GmbH) in die Geltaschen füllen
4. Die SDS-Gelelektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 30 – 35 mA für 1,5 – 2 Stunden

4 x SDS-Ladepuffer:

250 mM	Tris/HCl, pH 6,8
30 % (v/v)	Glycerin
40 % (v/v)	SDS (20%)
10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,0125 % (w/v)	Bromphenolblau

1 x SDS-Laufpuffer pH 8,3:

41 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

3.4.5 Proteintransfer auf PVDF-Membranen („Semidry“ Western Blot)

Um Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE spezifisch nachweisen zu können, werden diese elektrophoretisch auf Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membranen (Roth) übertragen. Die Detektion erfolgt anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Vor dem Transfer:

1. SDS-Gel für 10 Minuten in ca. 25 ml *Semidry*-Transferpuffer äquilibrieren
2. Pro Gel 4 Stück Whatman Papier (7 x 9 cm Zuschnitt) in *Semidry*-Transferpuffer äquilibrieren
3. Je eine PVDF-Membran (7 x 8 cm Zuschnitt) für 30 Sekunden in Methanol aktivieren, in H₂O (Millipore) abspülen und anschließend in *Semidry*-Transferpuffer inkubieren

Aufbau des *Semidry* Western Blots (von unten nach oben):

- Anode
 - 2 Lagen getränktes Whatman Papier
 - PVDF-Membran
 - SDS-Gel
 - 2 Lagen getränktes Whatman Papier
 - Kathode
4. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgt für 2 Stunden bei einer Stromstärke von 40 mA

Semidry-Transferpuffer:

24 mM	Tris
192 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

3.4.6 Spezifischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Bevor die auf die PVDF-Membran übertragenden Proteine detektiert werden können, müssen überschüssige Proteinbindungsstellen mit einem Blockpuffer abgeblockt werden.

1. Die PVDF-Membran wird direkt nach dem Proteintransfer für mindestens 45 Minuten in ca. 25 ml Blockpuffer bei RT geschwenkt
2. Anschließend wird der Blockpuffer entfernt, in dem die Membran 3 x 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt wird
3. Die PVDF-Membran wird über Nacht bei 4 °C in der primären Antikörperlösung geschwenkt
4. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper entfernt und die Membran 3 x 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt
5. Das Schwenken der Membran in der sekundären Antikörperlösung erfolgt für 2 Stunden bei RT
6. Vor der visuellen Detektion der Proteine muss die sekundäre Antikörperlösung entfernt werden, indem die Membran erneut 3 x 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt wird

10 x TBS-Puffer:

100 mM Tris/HCl, pH 7,4

1,5 M NaCl

Waschpuffer (1 x TTBS):

1 x TBS

0,05 % (v/v) Tween 20

Blockpuffer:

1 x TTBS

5 % (w/v) Magermilchpulver

3.4.7 Visuelle Detektion von Proteinen mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase

Die hier verwendeten sekundären Antikörper sind an eine Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) gekoppelt, durch die wiederum die visuelle Detektion der Proteine ermöglicht wird. Dazu wurde die PVDF-Membran mit einer ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) inkubiert, was dazu führt das das darin enthaltende Luminol durch die Aktivität der HRP oxidiert wird und Chemilumineszenz entsteht. Das dabei entstehende Licht wurde mit einem lichtstarken Kameraobjektiv aufgenommen. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Corel PHOTO-PAINT X6 Programm bearbeitet

1. 500 µl ECL-Lösung pro Membran vorbereiten
2. Membran für 1 Minute bei RT in der ECL-Lösung inkubieren und anschließend in eine Klarsichthülle legen
3. Die Detektion des emittierten Lichts erfolgt mit dem lichtstarken Objektiv des FUSION-SL4 Systems und der zugehörigen FUSION-CAPT Advance Software (Vilber Lourmat)

Komponenten für die ECL-Lösung:

0,1 M Tris/HCl, pH 8,8

11 mg para-Hydroxycoumarinsäure (gelöst in 10 ml DMSO)

Luminol

H₂O₂

ECL-Lösung pro Membran:

500 µl	0,1 M Tris/HCl, pH 8,8
50 µl	Hydroxycoumarinsäure-Lösung
10 µl	Luminol
0,5 µl	H ₂ O ₂

3.5 Inhibition der S-Acylierung *in planta* durch Vakuuminfiltration von 2-Brompalmitat (BOP/iBOP Assay)

Um die Protein-S-Acylierung *in planta* zu inhibieren wurde 2-Brompalmitat (2-Br, 2-Brom Hexadecansäure) der Firma FLUKA oder Sigma-Aldrich® in die bereits mit *Agrobacterium* infiltrierten Tabak Epidermiszellen vakuuminfiltriert. Bei einem induzierbaren BOP Assay wurde die PAT-Expression etwa 4 Stunden nach 2-Br Infiltration durch Zugabe von 100 µM β-Estradiol induziert.

1. 24 Stunden nach Infiltration der Agrobakterien Tabakblattscheiben ausstanzen
2. Blattscheiben in je 1 ml Leitungswasser (+ 0,005 % Tween 20) in 24-well Mikrotiterplatte legen, eventuell mit Pipettenspitze beschweren, damit die Blattscheibe vollständig in der Flüssigkeit liegt
3. Ansetzen einer 100 mM Stocklösung 2-Br in Methanol
4. Daraus die jeweilige Menge an 2-Br oder die äquivalente Menge MeOH als Kontrolle zu den Blattscheiben pipettieren, mit der Pipettenspitze gut durchmischen
5. 5 Minuten Vakuum anlegen
6. Blattscheiben über Nacht unter der Lichtbank inkubieren
7. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen etwa 48 Stunden nach Agroinfiltration bzw. etwa 16 Stunden nach 2-Br Infiltration

3.6 Biochemische Untersuchung der Protein-S-Acylierung mittels *Biotin Switch* Assay und unter Verwendung des Inhibitors 2-Brompalmitat (BiBOP Assay)

Mit dem *Biotin Switch* Assay kann eine Protein-S-Acylierung biochemisch nachgewiesen werden. Zuerst werden dabei freie nicht-acylierte Cysteine mit N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Anschließend werden S-Acylgruppen von den lipidmodifizierten Cysteinen durch Hydroxylamin entfernt und durch Biotin ersetzt. Anschließend werden biotinylierte, also zuvor S-acylierte Proteine mit einer NeutrAvidin Matrix (Thermo Fisher Scientific Inc.) aufgereinigt (Hemsley et al. 2008). Beim BiBOP (*Biotin Switch* und BOP) Assay wurde der *Biotin Switch* Assay mit Tabak Blattscheiben durchgeführt, mit denen zuvor ein BOP Assay gemacht wurde. Dadurch wurde der Lipidtransfer durch überexprimierte PAT-Enzyme auf das CBL2 Substratprotein in den Tabak Epidermiszellen bei unterdrückter Tabak Protein-S-Acylierung biochemisch nachverfolgt.

1. Die Behandlung der Blattscheiben mit 2-Br erfolgt wie im Abschnitt 3.5 beschrieben

2. 24 Stunden nach 2-Br Infiltration werden je 7 Blattscheiben à 1,2 mm Durchmesser (ca. 200 mg Blattmaterial) in flüssigem Stickstoff eingefroren
3. Zermahlen des Blattmaterials für 3 x 30 Sekunden in einer RETSCH Mühle
4. 500 µl Lysispuffer hinzufügen und vortexen bis das Pflanzenmaterial vollständig aufgetaut ist
5. Proben für 1 Stunde bei RT invertieren
6. Zellbestandteile entfernen durch Zentrifugation 2 x 5 Minuten bei 500 x g
7. 300 µl der Überstände mit 200 µl Lysispuffer auffüllen und über Nacht bei 4 °C invertieren
8. Fällung der Proteine mit Methanol/Chloroform (Abschnitt 3.4.2)
9. Getrocknete Proteinpellets in 150 µl Resuspensionspuffer aufnehmen, Pellets bei 37 °C für 10 Minuten im Ultraschallbad lösen
10. 50 µl der Proteinsuspension für Biotinylierungsansatz verwenden, 50 µl für den Kontrollansatz

Biotinylierungsansatz:

400 µl 1 M Hydroxylamin-Lösung pH 7,4
(frisch ansetzen)
50 µl 4 mM HPDP-Biotin (Thermo Fisher
Scientific Inc.)
50 µl Proteinsuspension

Kontrollansatz:

400 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,4
50 µl 4 mM HPDP-Biotin
50 µl Proteinsuspension

11. Ansätze für 1 Stunde bei RT invertieren
12. Fällung der Proteine mit Methanol/Chloroform (Abschnitt 3.4.2)
13. Getrocknete Proteinpellets in 100 µl Resuspensionspuffer aufnehmen, Pellets bei 37 °C für 10 Minuten im Ultraschallbad lösen
14. 20 µl der Ansätze als Ladekontrolle mit je 5 µl 5x SDS-Ladepuffer versetzen und bei -20° C einfrieren
15. Den Rest der Proteinlösung mit 900 µl 1 x PBS-Puffer (+ 0,2 % Triton X-100) vermischen und zu je 30 µl NeutrAvidin Matrix geben
16. Invertieren der Ansätze für 1 Stunde bei RT
17. Sedimentieren der NeutrAvidin Matrix bei 1000 x g für 1 Min, Überstand abnehmen
18. NeutrAvidin Matrix 2 mal mit 1 ml Waschpuffer waschen
19. Anschließend 1 x mit 1 ml 1 x PBS-Puffer waschen
20. Nach dem letzten Sedimentieren der NeutrAvidin Matrix werden 25 µl 2 x SDS-Ladepuffer hinzugefügt und die Proben für 5 Min bei 95 °C aufgeköcht
21. Sedimentieren der NeutrAvidin Matrix bei 1000 x g für 1 Min, Überstand für Proteindetektion mittels Western Blot verwenden

<u>10 x PBS:</u>	<u>Lysispuffer:</u>	<u>Resuspensionspuffer:</u>	<u>Waschpuffer:</u>
90 mM Na ₂ HPO ₄	1 x PBS pH 7,4 25 mM NEM (CALBIOCHEM)	1 x PBS pH 7,4	1 x PBS pH 7,4
18 mM KH ₂ PO ₄	5 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail (PIC, Sigma- Aldrich®)	8 M Urea	500 mM NaCl
1,36 M NaCl	1 mM EDTA	2 % (v/v) SDS	0,1 % (v/v) SDS
27 mM KCl pH 7,4	1 % (v/v) Triton X-100		

3.7 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit dem inversen Mikroskop Leica DMI6000 aufgenommen, ausgestattet mit der konfokalen Laser-Scanning Einheit TCS SP5 (Leica Microsystems). Die Anregung des Grün fluoreszierenden Proteins GFP erfolgte mit Licht der Wellenlänge 488 nm (Argon Laser) und die Fluoreszenz wurde im Bereich von 495 bis 555 nm detektiert. Das Fluoreszenzprotein mCherry wurde bei 561 nm (DPSS 561 Laser) angeregt und die Fluoreszenz im Bereich von 587 bis 652 nm aufgenommen. Bei simultaner Aufnahme von GFP und mCherry Fluoreszenzen erfolgte die Detektion sequentiell. Das hier ausschließlich in den Tabak Pollenschläuchen eingesetzte Fluorophor mVenus wurde mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt (Argon Laser) und die Fluoreszenz im Bereich von 500 – 550 nm detektiert. Für Fluoreszenzaufnahmen von Tabak Pollenschläuchen oder epidermalen Tabakzellen wurde ein Leica 63x/1.20 Wasserimmersionsobjektiv (HCX PL Apo CS) verwendet. Die Anregung des yeGFP bei der mikroskopischen Analyse von Hefezellen erfolgte bei 488 nm (Argon Laser). Die Fluoreszenz des yeGFP wurde im Bereich von 495 bis 555 nm detektiert. Die Bildaufnahme bei der mikroskopischen Analyse von Hefezellen und *Arabidopsis* Epidermiszellen erfolgte mit einem Leica 100x/1.44 Ölimmersionsobjektiv (HCX PLAPO). Alle Aufnahmen wurden mit der Leica LAS AF Lite Software oder dem Corel PHOTO-PAINT X6 Programm bearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Koexpression der Protein-S-Acyltransferase 10 aus *A. thaliana* kompensiert eine Inhibition der CBL2-S-Acylierung durch 2-Brompalmitat

4.1.1 Der S-Acylierungsinhibitor 2-Brompalmitat (2-Br) hat keinen Einfluss auf die Lokalisationen der Protein-S-Acyltransferase 10 und des koexprimierten Calciumsensors CBL2

Arabidopsis thaliana besitzt 24 Protein-S-Acyltransferasen (PATs), die als Transmembranproteine an verschiedenen Membranen der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Zwei der 24 AtPAT-Enzyme, PAT10 und PAT11, assoziieren mit der Vakuolenmembran (Batistič 2012). Über die Mechanismen der PAT-Lokalisation an diese Zellmembran ist bisher nichts bekannt. Um einen möglichen Einfluss der Autoacylierung der PATs auf ihre subzelluläre Verteilung zu untersuchen, wurde die Lokalisation der normalerweise Golgi- und Tonoplast-lokalisierten PAT10 nach Inkubation des S-Acylierungsinhibitors 2-Brompalmitat (2-Br) analysiert. Dazu erfolgte die transiente Expression eines PAT10:GFP Fusionsproteins in *Nicotiana benthamiana* Epidermiszellen und die anschließende Applikation von 2-Br. Um die Funktionsfähigkeit des Inhibitors zu kontrollieren, wurde zusätzlich das Calciumsensor Protein CBL2 (als CBL2:mCherry Fusionsprotein) koexprimiert. CBL2 besitzt im N-Terminus drei Cysteinreste und assoziiert durch eine S-Acylierung dieser Cysteine mit der Vakuolenmembran. Wird die S-Acylierung durch Zugabe von 2-Br unterbunden, verbleibt CBL2 im Cytosol und bindet nicht mehr an den Tonoplasten (Batistič et al. 2012; Zhou et al. 2013). PAT10:GFP lokalisierte in Anwesenheit von 2-Br oder MeOH am Tonoplasten und in Golgi-Vesikeln (Abb. 13). Somit zeigte das Enzym bei Zugabe von 2-Br keine Lokalisationsänderung. Im Gegensatz zu den von Batistič et al. veröffentlichten Daten (Batistič et al. 2012), zeigte CBL2:mCherry in An- und Abwesenheit des Inhibitors überraschenderweise keine veränderte Lokalisation und war in beiden Fällen mit dem

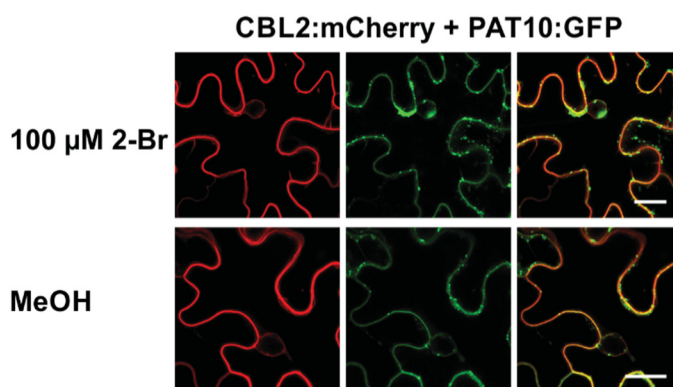


Abb. 13: Die Lokalisation von CBL2 und PAT10 ändert sich bei Zugabe des S-Acylierungsinhibitors 2-Br nicht. CBL2:mCherry (rot) und PAT10:GFP (grün) wurden in *Nicotiana benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und 100 μM 2-Br bzw. die äquivalente Menge des Lösungsmittels Methanol (MeOH) vakuumfiltriert. In den überlagerten Bildern sind die Kolokalisationen beider Proteine am Tonoplasten durch gelbe Fluoreszenz zu erkennen. Maßstab: 20 μm .

Tonoplasten assoziiert. Die erste Hypothese war, dass das hier verwendete 2-Br aufgrund langer Lagerung chemisch nicht mehr aktiv war und die S-Acylierung nicht mehr inhibieren konnte. Aus diesem Grund wurden zusätzlich weitere Inhibitoren getestet.

4.1.2 Im Gegensatz zu 2-Brompalmitat können Cerulenin, Tunicamycin und 2-Fluorpalmitat nicht für eine Inhibition der S-Acylierung in planta eingesetzt werden

Neben dem vorwiegend eingesetzten S-Acylierungsinhibitor 2-Br, handelt es sich bei Cerulenin (CER), Tunicamycin (TM) und 2-Fluorpalmitat (2-FI) ebenfalls um Substanzen, die diese Lipidmodifikation inhibieren können (DeJesus und Bizzozero 2002; Draper und Smith 2009). Um die inhibitorische Wirkung der verschiedenen Chemikalien auf die S-Acylierung *in planta* zu überprüfen, wurde hier das Protein CBL2 als Markerprotein eingesetzt. Dazu erfolgte die Expression von CBL2:mCherry in Tabak Epidermiszellen und die anschließende Vakuuminfiltration verschiedener Konzentrationen von CER, TM und 2-FI, sowie 2-Br aus einer neuen Charge. Bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM CER waren einige der CBL2:mCherry Fusionsproteine noch mit dem Tonoplasten assoziiert (Abb. 14). Somit wurde die Bindung von CBL2 an die Vakuolenmembran durch die Zugabe von CER nicht vollständig verhindert. Zudem zeigte das CER ab einer Konzentration von 500 μ M eine toxische Wirkung auf

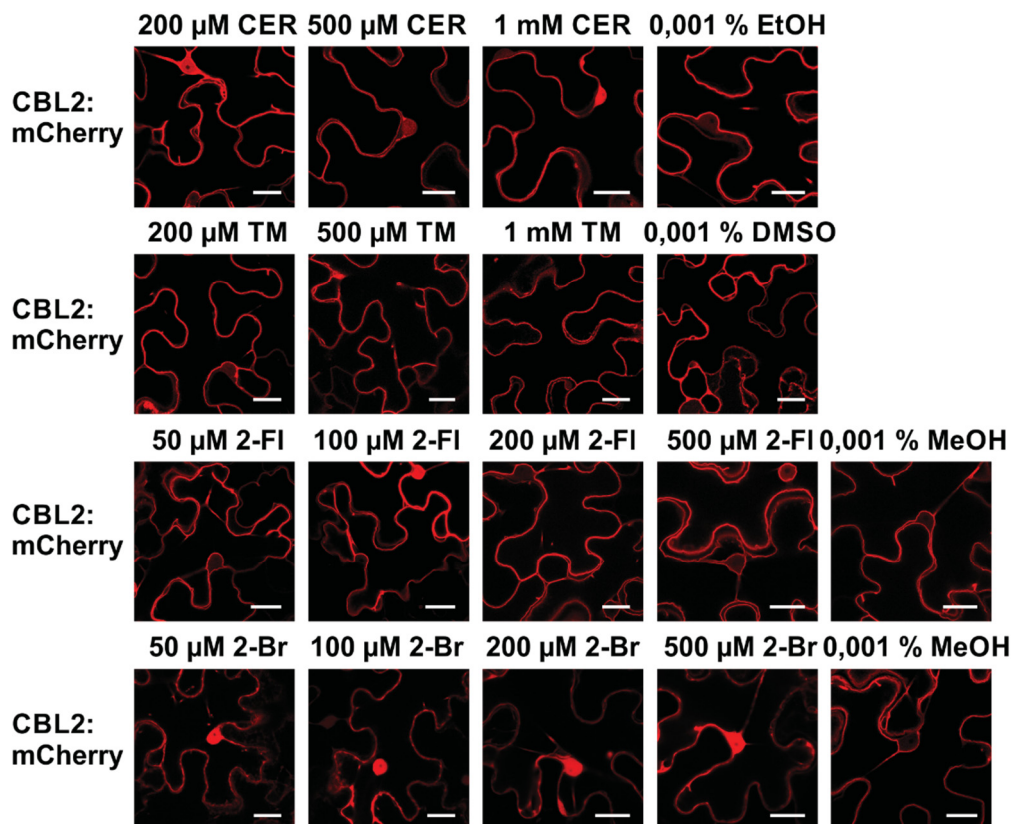


Abb. 14: Anders als Cerulenin, Tunicamycin und 2-Fluorpalmitat, inhibiert 2-Brompalmitat die CBL2-S-Acylierung *in planta*. CBL2:mCherry wurde in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und die Protein Lokalisation unter Einsatz verschiedener Konzentrationen der S-Acylierungsinhibitoren Cerulenin (CER), Tunicamycin (TM), 2-Fluorpalmitat (2-FI) und einer neuen Charge 2-Brompalmitat (2-Br) untersucht. Maßstab: 20 μ m.

die Tabakblätter, die durch eine Auflösung der festen Blattstruktur deutlich sichtbar wurde (Daten nicht gezeigt).

Nach Applikation der verschiedenen TM-Konzentrationen lag CBL2:mCherry vollständig Tonoplast-assoziiert vor. Das als S-Acylierungsinhibitor beschriebene TM konnte die Bindung von CBL2:mCherry an die Vakuolenmembran somit nicht verhindern. Zusätzlich zeigte das hier eingesetzte Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) eine cytotoxische Wirkung auf die Epidermiszellen. Diese wurde durch fluoreszierende Akkumulationen und sich verändernde Zellformen sichtbar. Die TM Stocklösung hätte also vorab höher konzentriert werden müssen, um die Menge an eingesetztem DMSO zu verringern. Aber auch die niedrigeren Konzentrationen von TM zeigten cytotoxische Auswirkungen und verursachten nekrotische Bereiche nach Infiltration in Tabakblätter (Daten nicht gezeigt). TM gilt als Auslöser von ER-Stress und pflanzlichem Zelltod (Crosti et al. 2001; Reis et al. 2011). Somit war das hier verwendete TM wahrscheinlich funktionsfähig, allerdings nicht als Inhibitor der Protein-S-Acylierung *in planta*.

Wurde die inhibitorische Chemikalie 2-FI in die Tabakblätter infiltriert, war CBL2:mCherry bei allen eingesetzten 2-FI Konzentrationen an die Vakuolenmembran gebunden. Es wurde lediglich eine sehr schwache cytoplasmatische Verteilung von CBL2:mCherry bei Zugabe von 500 μM 2-FI beobachtet. Somit wurde durch 2-FI-Applikation kaum eine Inhibition der CBL2-S-Acylierung beobachtet.

Anders als die Applikationen von CER, TM und 2-FI, führte die Inkubation mit der dem S-Acylierungsinhibitor 2-Br aus der neuen Charge bereits bei niedrigsten Konzentrationen von 50 μM zu einer cytoplasmatischen Lokalisation von CBL2:mCherry. Durch die inhibitorische Wirkung von 2-Br wurde die S-Acylierung von CBL2 und damit auch die Tonoplastbindung des Calciumsensors effizient unterbunden. Aus diesen Studien ging 2-Br somit als einzige der getesteten Chemikalien hervor, die zur Inhibition der S-Acylierung *in planta* eingesetzt werden kann.

4.1.3 Bei einer PAT10-Koexpression wird die CBL2-Translokation durch Zugabe von 2-Br nicht verhindert

Durch die vorhergehenden Versuche wurde die Funktionalität von 2-Br als S-Acylierungsinhibitor bestätigt. Um den Einfluss der neuen Charge 2-Br auf die PAT10 Lokalisation zu untersuchen, wurde die Lokalisationsstudie mit PAT10:GFP und CBL2:mCherry in Anwesenheit des Inhibitors wiederholt. Erstaunlicherweise wurde hier erneut keine Änderung der Lokalisationen von PAT10:GFP und CBL2:mCherry in An- und Abwesenheit von 2-Br festgestellt (Abb. 15A). Bei dieser Studie wurden dennoch vereinzelt Zellen beobachtet, in denen CBL2:mCherry cytoplasmatisch lokalisiert war. Interessanterweise wurde PAT10:GFP in diesen Zellen nicht exprimiert (Abb. 15B). Eine Inhibition der CBL2-S-Acylierung lag somit nur in Abwesenheit des Enzyms PAT10:GFP vor. Die ursprüngliche Frage, ob die Autoacylierung der PATs einen Einfluss auf deren subzelluläre Lokalisation hat, konnte mit diesem Experiment nicht eindeutig

beantwortet werden. Möglicherweise müssen bei einer Koexpression von Proteinen höhere Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors eingesetzt werden. Aus diesem Grund sollte in nachfolgenden Versuchen überprüft werden, ob höhere 2-Br-Konzentrationen die Tonoplastbindung von CBL2 in PAT10-koexprimierenden Zellen inhibieren kann.

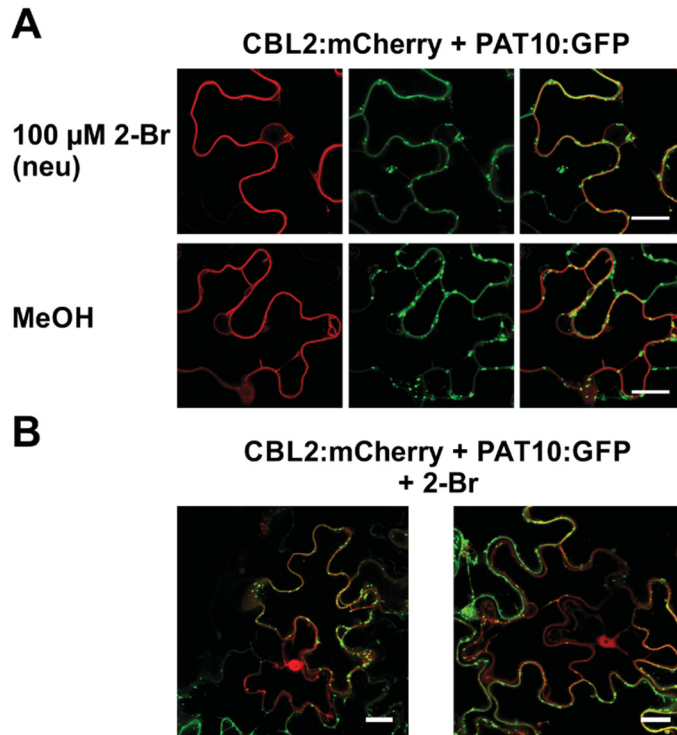


Abb. 15: Der S-Acylierungsinhibitor 2-Br hat bei einer PAT10-CBL2 Koexpression keinen Einfluss auf die Lokalisation beider Proteine. **A:** CBL2:mCherry und PAT10:GFP wurden in *N. benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und 100 μM 2-Br bzw. die äquivalente Menge des Lösungsmittels Methanol (MeOH) vakuumfiltriert. **B:** In einzelnen Zellen, in denen PAT10:GFP nicht exprimiert war, lokalisierte CBL2:mCherry cytoplasmatisch. Maßstab: 20 μm .

4.1.4 Die Tonoplastassoziation von CBL2 wird durch höhere Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br, bei gleichzeitiger PAT10-Koexpression nicht verhindert

Für die Inhibition der S-Acylierung mit 2-Br in Pflanzenzellen wird keine einheitliche Inhibitor Konzentration empfohlen und in der Literatur reichen die Angaben von 10 μM bis zu 1 mM eingesetztem 2-Br (Lavy et al. 2002; Batistič et al. 2008; Zhou et al. 2013). Bei der zuvor gezeigten PAT10-CBL2 Koexpression war die Konzentration von 100 μM 2-Br nicht ausreichend, um die Tonoplastbindung von CBL2 zu verhindern. Daher wurde die Koexpression von PAT10:GFP und CBL2:mCherry in *N. benthamiana* Blättern wiederholt und dabei verschiedene Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br von 50 μM – 1 mM eingesetzt. PAT10:GFP lokalisierte in der MeOH Lösungsmittelkontrolle und bei allen eingesetzten 2-Br-Konzentrationen an Golgi-Vesikeln und am Tonoplasten (Abb. 16). Das koexprimierte CBL2:mCherry assoziierte in allen Ansätzen mit dem Tonoplasten. 2-Br-Konzentrationen über 1 mM hatten eine sichtbare cytotoxische Wirkung auf Pflanzenzellen, die sich durch Fluoreszenzakkumulationen und zerstörte Zellstrukturen zeigten (hier nicht gezeigt). Daher wurde in weiteren Versuchen maximal 1 mM

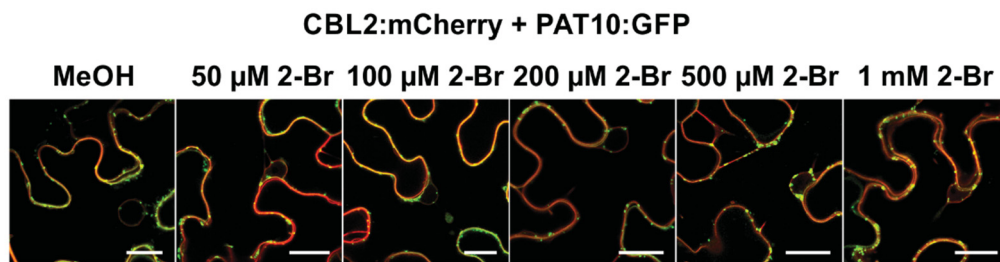


Abb. 16: Höhere Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br verhindern nicht die PAT10-vermittelte Tonoplastbindung von CBL2. CBL2:mCherry und PAT10:GFP wurden in *N. benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und die Protein-Lokalisationen unter Einsatz verschiedener Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Brompalmitat (2-Br) untersucht. Maßstab: 20 μ m.

2-Br eingesetzt. Dieser Versuch ergab also, dass beide Proteine auch bei der maximalen 2-Br-Konzentration keine veränderte Lokalisation zeigten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass CBL2 durch die überexprimierte PAT10 auch bei Zugabe von 1 mM 2-Br noch S-acyliert wurde und dadurch die Tonoplastbindung vermittelt werden konnte. Die endogenen Tabak PATs werden zwar durch 2-Br inhibiert und können das heterolog exprimierte CBL2 nicht mehr S-acylieren. Durch die Aktivität der koexprimierten PAT10 wird CBL2 jedoch auch bei hohen Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors lipidmodifiziert.

4.1.5 CBL2 wird am N-Terminus durch aktive S-Acylierung der PAT10 in Anwesenheit des S-Acylierungsinhibitors 2-Br an den Tonoplasten gebunden

Die DHHC-CRD Domäne ist für die katalytische Aktivität der PAT-Enzymfamilie essentiell. Bei vielen PATs wird das Cystein im DHHC Motiv als Autoacylierungsmotiv vermutet. Wird dieses Cystein durch die nicht-acylierbare unpolare Aminosäure Alanin substituiert (DHHA), wird das PAT^{DHHA} Protein nicht autoacyliert und kann somit keine Lipide auf die Substratproteine transferieren (Lobo et al. 2002; Roth et al. 2002; Batistič 2012). Der Calciumsensor CBL2 wurde trotz Zugabe hoher Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br, bei PAT10-Koexpression an den Tonoplasten gebunden. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtungen auf die S-Acylierungsaktivität von PAT10 gegenüber CBL2 zurückzuführen sind, wurden Kolokalisationsstudien von CBL2 mit einer inaktiven PAT10^{DHHA} durchgeführt. Dieses katalytisch inaktive Protein ist nicht in der Lage, den Phänotyp der *A. thaliana pat10* Mutante zu komplementieren und zeigt *in vitro* keine Autoacylierungsaktivität mehr (Qi et al. 2013). Zusätzlich wurde die Koexpression von PAT10 mit einer nicht-acylierbaren Variante des CBL2 Proteins untersucht. In diesem Protein wurden die drei Cysteinreste Cys4, Cys12 und Cys18 durch Alaninreste substituiert (CBL2^{AAA}). Es wurde bereits gezeigt, dass CBL2 nicht mehr an den Tonoplasten gebunden werden kann und cytosolisch vorliegt, wenn alle Cysteine mutiert sind (Batistič et al. 2012). Bei Koexpression von PAT10^{DHHA}:GFP und 2-Br Zugabe war CBL2:mCherry cytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 17). Im Gegensatz zum PAT10 Wildtyp-Protein zeigte PAT10^{DHHA} also keine CBL2-Translokationsaktivität mehr. Das PAT10^{DHHA} Protein war wie das autoacylierbare PAT10 Enzym am Tonoplasten und an Golgi-Vesikeln lokalisiert. Die

Autoacylierung ist somit für die PAT10 Lokalisation an Golgi-Vesikeln und am Tonoplasten nicht essentiell. Das nicht-acylierbare CBL2^{AAA}:mCherry Protein war bei Koexpression mit PAT10:GFP in An- und Abwesenheit von 2-Br cytosolisch lokalisiert. Die Ergebnisse dieses Experiments unterstützen die zuvor aufgestellte These, dass CBL2 aufgrund der S-Acylierung an Cysteinresten im N-Terminus, durch die katalytische Aktivität von PAT10 an den Tonoplasten gebunden wird.

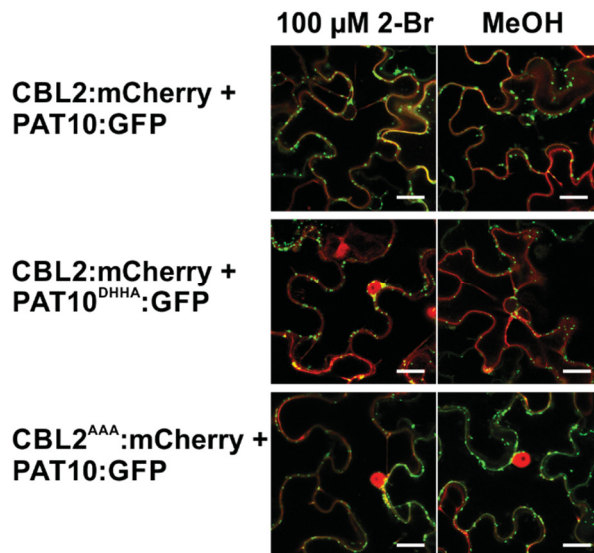


Abb. 17: Die Tonoplastassoziation von CBL2 wird trotz 2-Br-Applikation durch die PAT10-vermittelte S-Acylierung der N-terminalen Cysteine verursacht. CBL2:mCherry oder ein nicht-acylierbares CBL2^{AAA}:mCherry wurden jeweils mit PAT10:GFP oder einer katalytisch inaktiven PAT10^{DHHA}:GFP in *N. benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und 2-Br bzw. MeOH vakuuminfiltiert. Maßstab: 20µm.

4.1.6 Eine der beiden Tonoplast-lokaliserten PAT-Enzyme aus *A. thaliana* vermittelt die Assoziation von CBL2 mit der Vakuolenmembran

A. thaliana besitzt zwei Tonoplast-lokaliserte PAT-Enzyme. Während PAT10 eine duale Lokalisation an Golgi-Vesikeln und am Tonoplasten aufweist, ist PAT11 ausschließlich mit der Vakuolenmembran assoziiert (Batistič 2012). Ob auch PAT11 die Tonoplastassoziation von CBL2 vermitteln kann, wurde durch Koexpression des Fusionsproteins PAT11:GFP mit CBL2:mCherry und gleichzeitiger 2-Br-Applikation in *N. benthamiana* Epidermiszellen überprüft. Bei inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie und ohne koexprimierte PAT, sowie bei Koexpression von PAT11:GFP war CBL2:mCherry cytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 18). Die koexprimierte PAT11 konnte die inhibitorische Wirkung des 2-Br also nicht kompensieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass PAT10 spezifisch für die S-Acylierung und damit für die Tonoplastbindung von CBL2 verantwortlich ist. Die Tonoplast-lokaliserte PAT11 kann CBL2 jedoch nicht S-acylieren. Durch die Koexpression der PATs zusammen mit CBL2 und der gleichzeitigen Inhibition der endogenen Tabak S-Acylierungsmaschinerie durch 2-Br, können somit spezifisch Substrat-S-acylierende PAT-Enzyme *in planta* ermittelt werden. Da diese

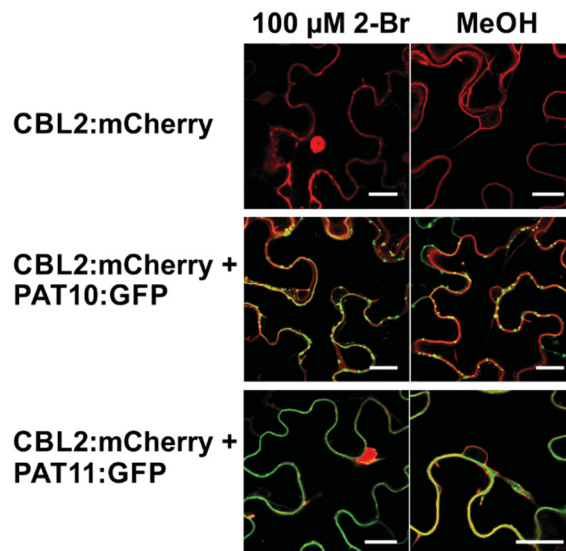


Abb. 18: PAT10, aber nicht PAT11 kann die Assoziation von CBL2 an den Tonoplasten in Anwesenheit des S-Acylierungsinhibitors 2-Br vermitteln. CBL2:mCherry wurde jeweils mit einer der beiden Tonoplast-lokalisierten PAT10:GFP und PAT11:GFP in *N. benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und anschließend 2-Br appliziert. Zusätzlich sind hier zwei Fluoreszenzaufnahmen aus Abb. 14 gezeigt, um die Lokalisation von CBL2:mCherry ohne koexprimierte PAT und mit koexprimierter PAT10 und -11 vergleichen zu können. Maßstab: 20 µm.

Methode auf dem Einsatz von 2-Brompalmitat und der Überexpression von PATs basiert, wird diese Technik fortan als BOP Assay bezeichnet (*2-Bromopalmitate and Overexpression of PAT proteins*).

4.1.7 Die koexprimierte PAT10 vermittelt eine Thioveresterung der Cysteine von CBL2

Die S-Acylierung von Proteinen kann mit Hilfe der *Biotin Switch* Methode biochemisch nachgewiesen werden. Um zu ermitteln, ob CBL2 während des BOP Assay durch die PAT10 S-acyliert und nicht durch 2-Br irreversibel alkyliert wurde, erfolgte eine Kombination der *Biotin Switch* Methode mit dem BOP Assay (BiBOP Assay). Bei der *Biotin Switch* Methode wird die S-Acylgruppe eines lipidmodifizierten Cysteins durch Hydroxylamin entfernt und durch Biotin ersetzt (Hemsley et al. 2008). Die codierende Sequenz (CDS) von CBL2 wurde für eine bessere Proteindetektion C-terminal mit der Sequenz eines 6-fachen Histidin Markers versehen (CBL2:6xHis). Das exprimierte Fusionsprotein wurde allein oder zusammen mit PAT10:GFP bzw. PAT11:GFP in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und 2-Br appliziert. Nach Durchführung des BiBOP Assay wurde CBL2:6xHis ohne 2-Br (MeOH) und bei Zugabe von Hydroxylamin aufgereinigt (Abb. 19). Wurde die endogene Tabak S-Acylierungsmaschinerie jedoch durch 2-Br inhibiert, war nach Aufreinigung nur ein schwaches CBL2:6xHis Signal zu erkennen. Bei Zugabe von 2-Br und zusätzlicher Koexpression von PAT10 wurde CBL2 wiederum effizient aufgereinigt. Bei Koexpression von PAT11 wurde lediglich eine schwache Aufreinigung von CBL2:6xHis beobachtet. In diesem Versuch wurde somit erstmalig die S-Acylierung von CBL2 durch endogene Tabak PATs, sowie die Inhibition dieser durch 2-Br biochemisch nachgewiesen. Wurde zusätzlich PAT10 koexprimiert, führte dies zu einer

Lipidbindung über eine Thioesterbindung an den Cysteinen von CBL2. Zudem deuteten die Ergebnisse des BiBOP Assay darauf hin, dass PAT10 spezifisch für die Thioveresterung des Calciumsensors CBL2 verantwortlich ist. CBL2 stellt kein Substratprotein der zweiten Tonoplast-lokalisierten PAT11 dar.

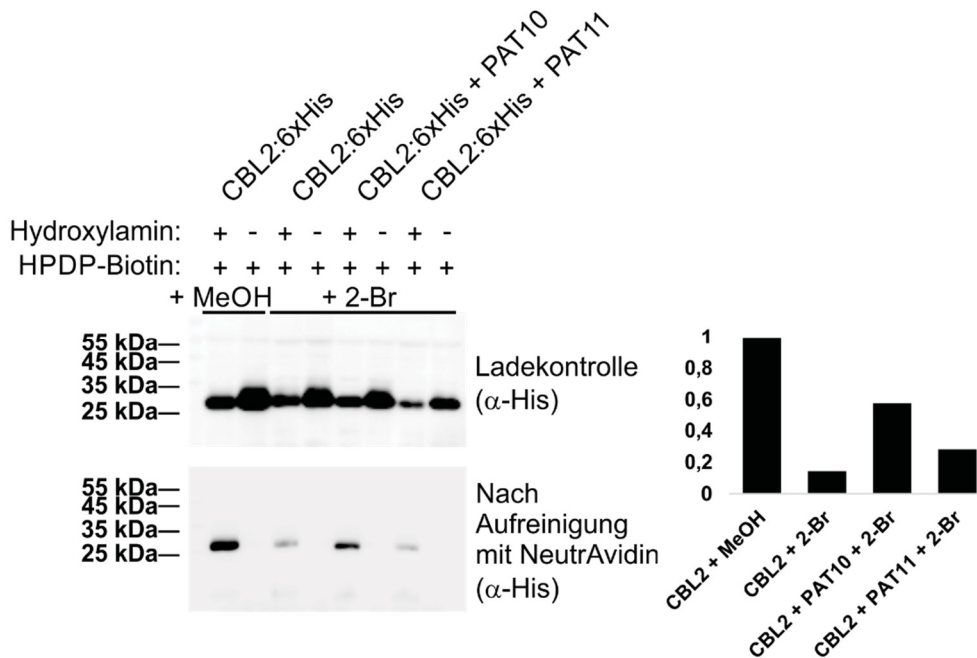


Abb. 19: Mit dem BiBOP Assay ist die Thioveresterung von CBL2 durch die koexprimierte PAT10 im BOP Assay biochemisch nachweisbar. CBL2:6xHis wurde allein oder zusammen mit PAT10:GFP oder PAT11:GFP in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und MeOH oder 2-Br vakuuminfiltriert. Die Ladekontrolle (oberer Western Blot) zeigt, dass CBL2:6xHis in allen Ansätzen vorhanden war. Auf dem unteren Western Blot wurden die Proteinsignale des biotinylierten (und somit S-acylierten) CBL2:6xHis detektiert. Zum besseren Vergleich der Proteinsignale wurde die Intensität der Banden in einem Diagramm dargestellt (rechts). Dabei wurde zuerst das Verhältnis vom jeweiligen Proteinsignal aus Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein ermittelt. Das Verhältnis von Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein der Probe „CBL2:6xHis + MeOH“ wurde dabei gleich 1 gesetzt. Anschließend wurden die Verhältnisse aus allen Ansätzen angeglichen.

4.2 Die Membranbindung von CBL2 kann durch mehrere PATs vermittelt werden

4.2.1 Mit Hilfe des BOP Assay können CBL2-translozierende PATs in planta ermittelt werden

Durch CBL2-Lokalisationsstudien in *A. thaliana pat10* Protoplasten, wurde PAT10 bereits als das Enzym identifiziert, welches die S-Acylierung des Calciumsensor Proteins CBL2 vermittelt (Zhou et al. 2013). Auch die bisherigen Ergebnisse des BOP Assay ergaben, dass die katalytische Aktivität von PAT10 für die Tonoplastassoziation von CBL2 verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu, führte eine Koexpression der anderen Tonoplast-lokalisierten PAT11 nicht zur S-Acylierung von CBL2.

Es wird angenommen, dass PAT-Enzyme teilweise die gleichen Substrate S-acylieren können, vor allem wenn sie aus derselben phylogenetischen Untergruppe stammen (Linder und Deschenes 2003; Hou et al. 2009). Sollte das auch auf die pflanzlichen PATs zutreffen, ist eine CBL2-S-Acylierung durch verschiedene AtPATs denkbar. Daher wurde der BOP Assay mit allen

24 *Arabidopsis* PATs durchgeführt, um weitere Enzyme zu ermitteln, die eine Membranbindung von CBL2 *in planta* vermitteln können. Dieser Versuch ergab, dass die Koexpression von acht der 24 PATs, bei inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie zu einer

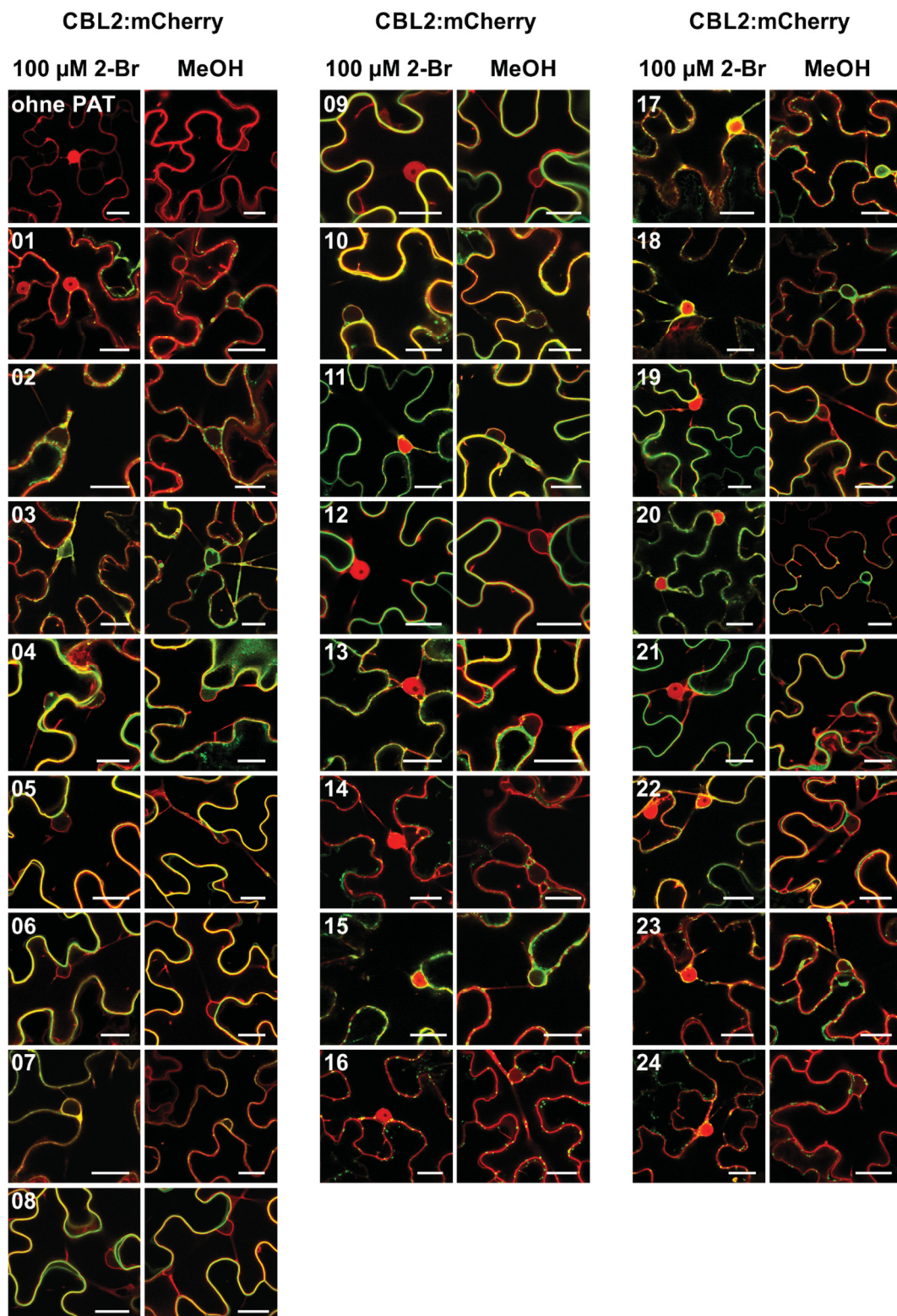


Abb. 20: Im BOP Assay vermittelten acht der 24 PATs eine Membranbindung von CBL2. PAT01 - 24:GFP wurden jeweils zusammen mit CBL2:mCherry in epidermalen *N. benthamiana* Zellen koexprimiert und 100 μM 2-Br oder MeOH vakuumfiltriert. Mit diesem Assay wurden die PATs 02 – 08 und 10 als CBL2-translozierende PATs *in planta* ermittelt. Maßstab: 20 μm.

Membranbindung von CBL2 führte (Abb. 20). Bei den so ermittelten PATs handelte es sich um die Vesikel-lokalisierte PAT02, die ER-lokalisierte PAT03, die Plasmamembran-lokaliserten PATs 04, - 08 und die bereits als CBL2-S-acylierend identifizierte PAT10. Durch Koexpression von sechs dieser acht ermittelten PATs (PAT02, 04 – 06, 08 und 10), wurde CBL2 an den Tonoplasten gebunden. Es konnten also überraschenderweise auch Enzyme eine Tonoplastbindung von CBL2 vermitteln, die selbst nicht an der Vakuolenmembran lokalisieren. Bei der Koexpression der beiden PATs 03 und 07 und gleichzeitiger 2-Br Zugabe war der Calciumsensor jedoch ER-lokalisiert. Die überexprimierten PATs 03 und 07 führten bei 2-Br Applikation somit zu einer Fehllokalisierung von CBL2 am ER. CBL2 lokalisierte bei Koexpression der 16 PATs 01, 09 und 11-24 und simultaner 2-Br Applikation cytoplasmatisch. Diese PATs waren dem Calciumsensor gegenüber demzufolge inaktiv. Die Ergebnisse des BOP Assay deuteten zusammenfassend darauf hin, dass neben der PAT10 noch sieben weitere PAT-Enzyme CBL2 S-acylieren können und dadurch fähig sind, eine Membranbindung des Calciumsensors vermitteln. Somit sind die hier ermittelten PATs 02 – 08 und 10 in Bezug auf die CBL2 Modifikation funktional überlappend. Die verbleibenden 16 PATs (PAT01, 09 und 11 – 24) können CBL2 nicht translozieren und unterscheiden sich offenbar funktional von den CBL2-S-acylierungsfähigen Enzymen PAT02 – 08 und 10. Diese Ergebnisse etablieren den BOP Assay zusammenfassend als neue *in vivo* Methode, mit der die Identifikation S-acylierender PAT-Enzyme eines bestimmten Substratproteins ermöglicht wird.

4.2.2 Eine induzierbare PAT-Expression erhöht die Selektivität des BOP Assay

In den bisher durchgeführten BOP Assays erfolgte zunächst die simultane Koexpression des jeweiligen PAT-Enzyms zusammen mit dem Calciumsensor CBL2 als Substratprotein in Tabak Epidermiszellen. Erst im Anschluss wurde die endogene Tabak S-Acylierungsmaschinerie durch Zugabe von 2-Br inhibiert. Um einen möglichen Einfluss des 2-Br auf die heterolog exprimierten PATs in der Zelle zu minimieren, wurde eine induzierbare Expression der PATs entwickelt. Dadurch wurde es möglich, CBL2 zuerst durch 2-Br in den nicht-acylierten Zustand zu bringen und erst anschließend die PAT-Expression zu induzieren. Diese Technik wird als iBOP Assay bezeichnet (induzierbarer BOP Assay). Dazu wurden die CDS einiger PATs in ein Plasmid eingebracht, welches eine durch β -Estradiol induzierte Proteinexpression ermöglicht (SUPERR:sXVE:GFP_C [Schlücking et al. 2013]). Vier Stunden nach 2-Br Zugabe wurde die PAT-Expression durch Applikation von β -Estradiol induziert. Der iBOP Assay wurde mit den PATs 01 - 10 durchgeführt, da einige Mitglieder dieser Gruppe bereits im BOP Assay als CBL2-translozierende PATs identifiziert wurden. Im iBOP Assay konnte die Inhibition der endogenen Tabak PATs anhand der cytoplasmatischen Lokalisation von CBL2 direkt vor der PAT-Expression beobachtet werden. Bei Koexpression der PATs 02, 04 – 06 und 10 und 2-Br Applikation assoziierte CBL2 mit dem Tonoplasten (Abb. 21). Die Koexpressionen der PATs 03, 07 und 08 führte in Anwesenheit von 2-Br zur cytoplasmatischen Lokalisation von CBL2. Diese Ergebnisse

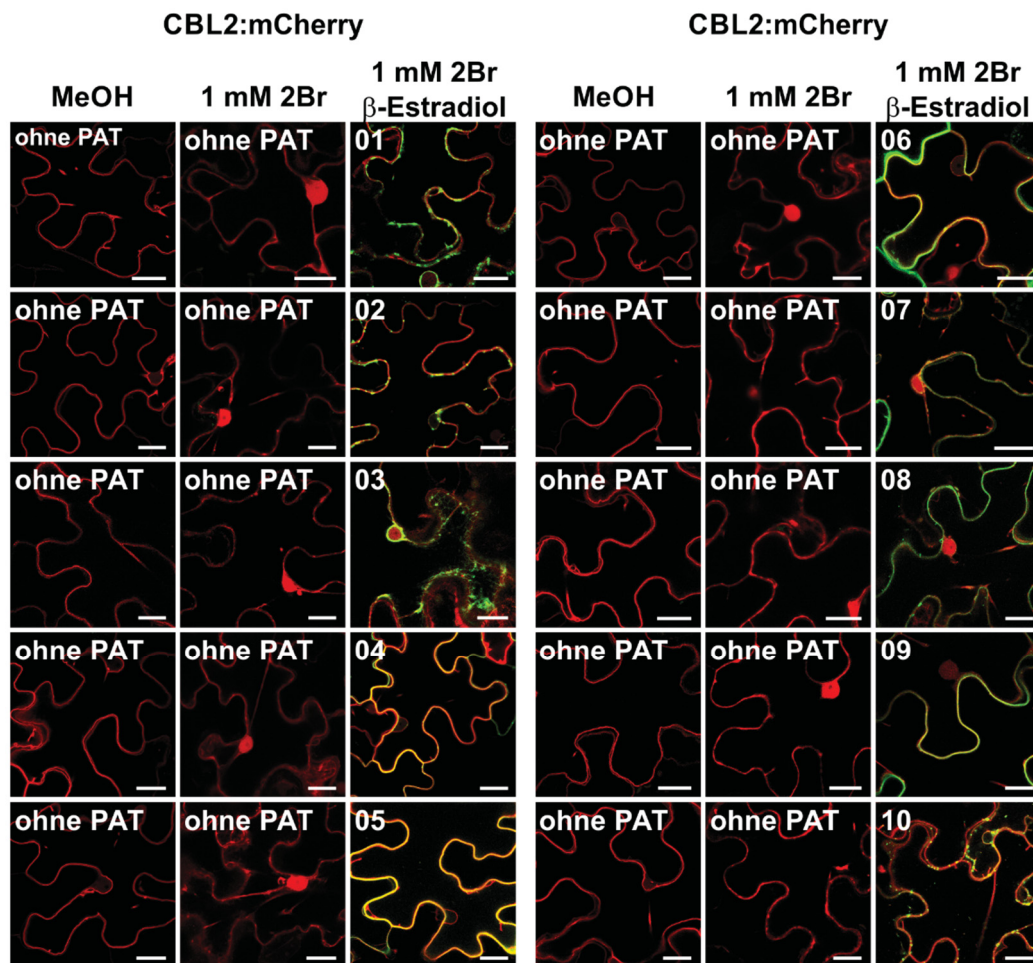


Abb. 21: Durch den induzierbaren BOP Assay (iBOP Assay) wird die Anzahl der CBL2-translozierenden PATs weiter reduziert. CBL2:mCherry wurde in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und 1 mM des S-Acylierungsinhibitor 2-Br vakuumfiltriert. Die Funktionsfähigkeit des 2-Br als S-Acylierungsinhibitor wurde anhand der cytoplasmatischen Lokalisation von CBL2:mCherry beobachtet. Anschließend wurde die PAT-Expression durch die Zugabe von β -Estradiol induziert. Maßstab: 20 μ m.

deuteten darauf hin, dass die PATs 02, 04, 05, 06 und 10 den Calciumsensor auch dann noch S-acylieren konnten, wenn der S-Acylierungsinhibitor 2-Br schon in den Pflanzenzellen vorhanden war. Anders als im BOP Assay ermöglichten PAT03, 07 und 08 im induzierbaren BOP Assay keine Membranbindung von CBL2 und zeigten somit in diesem Assay keine ausreichende Translokationsaktivität gegenüber CBL2. Somit wurde die Zahl der CBL2-translozierenden PATs aus dem BOP Assay durch die Ergebnisse aus dem iBOP Assay von acht auf fünf Enzyme reduziert. Das war ein Hinweis auf eine höhere Selektivität des iBOP gegenüber des BOP Assay. Es ist möglich, dass die CBL2-Translokationsaktivität der PATs 03, 07 und 08 nicht stark genug war, um eine Membranassoziation des bereits nicht-acylierten CBL2 Proteins zu verursachen. Die Ergebnisse zeigten also, dass durch den induzierbaren BOP Assay eine zusätzliche Selektion der PAT-Enzyme möglich ist, welche ein bestimmtes Substrat S-acylieren können.

4.2.3 Die CBL2-translozierenden PATs vermitteln auch eine Tonoplastbindung des Calciumsensors CBL3

Die beiden Calciumsensor Proteine CBL2 und 3 weisen zu 92 % die gleiche Aminosäuresequenz auf und sind aus einer Genduplikation entstanden (Kolukisaoglu et al. 2004; Eckert et al. 2014). Auch die S-Acylierungsmotive beider Proteine sind in ihren jeweiligen N-Termini identisch positioniert (Batistič et al. 2012). Aufgrund dieser übereinstimmenden Anordnung der Cysteinreste wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Tonoplastassoziationen von CBL2 und CBL3 durch die gleichen PATs vermittelt wird. Um diese Hypothese experimentell zu unterstützen, wurde der BOP Assay mit ausgewählten PATs und CBL3 durchgeführt. Einige PATs aus der phylogenetischen Untergruppe A (PAT01 – 09), sowie PAT10 wurden in den vorherigen BOP Assays bereits als CBL2-S-acylierungsfähige PATs identifiziert. Aus diesem Grund wurden die PATs 01 – 10 für den BOP Assay mit CBL3 ausgewählt. Zusätzlich wurde auch die PAT11 als weiteres Tonoplast-lokalisiertes Enzym untersucht.

Dieser BOP Assay ergab, dass CBL3 bei Koexpression der PATs 01 – 10 und inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie durch 2-Br membrangebunden vorlag (Abb. 22). Dabei resultierte die Koexpression der PATs 01, 02, 04 – 06 und 08 – 10 in einer Tonoplastassoziation von CBL3. Wie schon im BOP Assay mit CBL2, lag auch CBL3 bei Koexpression von PAT03 und 07 und in Anwesenheit von 2-Br ER-gebunden vor. Die

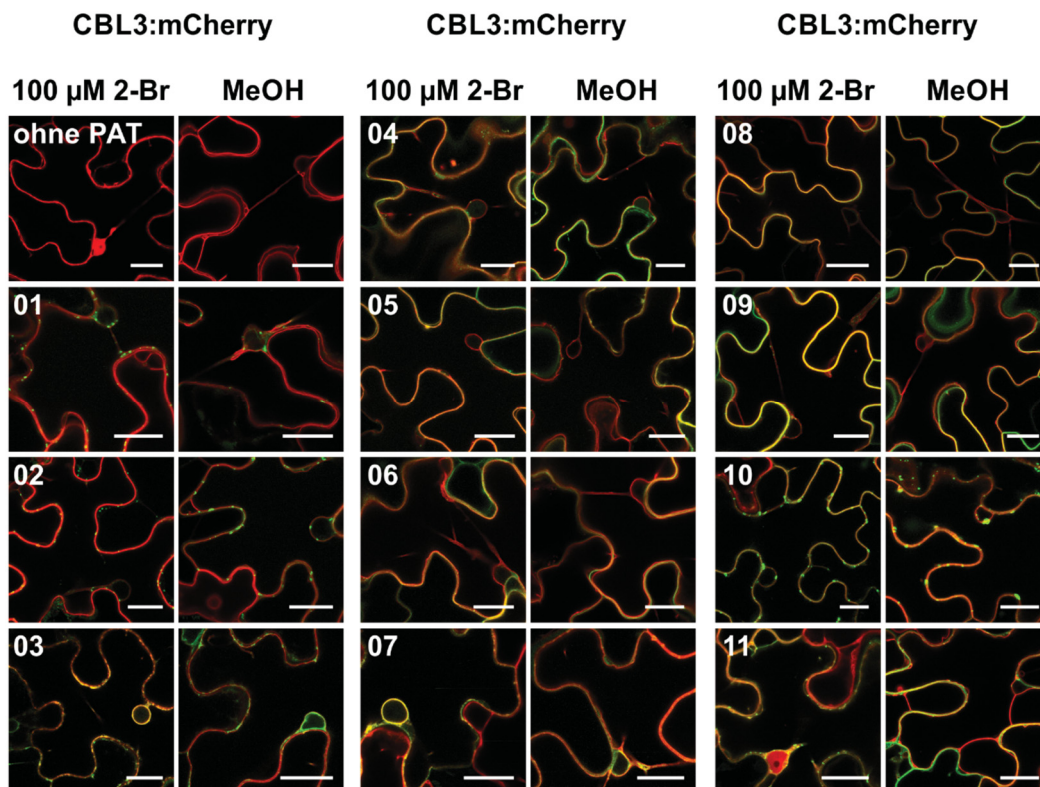


Abb. 22: Die Membranbindung von CBL2 und CBL3 wird im BOP Assay von den gleichen PATs verursacht. PAT01-11:GFP wurden jeweils zusammen mit CBL3:mCherry in epidermalen *N. benthamiana* Zellen koexprimiert und 100 µM 2-Br oder MeOH vakuuminfiltriert. Hier wurden die PATs 01 – 10 als CBL3-translozierende Enzyme ermittelt. Maßstab: 20 µm.

Koexpression der PAT11 führte in Anwesenheit von 2-Br nicht zur Membranbindung und CBL3 lokalisierte im Cytoplasma der Tabakzellen. In den BOP Assays wurden somit die beiden Calciumsensoren CBL2 und CBL3 von den gleichen PATs (PAT02 – 08 und 10) an Membranen transloziert. Unterschiede zeigten sich jedoch bei Koexpression der PATs 01 und 09. Diese PATs vermittelten *in planta* eine Tonoplastbindung von CBL3, zeigten in zuvor durchgeführten BOP Assays jedoch keine Translokationsaktivität gegenüber CBL2. Die Zahl der CBL3-translozierenden PATs im BOP Assay war somit im Vergleich zu den CBL2-S-acylierungsfähigen PATs etwas größer. Eine zusätzliche Selektion der CBL3-translozierenden PATs sollte zukünftig die Durchführung des induzierbaren BOP Assay mit CBL3 ermöglichen.

Größtenteils können CBL2 und CBL3 also von den gleichen PATs der Untergruppe A und von PAT10 transloziert werden. Es gibt jedoch auch PATs, die eine Tonoplastbindung von CBL3 vermitteln, CBL2 gegenüber jedoch *in planta* keine Translokationsaktivität zeigen.

4.2.4 Eine Koexpression verschiedener PATs mit CBL2 und CBL3 führt zu einer Membranbindung der beiden Calciumsensoren in Hefezellen

Die Etablierung des BOP Assay ermöglichte es, die PAT-Enzyme zu identifizieren, welche die Tonoplastbindung von CBL2 und CBL3 vermitteln können. Ein Nachteil des BOP Assay ist jedoch der Einsatz des toxischen Inhibitors 2-Br, der nicht in hohen Konzentrationen über 1 mM eingesetzt werden konnte und zusätzlich zur Protein-S-Acylierung möglicherweise noch andere zelluläre Prozesse inhibiert. Die Entwicklung eines experimentellen Systems, mit der Substrat-S-acylierende PATs ohne den Einsatz von 2-Br ermittelt werden können, war somit wünschenswert. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt im Vergleich zu *A. thaliana* eine kleinere Gruppe von Protein-S-Acyltransferasen, welche aus sieben Enzymen besteht (Hou et al. 2009). Diese kleine Anzahl an ScPATs ist für die Untersuchung der Protein-S-Acylierung durch ein bestimmtes PAT-Enzym von großem Vorteil. Es können bis zu sechs der sieben ScPATs genetisch ausgeschaltet werden ohne die Vitalität der Hefezellen einzuschränken (Roth et al. 2006; Hou et al. 2009). Aus früheren Lokalisationsstudien war bekannt, dass der Calciumsensor CBL2 in der Wildtyp-Hefe cytosolisch lokalisiert ist. Das ließ den Schluss zu, dass keine der sieben Hefe PATs CBL2 als Substrat erkennt. Wird aber beispielsweise PAT10 in der Hefe koexprimiert, führt dies zu einer Bindung von CBL2 an die Vakuolen- und die Plasmamembran (Beckmann und Batistič, in Vorbereitung). Daher wurde die Koexpression der pflanzlichen PATs und CBLs in Hefe dazu genutzt, um funktionale PAT-Enzym-Substrat Paare zu identifizieren. Um diese Methode zu testen, wurde die CDS aller 24 PATs aus *Arabidopsis* zunächst in ein Hefepiasmid integriert. Dabei wurden die PATs C-terminal mit einem dreifachen HA-Peptid fusioniert, sodass im Anschluss eine Überprüfung der PAT-Expression mittels Western Analyse möglich war. Für diese Versuche wurden die N-Termini der CBLs mit einem *yeast enhanced* GFP fusioniert (CBLn:yeGFP). Die CBL N-Termini enthalten die drei S-acylierbaren Cysteinreste und sind für die Membranbindung hinreichend (Batistič et al. 2012). Außerdem wurde in bereits

durchgeführten Versuchen beobachtet, dass das CBL2n:yeGFP Fusionsprotein in Hefezellen stärker exprimiert ist als das CBL2 vollständiger Länge (O. Batistič, unveröffentlichte Daten). Vor den Koexpressionen der PATs mit CBL2n und CBL3n wurden Kontrolleexpressionen in Hefezellen durchgeführt (Abb. A1, siehe Anhang). Dabei wurde das yeGFP allein oder zusammen mit PAT10 exprimiert. Desweiteren erfolgte die Koexpression eines nicht-acylierbaren CBL2^{AAA}n:yeGFP

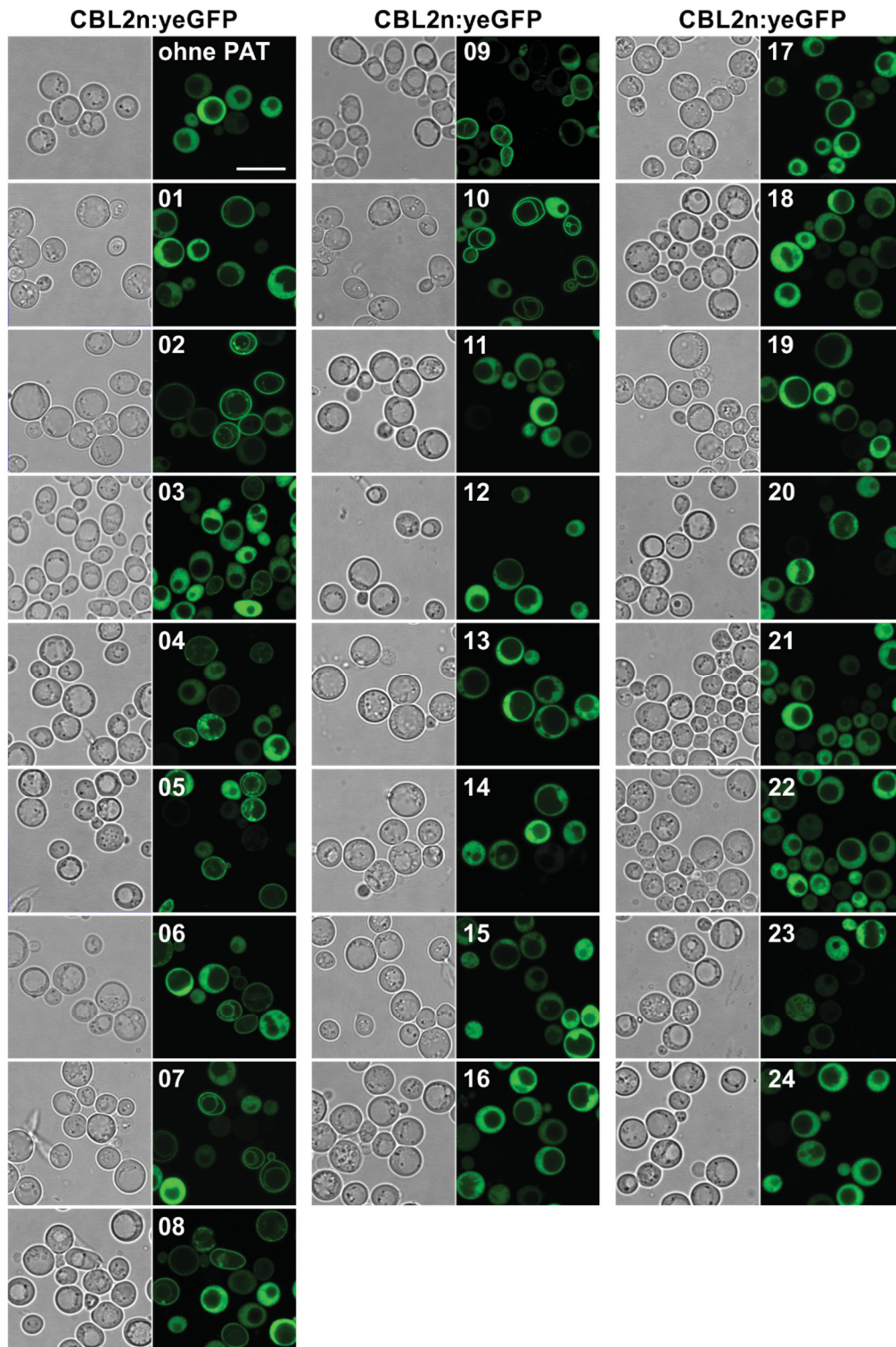


Abb. 23: Die PATs 01 – 10 vermitteln eine Membranbindung des CBL2n:yeGFP Fusionsproteins in Hefezellen. Die PATs 01 – 24:3xHA wurden jeweils mit CBL2n:yeGFP in Hefezellen koexprimiert und die Lokalisation von CBL2n:yeGFP analysiert. Maßstab: 10 μ m.

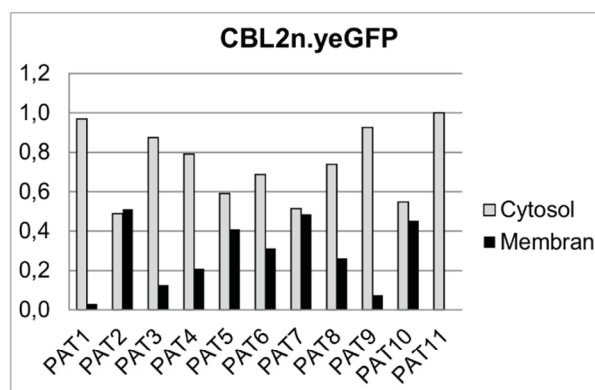
Fusionsproteins, jeweils mit der PAT10 oder der nicht-autoacylierbaren PAT10^{DHHA} in Hefezellen. Das yeGFP und das nicht-acylierbare CBL2^{AAA}n:yeGFP Protein lokalisierten bei gleichzeitiger Überexpression von PAT10 oder PAT10^{DHHA} im Cytoplasma von *S. cerevisiae*. Das Fluoreszenzprotein yeGFP allein wurde durch die PAT10 somit nicht lipidmodifiziert. Außerdem zeigten die Kontrollexperimente, dass CBL2n:yeGFP aufgrund der S-Acylierung an Cysteinen durch die aktive überexprimierte PAT10 an Membranen in Hefezellen assoziiert wurde.

Im Anschluss wurde jede der 24 *Arabidopsis* PATs jeweils mit CBL2n:yeGFP in *S. cerevisiae* Wildtyp-Zellen exprimiert und die Lokalisation des Calciumsensors analysiert. CBL2n:yeGFP wurde durch Koexpression der PATs 01 - 10 in einigen Hefezellen an Membranen gebunden (Abb. 23). Bei Koexpression der PATs 02, 05 – 08 und 10 wurde das Fusionsprotein CBL2n:yeGFP an die Plasmamembran und an die Vakuolenmembran gebunden. Im Gegensatz dazu hatte die Koexpression der PATs 11 – 24 keinen Einfluss auf die cytoplasmatische Lokalisation von CBL2n:yeGFP in den Hefezellen. Bei diesen CBL2n-Lokalisationsstudien zeigte sich, dass CBL2n nicht in allen Hefezellen membrangebunden vorlag und trotz überexprimierter CBL2-translozierender PAT in einigen Zellen cytosolisch lokalisiert war. Eine Erklärung dafür ist, dass die jeweilige PAT in diesen Hefezellen nicht oder nur schwach exprimiert wurde. Um diese These zu überprüfen, sollten die Expressionen der PATs in den einzelnen Hefezellen zukünftig durch die Fusion mit Fluoreszenzproteinen überprüft werden. Die Anzahl der Hefezellen mit cytoplasmatisch-lokalisiertem und membrangebundenem CBL2n:yeGFP war je nach PAT-CBL2n Kombination unterschiedlich. Zur besseren Übersicht wurden daher zusätzlich die Verhältnisse der Hefezellen mit membrangebundener und cytosolischer Fluoreszenz für jede PAT-CBL2 Kombination ermittelt. Das Diagramm in Abb. 24A verdeutlicht diese Unterschiede bei den verschiedenen PAT-CBL2n Kombinationen. So konnte PAT01 beispielsweise zwar eine Membranbindung von CBL2n verursachen, jedoch lag CBL2n hier in einer verhältnismäßig geringen Anzahl an Hefezellen membrangebunden vor (etwa 8 % membrangebunden und 92 % cytosolisch). Im Gegensatz dazu lag CBL2n bei Koexpressionen der PATs 02, 07 und 10 etwa in der Hälfte der Hefezellen membrangebunden vor.

Um zu untersuchen, ob eine hohe Anzahl an Hefezellen mit membrangebundenem CBL2n:yeGFP und die jeweilige PAT-Expressionsstärke korrelieren, wurde zusätzlich die PAT-Proteinexpression in den Hefezellen überprüft. Dazu erfolgte die Isolation der Proteine aus den Hefezellen mit anschließender Western Analyse. Die meisten der 24 PATs, die mit CBL2n:yeGFP koexprimiert wurden, wurden in dieser Western Analyse detektiert (Abb. 24B). Nicht detektierbar waren die PATs 11, 19, 20 und 22. Daher wurden die Expressionen dieser PATs unter der Kontrolle eines stärkeren Promotors durchgeführt (pVac8). Anschließend wurden erneut die Lokalisation des koexprimierten Fusionsproteins CBL2n:yeGFP und die PAT-Expressionen überprüft. Auch die stärkere Expression der PATs 11, 19, 20 und 22 führte zu keiner Membranbindung von CBL2n. Die Expression der vier PATs 11, 19, 20 und 22 wurde in diesem

Fall mittels Western Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte die Western Analyse, dass die Expressionsstärke der CBL2-translozierenden PATs nicht in jedem Fall mit einer hohen Anzahl an Hefezellen mit membrangebundenem CBL2n:yeGFP korrelierte. PAT02 wurde in den Hefezellen stark exprimiert und ihre Koexpression verursachte damit korrelierend eine Membranassoziation von CBL2n:yeGFP in einer hohen Anzahl an Hefezellen (etwa 51 % membrangebunden und 49 % cytosolisch). Im Vergleich dazu zeigte PAT10 eine relativ schwache Expressionsstärke, verursachte aber eine Membranbindung von CBL2n:yeGFP in vielen Hefezellen aus (etwa 55 % membrangebunden und 45 % cytosolisch). Außerdem vermittelten die beiden am stärksten exprimierten PATs 13 und 14 keine Membranassoziation von CBL2n:yeGFP.

A



B

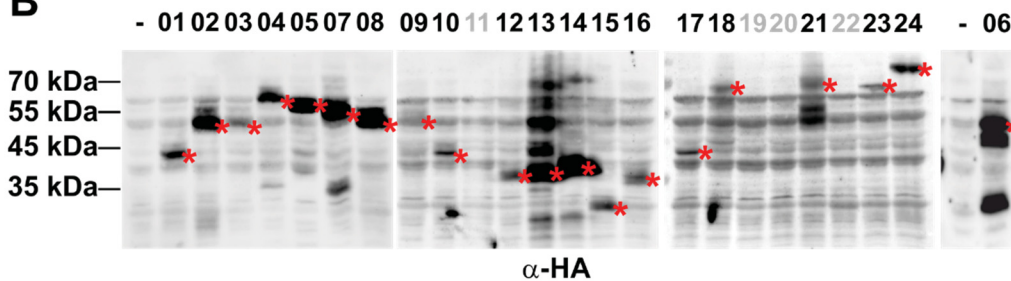


Abb. 24: Die verschiedenen PATs zeigen Unterschiede in der CBL2n S-Acylierung. **A:** Das gezeigte Diagramm gibt die Verhältnisse der Hefezellen mit membrangebundener und cytosolischer Fluoreszenz nach Koexpression der *Arabidopsis* PATs 01 – 11 mit CBL2n:yeGFP an. Dazu wurden jeweils ca. 100 Hefezellen jeder PAT-CBL2n Kombination ausgewählt und die Anzahl der Hefezellen mit Fluoreszenz an Membranen und im Cytosol bestimmt. **B:** Western Blot Analyse zum Expressionsnachweis der *Arabidopsis* PATs 01 – 24 nach Koexpression mit CBL2n:yeGFP in Hefezellen. Die roten Sternchen rechts neben den Proteinbanden zeigen die Größe des jeweiligen Enzyms an. Bis auf die PATs 11, 19, 20 und 22 (grau markiert) wurden hier alle PATs nachgewiesen.

Um zu überprüfen, ob die Membranbindung von CBL2n:yeGFP durch die S-Acylierungsaktivität der PATs in den Hefezellen vermittelt wurde, wurden zusätzlich PAT^{DHHA} Versionen der PATs 01 - 10 zusammen mit CBL2n:yeGFP in Hefezellen koexprimiert. Bei Koexpression der nicht-autoacylierbaren Proteine PAT01 - 10^{DHHA} lokalisierte CBL2n:yeGFP cytoplasmatisch (Abb. 25A). Die PAT^{DHHA} Proteinexpressionen wurden zusätzlich durch eine Western Analyse nachgewiesen (Abb. 25B). Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass das Cystein des DHHC Motivs für die

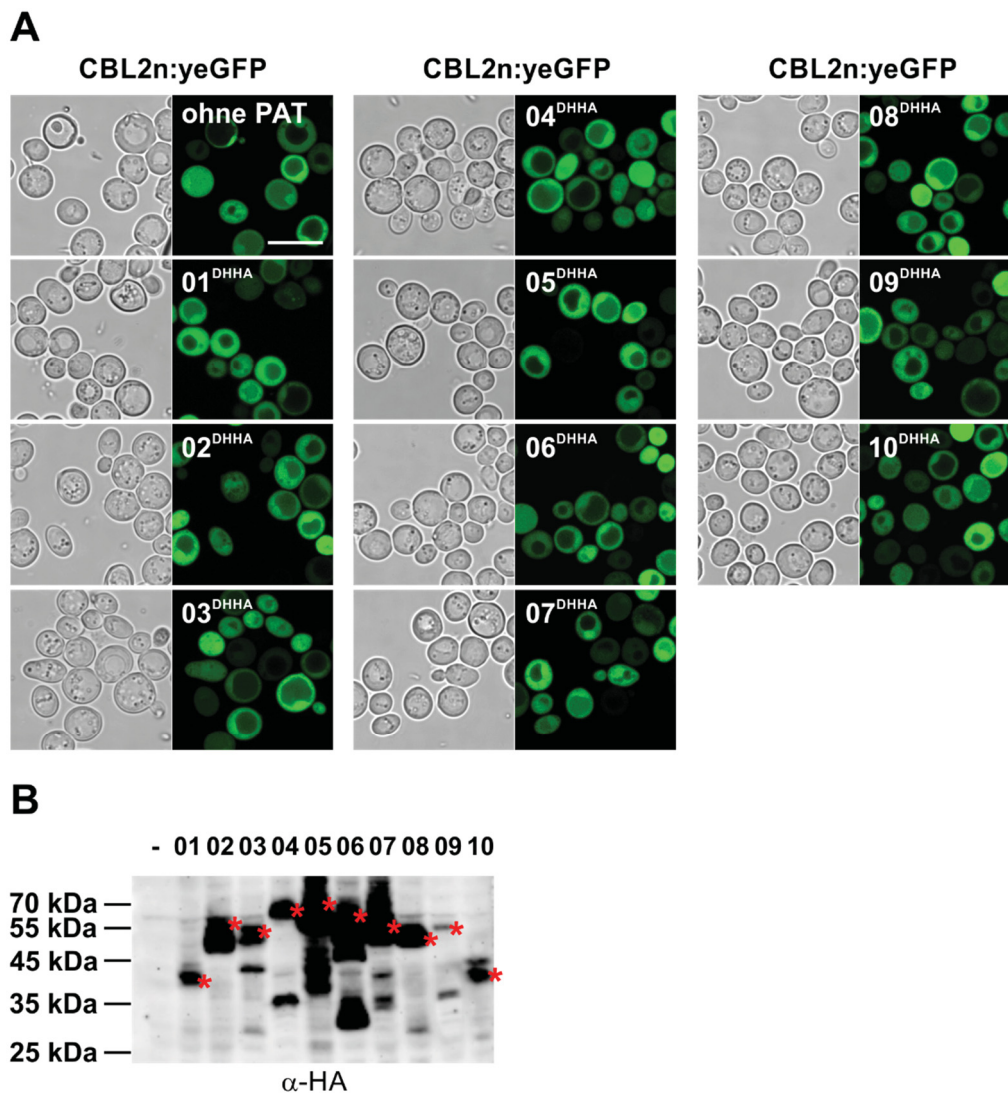


Abb. 25: Der Austausch des Cysteins im DHHC Motiv der PATs 01 – 10 zu Alanin führt zu katalytisch inaktiven Proteinen. A: CBL2n:yeGFP wurde allein oder jeweils mit einer der PAT^{DHHA}s 01 – 10:3xHA in Hefezellen exprimiert und die Lokalisation von CBL2n:yeGFP analysiert. Maßstab: 10 μ m. **B:** Western Analyse zur Kontrolle der PAT^{DHHA} Expressionen in Hefezellen. Die roten Sternchen rechts neben den Proteinbanden zeigen die Größe des jeweiligen Enzyms an.

S-Acylierungsaktivität der PATs essentiell ist. Durch dieses Cystein wird die CBL2n-S-Acylierung ermöglicht und so die Bindung von CBL2n:yeGFP an Hefezellmembranen vermittelt.

Beim Vergleich mit *in planta* BOP Assay Ergebnissen fiel auf, dass die Anzahl der CBL2n-S-acylierungsfähigen PATs in Hefezellen etwas größer war (zehn CBL2n-S-acylierungsfähige PATs in Hefezellen und acht CBL2-S-acylierungsfähige PATs im BOP Assay). Bei den Koexpressionen in Hefe wurden im Gegensatz zu den BOP Assays lediglich die ersten 22 Aminosäuren von CBL2 untersucht und es bestand die Möglichkeit, dass der CBL2 N-Terminus weniger selektiv von einer größeren Anzahl an PATs erkannt und S-acyliert werden kann als das vollständige CBL2 Protein. Zur Untersuchung dieser These, wurde zusätzlich das komplette CBL2 an ein yeGFP fusioniert und mit den PATs 01 - 10 in Hefezellen koexprimiert (Abb. A2, siehe Anhang). Auch hier verursachten die PATs 01 - 10 eine Membranbindung von CBL2. Folglich stimmten CBL2n und CBL2 in der Anzahl ihrer translozierenden PATs überein. In

Hefe stellt der CBL2 N-Terminus somit im Vergleich zum vollständigen CBL2 Protein kein weniger selektives Substrat für die PAT-Enzyme dar. Ob das auch *in planta* der Fall ist, sollte zukünftig mit einem BOP Assay untersucht werden, bei dem der CBL2 N-Terminus mit den AtPATs koexprimiert wird.

Auch der N-Terminus des Calciumsensors CBL3 wurde als CBL3n:yeGFP Fusionsprotein zusammen mit den PATs 01 – 11 in Hefezellen koexprimiert und die Lokalisation von CBL3n untersucht (Abb. A3 A, siehe Anhang). Diese Analyse ergab, dass CBL3n von den PATs 01 – 10 in Zellmembranen verankert wurde. In den Hefezellen stellen CBL2n und CBL3n somit ein S-Acylierungssubstrat für dieselben PAT-Enzyme dar. Bei der subzellulären Lokalisation von CBL2n und CBL3n waren jedoch Unterschiede erkennbar. So fiel zum einen auf, dass CBL3n im Vergleich zu CBL2n verstärkt an der Plasmamembran lokalisierte und weniger häufig mit der Vakuolenmembran assoziierte. Außerdem wurden im Vergleich zu den PAT-CBL2n Koexpressionen, nach den Koexpressionen der PATs mit CBL3n weniger Hefezellen mit cytoplasmatischer Fluoreszenz gezählt (Abb. A3 B, siehe Anhang). Es wurden also im Vergleich zu CBL2n:yeGFP Fusionsproteinen vermutlich eine größere Anzahl an CBL3n:yeGFP Proteinen S-acyliert und dadurch in Hefezellmembranen verankert.

Zusammengefasst korrelierten die Ergebnisse aus den Koexpressionen der PATs mit CBL2 und CBL3 in *S. cerevisiae* größtenteils mit den Ergebnissen aus den BOP Assays *in planta*. Die Koexpression der PATs zusammen mit dem Substratprotein in Hefezellen kann also als unterstützende Methode hinzugezogen werden, bei welcher Substrat-S-acylierende PATs ohne 2-Br Zugabe ermittelt werden können.

4.3 Der Calciumsensor CBL2 stellt ein S-Acylierungssubstrat für PAT10 in *A. thaliana* dar

*4.3.1 Die zwei *A.thaliana pat10* Mutanten *pat10.1* und *pat10.3* sind Funktionsverlustmutanten*

Die verschiedenen *A. thaliana* Verlustmutanten (*pat10.1*, *pat10.2* und *pat10.3*) weisen sichtbare Wachstums- und Entwicklungsdefizite auf. Außerdem wurde bei *pat10.1* und *pat10.2* Pflanzen eine hypersensitive Reaktion auf Salzstress festgestellt (Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013). Diese Eigenschaften werden auf einen Funktionsverlust von PAT10 zurückgeführt. Die T-DNA Insertionen in allen drei bisher charakterisierten Mutanten liegen allerdings nahe des 3'-Endes im Leseraster des PAT10 Gens. Zudem wurden bei Transkriptanalysen durch RT-PCR verkürzte PAT10 Transkripte in allen drei *pat10* Mutanten detektiert (Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013). Es war also möglich, dass die dort verwendeten *pat10* Pflanzen noch verkürzte PAT10 Proteine synthetisierten, die die katalytisch essentielle PAT10 DHHC-CRD Domäne enthielten. Um das zu überprüfen, sollte die CBL2-S-Acylierungsaktivität der jeweiligen verkürzten PAT10 Proteine untersucht im BOP Assay werden. Da in dieser Arbeit mit den *A. thaliana pat10.1* und *pat10.3*

Mutanten gearbeitet wurde, wurden die entsprechenden verkürzten Proteine werden im Folgenden PAT10.1 und PAT10.3 bezeichnet. Das PAT10.1 Protein besitzt alle vier Transmembrandomänen (TMD), es fehlt lediglich das C-terminale cytosolische Ende des Proteins (Abb. 26A). Das PAT10.3 Protein ist etwas kürzer, hier fehlen der C-Terminus sowie etwa die Hälfte der vierten TMD. Ob PAT10.1 und PAT10.3 noch S-Acylierungsaktivität aufweisen, war nicht bekannt. Um das zu untersuchen, wurden PAT10.1 und PAT10.3 C-terminal mit einem GFP Fluoreszenzprotein fusioniert und zusammen mit CBL2 in einem BOP Assay untersucht. PAT10.1 und PAT10.3 lokalisierten am ER der Tabakzellen, zusätzlich lag PAT10.1 Vesikel-gebunden vor (Abb. 26B). Bei diesen handelte es sich vermutlich um Golgi-Vesikel. Somit zeigten weder PAT10.1 noch PAT10.3 die PAT10 Lokalisation in Golgi-Vesikeln und am Tonoplasten. Die Vesikel-Lokalisation der PAT10.1 mit 4 vollständigen TMD, wies darauf hin, dass das Vorhandensein der vier TMD für die Lokalisation in Golgi-Vesikeln essentiell ist. Die ER-Bindung von PAT10.1 und PAT10.3 deutete auf die Bedeutung des PAT10 C-Terminus' für die Tonoplast-Lokalisation hin.

Darüber hinaus lokalisierte CBL2:mCherry im BOP Assay mit beiden verkürzten PAT10 Proteinen und 2-Br Applikation im Cytoplasma der Tabakzellen. PAT10.1 und PAT10.3 zeigten also keine CBL2-S-Acylierungsaktivität mehr. Dieses Resultat wies zudem darauf hin, dass der PAT10 C-Terminus für die katalytische Aktivität des Enzyms notwendig ist. Um das Ergebnis des BOP

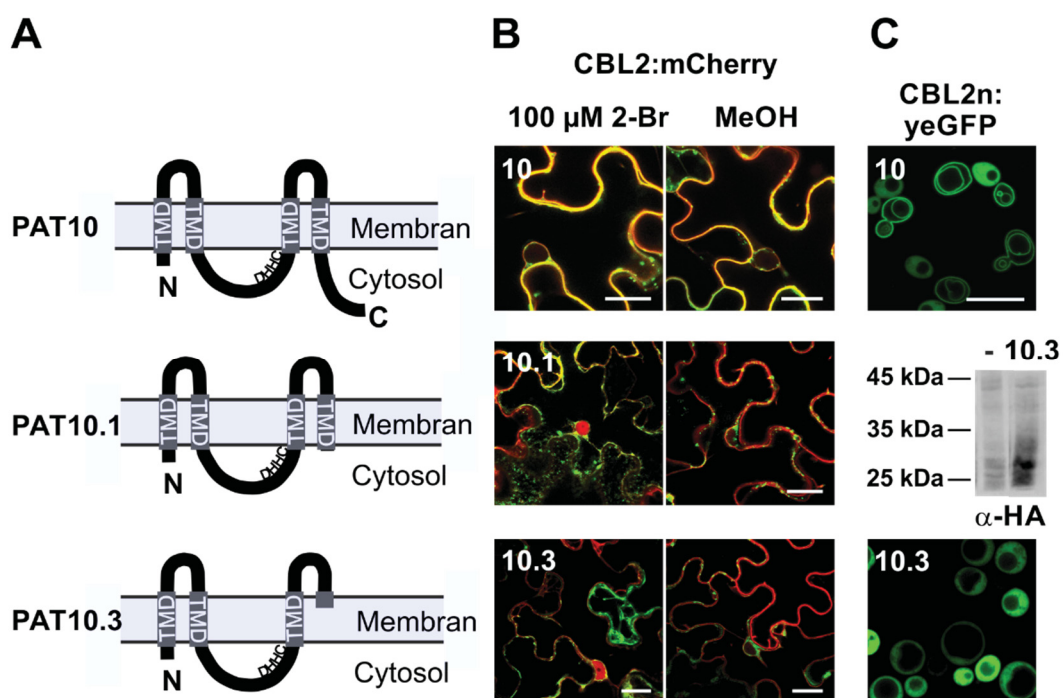


Abb. 26: Die verkürzten PAT10 Proteine PAT10.1 und PAT10.3 aus den *Arabidopsis pat10* Mutanten lokalisieren nicht am Tonoplasten und zeigen keine CBL2-S-Acylierungsaktivität. **A:** Schematische Struktur des PAT10 Enzyms und der beiden verkürzten Proteine PAT10.1 und PAT10.3. **B:** PAT10:GFP, PAT10.1:GFP und PAT10.3:GFP wurden zusammen mit CBL2:mCherry in epidermalen *N. benthamiana* Zellen koexprimiert und 100 µM 2-Br oder MeOH vakuumfiltriert. Maßstab: 20 µm. **C:** Koexpressionen von PAT10:3xHA (aus Abb. 23) und des verkürzten Proteins PAT10.3:3xHA zusammen mit CBL2n:yeGFP in Hefezellen. Maßstab: 10 µm. Die Proteine wurden zusätzlich aus den Hefezellen isoliert und eine Western Analyse durchgeführt.

Assay in einem weiteren Experiment zu überprüfen, wurde die Lokalisation von CBL2n:yeGFP bei Koexpression der verkürzten PAT10.3 in Hefezellen überprüft. CBL2n:yeGFP lokalisierte bei Koexpression von PAT10.3 im Cytoplasma der Hefezellen (Abb. 26C). Im Gegensatz zum PAT10 Wildtyp-Enzym, zeigte das verkürzte PAT10.3 Protein also keine CBL2-Translokationsaktivität mehr. Die anschließende Western Analyse ergab, dass PAT10.3 in den Hefezellen exprimiert wurde. Um die generelle S-Acylierungsaktivität von PAT10.1 und PAT10.3 zu untersuchen, wurde deren Aktivität gegenüber dem nicht-selektiven S-Acylierungssubstrat Vac8p in einer Hefe *pat* Fünffachmutante analysiert. Hier zeigten PAT10.1 und PAT10.3 im Gegensatz zum Vac8p-translozierenden PAT10 Wildtyp-Protein, keine Translokationsaktivität gegenüber Vac8p (Daten nicht gezeigt [Beckmann und Batistič, in Vorbereitung]).

Durch Anwendung des BOP Assay und der Koexpressionen der Proteine in Hefezellen wurde somit nachgewiesen, dass es sich bei den verkürzten Proteinen PAT10.1 und PAT10.3 um fehllokalisierte Proteine ohne S-Acylierungsaktivität handelt. Im Fall einer Proteinsynthese aus den *pat10.1* und *pat10.3* Transkripten in den *A. thaliana pat10* Mutanten, werden in diesen Pflanzen somit verkürzte, katalytisch inaktive PAT10 Proteine generiert. Also handelt es sich bei den *Arabidopsis pat10* Pflanzen um Funktionsverlustmutanten.

4.3.2 CBL2 lokalisiert cytoplasmatisch in epidermalen Zellen von *A. thaliana pat10* Funktionsverlustmutanten

Im Laufe dieser Arbeit veröffentlichten Zhou und Kollegen einen Artikel, in dem die drei Calciumsensoren CBL2, CBL3 und CBL6 im Cytoplasma von Protoplasten einer *Arabidopsis pat10* Mutante lokalisiert wurden. Die Tonoplastbindung dieser drei Proteine wurde dort auf die S-Acylierung der PAT10 zurückgeführt (Zhou et al. 2013). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse des BOP Assay und der Koexpressionen der PATs zusammen mit CBL2 und CBL3

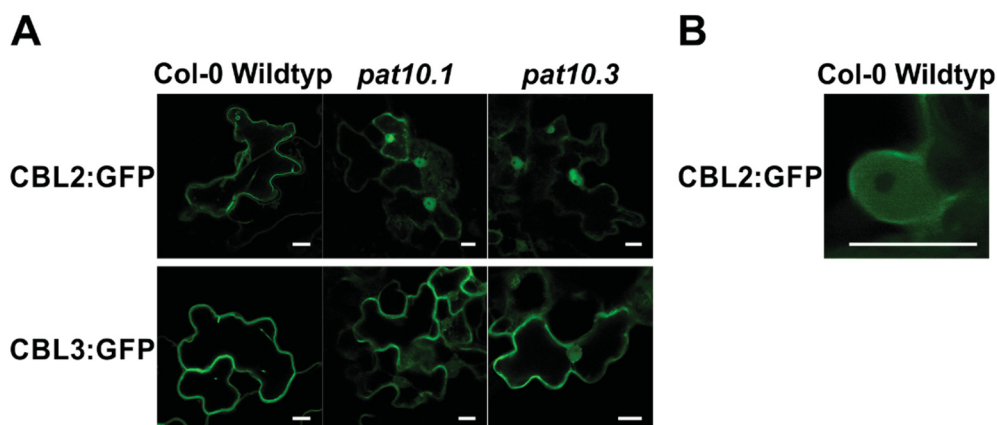


Abb. 27: CBL2 und CBL3 werden bei Überexpression in *Arabidopsis pat10* Pflanzen nicht an den Tonoplasten gebunden. CBL2:GFP und CBL3:GFP wurden transient in Epidermiszellen von *A. thaliana* Col-0 Wildtyp, *pat10.1* und *pat10.3* Pflanzen exprimiert. **A:** CBL2:GFP und CBL3:GFP wurden in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen S-acyliert und dadurch an den Tonoplasten gebunden. Ein Verlust der PAT10 in den *pat10.1* und *pat10.3* Pflanzen führte zur cytoplasmatischen Lokalisation von nicht-acyliertem CBL2 und CBL3. **B:** Die Protein Überexpression verursachte teilweise auch in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen eine cytoplasmatische Lokalisation von CBL2. Maßstab: 10 µm.

in Hefezellen ergaben jedoch, dass die beiden Calciumsensoren CBL2 und CBL3 durch mehrere PATs S-acyliert und dadurch im Tonoplasten verankert werden können. Aus diesem Grund wurden auch hier Lokalisationsstudien mit Pflanzen durchgeführt, die zwei verschiedene *pat10* T-DNA Allele enthalten und bereits von Qi et al. isoliert und charakterisiert wurden (*pat10.1*, SALK_024964 und *pat10.3*, SALK_018436 [Qi et al. 2013]). Eine der beiden von Zhou et al. beschriebenen *pat10* T-DNA Insertionslinien, ist mit der aus Qi et al. identisch (SALK_024964 [Zhou et al. 2013]). Die Expression der beiden Calciumsensoren CBL2 und CBL3 erfolgte transient in Wildtyp- und *pat10*-Keimlingen. Die Expression wurde durch einen Ubiquitin Promotor (pUBI10) und den Terminator eines Hitzeschock Proteins (HspT18.2) kontrolliert. Auch hier wurden beide Proteine C-terminal mit einem GFP Fluoreszenzprotein markiert, um die Lokalisation mikroskopisch analysieren zu können (CBL2:GFP und CBL3:GFP). Wie schon in Zhou et al. 2013 veröffentlicht, lokalisierten die beiden Proteine CBL2 und -3 in den *pat10.1* und *pat10.3* Pflanzenkeimlingen im Cyto- und Nukleoplasma der Pflanzenzellen (Abb. 27A). Im Gegensatz dazu wurden CBL2 und CBL3 durch die PAT10-vermittelte S-Acylierung in den Wildtyp-Pflanzen an den Tonoplasten gebunden. In einigen Zellen von Wildtyp-Pflanzen lag CBL2:GFP jedoch auch Cytoplasma-lokalisiert vor (Abb. 27B). Dies wurde ebenfalls bei der transienten Expression von CBL2 in *N. benthamiana* Epidermiszellen beobachtet, wenn CBL2 stark überexprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise konnten nicht alle CBL2:GFP Proteine aufgrund der starken Überexpression S-acyliert werden und nicht-acylierte Fusionsproteine lokalisierten im Cytoplasma. Daher wurde ein CBL2:GFP Konstrukt stabil in Wildtyp- und *pat10.3* Pflanzen eingebracht. In den entstandenen Linien unterlag die CBL2-Expression der Kontrolle des endogenen CBL2 Promotors (pCBL2), was vermutlich zu einer schwächeren Expression im Vergleich zur pUBI10-kontrollierten Expression führte. In der *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanze war die Fluoreszenz des pCBL2:CBL2:GFP Proteins als klar

pCBL2:CBL2:GFP

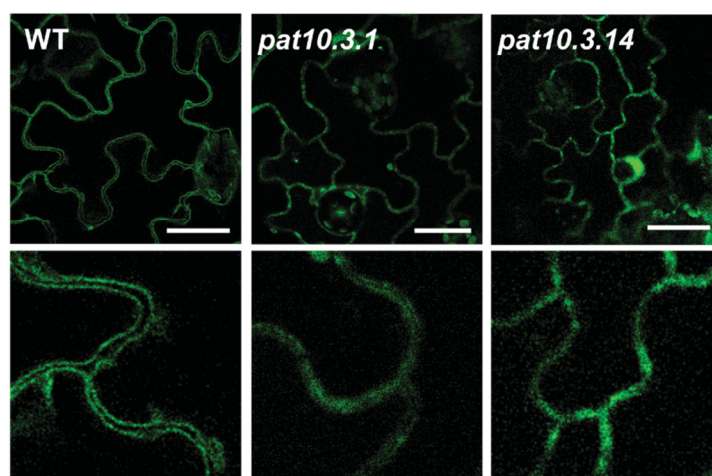


Abb. 28: Bei schwacher Expression durch den endogenen CBL2 Promotor wird CBL2 in *Arabidopsis pat10* Pflanzen nicht im Tonoplasten verankert. pCBL2:CBL2:GFP wurde dauerhaft im *Arabidopsis thaliana* Col-0 Wildtyp und in *pat10.3* Pflanzen exprimiert. Die CBL2-Expression unterlag hier der Kontrolle des endogenen CBL2 Promotors (pCBL2). Maßstab: 20 µm.

abgegrenzte Linie in den Zellen zu erkennen, welche als Vakuolenmembran identifiziert wurde (Abb. 28). Diese klare Linie wurde in den Zellen von zwei verschiedenen *pat10.3* Mutantenpflanzen nicht beobachtet. Hier lokalisierte CBL2 im Cytoplasma der *pat10.3* Epidermiszellen. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Fehlen von PAT10 tatsächlich zu einem nicht-acylierten CBL2 führte und der Calciumsensor somit nicht an den Tonoplasten gebunden werden konnte. Darüber hinaus deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die im BOP Assay identifizierten PATs die CBL2-S-Acylierung in *Arabidopsis* Epidermiszellen unter diesen Versuchsbedingungen bei einem PAT10 Funktionsverlust nicht vermitteln. Die Tonoplastbindung von CBL2 resultierte somit entweder aus der starken Expression der jeweiligen PATs im BOP Assay und kommt unter physiologischen Bedingungen in der *A. thaliana* Pflanze nicht zustande. Oder die anderen CBL2-S-acylierungsfähigen PATs waren in den epidermalen Zellen der *A. thaliana* Pflanzen nicht exprimiert und konnten CBL2 aus diesem Grund nicht S-acylieren.

4.3.3 CBL2 wird in Tabak Pollenschläuchen durch PAT02 und PAT10 an verschiedene Membranen gebunden

Die PATs 02, 04, 05,06 und 10 gingen aus zuvor beschriebenen Ergebnissen als CBL2-S-acylierungsfähige Enzyme hervor. Ob die S-Acylierung von CBL2 durch mehrere PATs in der Pflanze tatsächlich stattfindet, war bisher unklar. Die Ergebnisse der CBL2 Lokalisationsstudien in den *pat10* Funktionsverlustmutanten deuteten darauf hin, dass CBL2 in *A. thaliana* Epidermiszellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen selektiv durch PAT10 lipidmodifiziert wird. Es ist aber möglich, dass CBL2 in verschiedenen Geweben der Pflanze von den jeweiligen dort exprimierten PATs lipidmodifiziert wird. Das Gen der CBL2-S-acylierungsfähigen PAT02 wird beispielweise vor allem in *Arabidopsis* Pollen exprimiert (Batistič 2012). Auch PAT10 spielt beim Wachstum von *Arabidopsis* Pollenschläuchen eine entscheidende Rolle (Zhou et al. 2013). CBL2 wird ebenfalls in Pollen und Pollenschläuchen exprimiert und der Calciumsensor ist für die korrekte Morphologie der Vakuole in wachsenden Pollenschläuchen essentiell (Steinhorst et al. 2015). Somit stellte sich die Frage, ob möglicherweise PAT02 und PAT10 für die S-Acylierung von CBL2 in wachsenden Pollenschläuchen verantwortlich sein können. Zur Beantwortung dieser Frage wurden PAT02 und PAT10 zusammen mit CBL2 transient in *Nicotiana tabacum* Pollen koexprimiert. Die Expressionen von CBL2, PAT02 und PAT10 erfolgten unter der Kontrolle des Pollen-spezifischen Promotors des LAT52 Gens aus Tomate (Twell et al. 1991; Mähs et al. 2013). CBL2 wurde an den N-Terminus des Fluoreszenzproteins mCherry fusioniert, die beiden PATs 02 und 10 wurden N-Terminal an ein mVenus Fluoreszenzprotein gekoppelt. Ohne koexprimierte PAT lokalisierten die CBL2:mCherry Fusionsproteine zu einem großen Teil im Cytoplasma der Pollenschläuche (Abb. 29). Dies bestätigte noch einmal die bereits erwähnte Beobachtung einer cytoplasmatischen Verteilung von CBL2 bei starker Überexpression in Pflanzenzellen. Zusätzlich lokalisierte CBL2 in den Tabak Pollenschläuchen schwach an der Plasmamembran, was vor

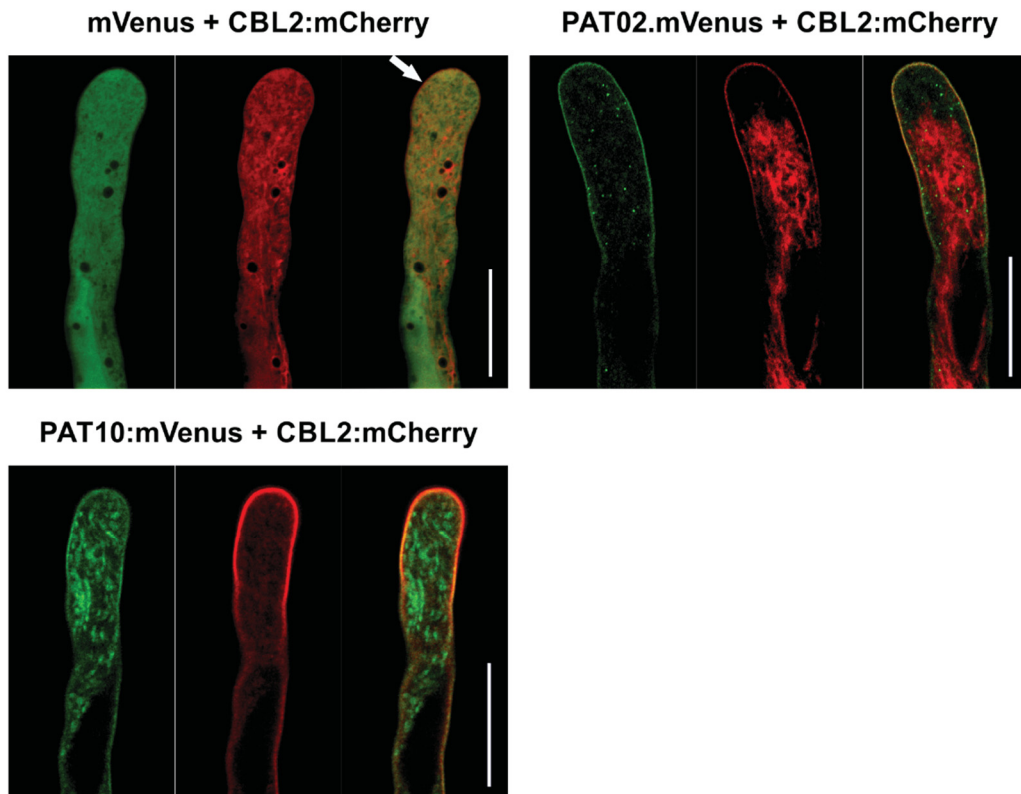


Abb. 29: PAT02 und PAT10 vermitteln eine Assoziation von CBL2 an verschiedene Membranen in Tabak Pollenschläuchen. CBL2:mCherry wurde mit dem mVenus Fluorophor, oder jeweils mit PAT2:mVenus oder PAT10:mVenus in Pollenschläuchen von *Nicotiana tabaccum* koexprimiert. Die Bilder wurden etwa 4 Stunden nach Transformation aufgenommen. Maßstab: 20 μ m.

allem in der überlagerten Abbildung (mVenus + CBL2:mCherry, siehe Pfeil) zu erkennen war. Die Plasmamembran-Lokalisation beschränkte sich jedoch auf die Spitze der Pollenschläuche. Zusätzlich assoziierte CBL2 mit dem Tonoplasten, welcher hier mehrere kleine Vakuolen umschloss. Diese diverse Lokalisation des überexprimierten CBL2 Proteins in Tabak Pollenschläuchen wurde bereits von Steinhorst et al. 2015 gezeigt. PAT02:mVenus lokalisierte in den Tabak Pollenschläuchen an der Plasmamembran und in Vesikeln. Dies ähnelte der Lokalisation von PAT02 in Tabak Epidermiszellen, wobei PAT02 in den epidermalen verstärkt Vesikel-gebunden vorlag und die Plasmamembranbindung nur bei sehr starker PAT02-Überexpression beobachtet wurde. Die PAT02 Plasmamembranbindung in den Pollenschläuchen deutete somit auf ein Überexpressionsartefakt hin. Im Gegensatz zur alleinigen CBL2:mCherry Expression, lokalisierte CBL2 bei der Koexpression mit PAT02 in den Tabak Pollenschläuchen kaum noch cytoplasmatisch, sondern kolokalisierte mit PAT02 an der Plasmamembran. Auffällig war zudem die verstärkte Lokalisation von CBL2 in filamentösen Strukturen. Solche Strukturen wurden bereits als röhrenförmige Vakuolen während der Biogenese dieses Kompartiments beschrieben (Hicks et al. 2004). Somit assoziierte CBL2 bei PAT02-Koexpression mit der Plasmamembran und mit dem Tonoplasten der Pollenschläuche. Diese Membranbindung wurde vermutlich durch eine PAT02-vermittelte S-Acylierung verursacht.

Somit zeigte PAT02 nicht nur im BOP Assay in Tabak Epidermiszellen, sondern darüber hinaus auch in Pollenschläuchen CBL2-S-Acylierungsaktivität.

In transgenen *A. thaliana* Pollenschläuchen assoziierte PAT10 mit dem Tonoplasten (Zhou et al. 2013). Im Gegensatz dazu lokalisierte PAT10 in *N. tabacum* Pollenschläuchen an der Plasmamembran und akkumulierte in Strukturen, bei denen es sich um den Golgi-Apparat handeln könnte. Eine Überexpression der *Arabidopsis* PAT10 in Tabak Pollenschläuchen führte also offensichtlich zu einer Fehllokalisierung des Enzyms. Genauere Aussagen über die mögliche Golgi-Lokalisation von PAT10 in Tabak Pollenschläuchen können zukünftig durch den Einsatz von Markerproteinen getroffen werden. Interessanterweise zeigte CBL2 bei Koexpression von PAT10 eine verstärkte Bindung an die Pollenschlauch-Plasmamembran und kolokalisierte dort mit PAT10. Die Bindung an die Plasmamembran beschränkte sich dabei nicht nur auf die Pollenschlauchspitze. Ungeachtet der Enzym Lokalisationen zeigten aber beide PATs S-Acylierungsaktivität gegenüber CBL2 in Pollenschläuchen und waren dadurch für die Bindung des Calciumsensors an verschiedene Membranen verantwortlich. Interessant war auch, dass PAT10 eine Assoziation mit nur einer Membran (Plasmamembran) verursachte, während PAT02 die Bindung von CBL2 an zwei Membranen (Plasmamembran und Tonoplast) vermittelte. Das könnte auf verschiedene Substrat-S-Acylierungsmechanismen der unterschiedlichen PATs hinweisen.

4.4 Ein Austausch der DHHC-CRD Domäne und des vollständigen C-Terminus´ von PAT10 und PAT11 führt zu fehllokalisierten und inaktiven Enzymen

Es ist bekannt, dass die allgemeine katalytische Aktivität der PATs über die DHHC-CRD Domäne vermittelt wird. Wie Substratspezifität bei der Protein-S-Acylierung durch PAT-Enzyme vermittelt wird, ist jedoch weitestgehend unerforscht. Es wird angenommen, dass die Substrat-spezifische S-Acylierung über die variablen N- und C-Termini der PATs vermittelt wird (González Montoro et al. 2011). Zur Untersuchung der CBL2-spezifischen S-Acylierung durch *Arabidopsis* PATs, wurden Struktur-Funktions-Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die beiden Enzyme PAT10 und PAT11 ausgewählt. Beide Enzyme sind am Tonoplasten lokalisiert, unterscheiden

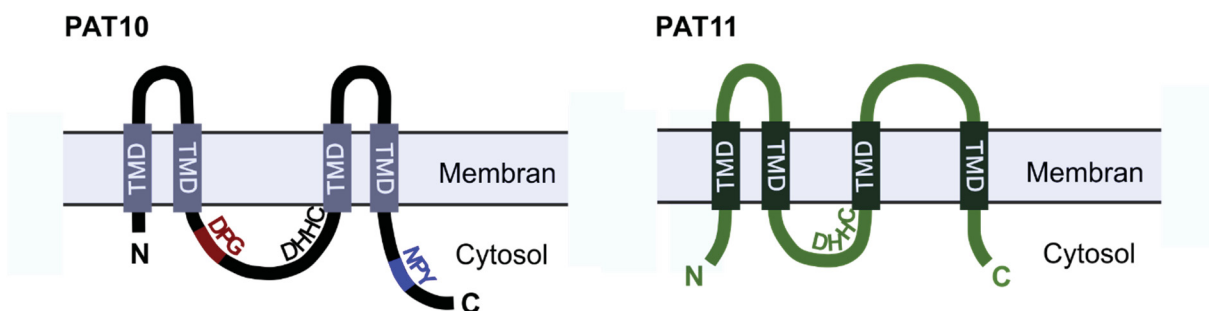


Abb. 30: Die Struktur von PAT10 und PAT11. Abgesehen von der generellen Struktur mit vier Transmembrandomänen (TMD) und der DHHC-CRD (hier DHHC) sind die beiden Tonoplast-lokalisierten PATs 10 und 11 sehr verschieden. PAT10 besitzt ein DPG Motiv kurz hinter der zweiten TMD und das NPY Motiv, verkürzt als GxxxN Motiv am C-Terminus. In PAT11 sind das DPG und NPY Motiv nicht vorhanden (verändert aus Batistič 2012).

sich jedoch hinsichtlich ihrer Substrat-S-Acylierung. So weist PAT10 CBL2-S-Acylierungsaktivität auf, während PAT11 den Calciumsensor nicht lipidmodifiziert. PAT10 und PAT11 sind unterschiedlich strukturiert. So unterscheiden sich die Positionen der vier potentiellen

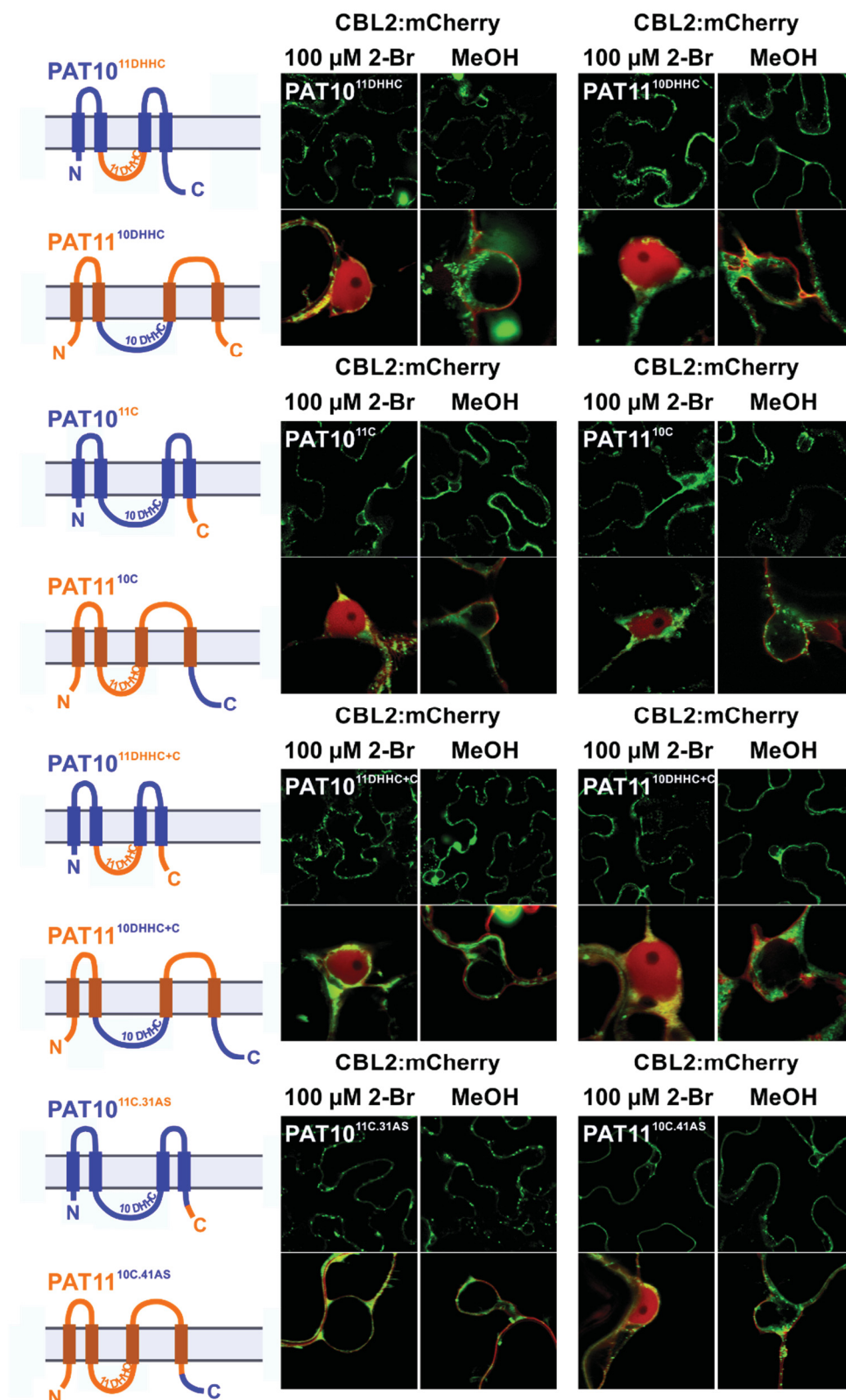


Abb. 31: Ergebnisse der Struktur-Funktions-Analysen mit PAT10/11 Chimären und CBL2. Links sind die Modelle der jeweiligen chimären Proteine gezeigt (PAT10: blau; PAT11: orange). Die PAT10/11 Chimäre (fusioniert mit GFP) wurden zusammen mit CBL2:mCherry in *N. benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und 2-Br oder MeOH vakuuminfiltriert.

Transmembrandomänen in PAT11 im Vergleich zu den TMD-Positionen in PAT10 (Abb. 30). Der cytosolische Bereich mit der DHHC-CRD in PAT10 ist mit 125 Aminosäuren fast doppelt so lang ist wie der von PAT11 (70 Aminosäuren). Die C-Termini der meisten PAT-Enzyme sind deutlich länger als die jeweiligen N-Termini. Diesbezüglich stellt PAT11 eine Ausnahme dar, da N- und C-Terminus von PAT11 etwa gleich lang sind. Zusätzlich fehlen in PAT11 das DPG Motiv und das NPY Motiv, die möglicherweise für die Aktivität von PAT10 essentiell sind (Batistič 2012). Für die Struktur-Funktions-Untersuchungen wurden verschiedene PAT10/11 Chimäre konstruiert. Dabei wurden einmal der C-Terminus oder die DHHC-CRD Domäne von PAT10, oder auch beide Domänen durch die jeweiligen Bereiche aus PAT11 substituiert und umgekehrt (siehe Modelle in Abb. 31). Im Anschluss wurden BOP Assays mit CBL2 durchgeführt, die eine Untersuchung der verschiedenen PAT10/11 Chimäre bezüglich ihrer S-Acylierungsaktivität gegenüber dem Calciumsensor ermöglichten.

PAT10 ist ein Golgi- und Tonoplast-lokalisiertes Enzym. PAT11 ist ebenfalls mit dem Tonoplasten assoziiert und lokalisiert zusätzlich an Vesikeln des prävakuolären Kompartiments (Batistič 2012). Die Substitutionen der verschiedenen Domänen in PAT10 und PAT11 führte in den meisten Fällen zu einer Fehllokalisierung der PAT10/11 Chimäre am ER oder Vesikeln (Abb. 31). Die beiden Proteine PAT10^{11C.31AS} und PAT11^{10C.41AS} stellten Ausnahmen dar. In PAT10^{11C.31AS} wurde der halbe PAT10 C-Terminus gegen den halben C-Terminus von PAT11 (bestehend aus den 31 Aminosäuren 315 - 345) ausgetauscht. Das daraus resultierende PAT10^{11C.31AS}:GFP Protein lokalisierte wie PAT10 am Tonoplasten und in Vesikeln, bei denen es sich wahrscheinlich um Golgi-Vesikel handelte. In PAT11^{10C.41AS} wurde das halbe C-terminale Ende des C-Terminus von PAT11 durch die entsprechende C-terminale Hälfte von PAT10 (bestehend aus den 41 Aminosäuren 300 - 340) substituiert. Das entstandene PAT11^{10C.41AS}:GFP wurde wie PAT11 am Tonoplasten und in kleinen Vesikeln beobachtet. Die Lokalisationen von PAT10 und 11 änderten sich somit durch den Austausch der C-terminalen Hälften nicht. Im PAT10 C-Terminus befindet sich das GxxxN Motiv, welches durch den Austausch der C-terminalen Hälften in PAT10^{11C.31AS} zerstört wurde. Dieses Motiv ist somit für die korrekte Lokalisation von PAT10 nicht notwendig. Die gleichzeitige Koexpression der ER- bzw. Vesikel-lokaliserten PAT10/11 Chimäre im BOP Assay führte zu einer cytoplasmatischen Lokalisation von CBL2:mCherry. Das deutete darauf hin, dass diese chimären Proteine CBL2 nicht S-acylieren konnten.

Zuvor durchgeführte BOP Assays zeigten, dass PAT10 *in planta* eine Tonoplastbindung von CBL2 verursachen kann, PAT11 jedoch nicht. Durch die Koexpression des chimären Tonoplast- und Golgi-lokaliserten PAT10^{11C.31AS}:GFP Proteins in Anwesenheit von 2-Br wurde CBL2:mCherry in der Vakuolenmembran verankert. CBL2:mCherry lokalisierte bei Koexpression des Tonoplast-lokaliserten Chimärs PAT11^{10C.41AS}:GFP und gleichzeitiger 2-Br Applikation im Cytoplasma der Tabakzellen. Die Tabelle 6 fasst die Lokalisationen der verschiedenen PAT10/11 Chimäre und ihre Fähigkeit eine Tonoplastbindung von CBL2 zu vermitteln, zusammen.

Tabelle 6: Subzelluläre Lokalisation und CBL2-Translokationsaktivität der PAT10/11 Chimäre im Vergleich zu PAT10 und PAT11. ↻: durch Koexpression des jeweiligen PAT Proteins wurde eine Tonoplastbindung von CBL2 vermittelt. **X**: das jeweilige PAT Protein verursachte keine Tonoplastbindung von CBL2.

Wildtyp-Protein		Subzelluläre Lokalisation	Tonoplastbindung von CBL2
PAT10		Tonoplast und Golgi-Vesikel	↻
PAT11		Tonoplast (Vesikel des prävakuolären Kompartiments)	X
Chimäres Protein	Beschreibung	Subzelluläre Lokalisation	Tonoplastbindung von CBL2
PAT10^{11DHHC}:GFP	PAT10 mit DHHC-CRD von PAT11	ER und Vesikel	X
PAT11^{10DHHC}:GFP	PAT11 mit DHHC-CRD von PAT10	ER und Vesikel	X
PAT10^{11C}:GFP	PAT10 mit C-Terminus von PAT11	ER und Vesikel	X
PAT11^{10C}:GFP	PAT11 mit C-Terminus von PAT10	ER und Vesikel	X
PAT10^{11DHHC+C}:GFP	PAT10 mit DHHC-CRD Domäne und C-Terminus von PAT11	ER	X
PAT11^{10DHHC+C}:GFP	PAT11 mit DHHC-CRD Domäne und C-Terminus von PAT10	ER	X
PAT10^{11C.31AS}:GFP	PAT10 mit C-terminaler Hälfte von PAT11	Tonoplast und Golgi-Vesikel	↻
PAT11^{10C.41AS}:GFP	PAT11 mit C-terminaler Hälfte von PAT10	Tonoplast (Vesikel des prävakuolären Kompartiments)	X

Diese Ergebnisse deuteten an, dass der Austausch der halben C-Termini die CBL2-S-Acylierungsaktivität der Proteine nicht beeinflusst hat. Das GxxxN Motiv im PAT10 C-Terminus ist somit auch für die CBL2-S-Acylierungsaktivität des Enzyms nicht notwendig. Ob die PAT10/11 Chimäre noch allgemein und Substrat-unspezifisch katalytisch aktiv waren, wurde hier nicht untersucht. Im Fall von katalytisch aktiven PAT10/11 Chimären, war die CBL2-spezifische S-Acylierungsaktivität durch Domänenaustausch von PAT10 auf PAT11, nicht übertragbar. Handelt es sich um katalytisch inaktive Chimäre, würde das darauf hindeuten, dass die DHHC-CRD Domäne und der C-Terminus im korrekten Sequenzkontext der jeweiligen PAT integriert sein müssen. Möglicherweise ist die Kooperation verschiedener Domänen der PAT-Enzyme für ihre korrekte Lokalisation und für ihre funktionale Aktivität entscheidend.

4.5 Die Cysteine 4 und 18 im CBL2 N-Terminus sind für die Bindung an den Tonoplasten essentiell

Die drei Cysteine an den Positionen 4, 12 und 18 im CBL2 N-Terminus sind nicht gleichermaßen für die Tonoplastbindung von CBL2 verantwortlich (Batistič et al. 2012). Das wurde bereits durch Substitution eines der drei Cysteine durch Serin festgestellt. Beim Austausch des ersten (Cys4) und dritten (Cys18) Cysteins lokalisierte CBL2 im Cytoplasma. Batistič et al. zeigten, dass eine Substitution des mittleren Cysteins (Cys12) zur Tonoplast- und Cytoplasma-Lokalisation des Proteins führt (Batistič et al. 2012). Dort wurde dem Protein bei einer Cystein- zu Serin-Substitution eine polare Hydroxygruppe (OH) durch das Serin hinzugefügt. Diese polare Hydroxygruppe beeinflusst möglicherweise den Transfer hydrophober Lipide auf die verbliebenen Cysteine während der S-Acylierung. Um solch einen Einfluss zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Aminosäuresubstitutionen in CBL2 durchgeführt, bei denen die drei Cysteine jeweils durch ein Alanin ausgetauscht wurden. Durch das Alanin wurde eine nicht-acylierbare, kleine und unpolare Aminosäure eingefügt, die den Lipidtransfer auf die verbliebenen Cysteine nicht oder nur schwach beeinflussen sollte. Die drei Proteine CBL2^{ACC}, CBL2^{CAC} und CBL2^{CCA} wurden C-terminal mit dem Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert und die subzelluläre Lokalisation in

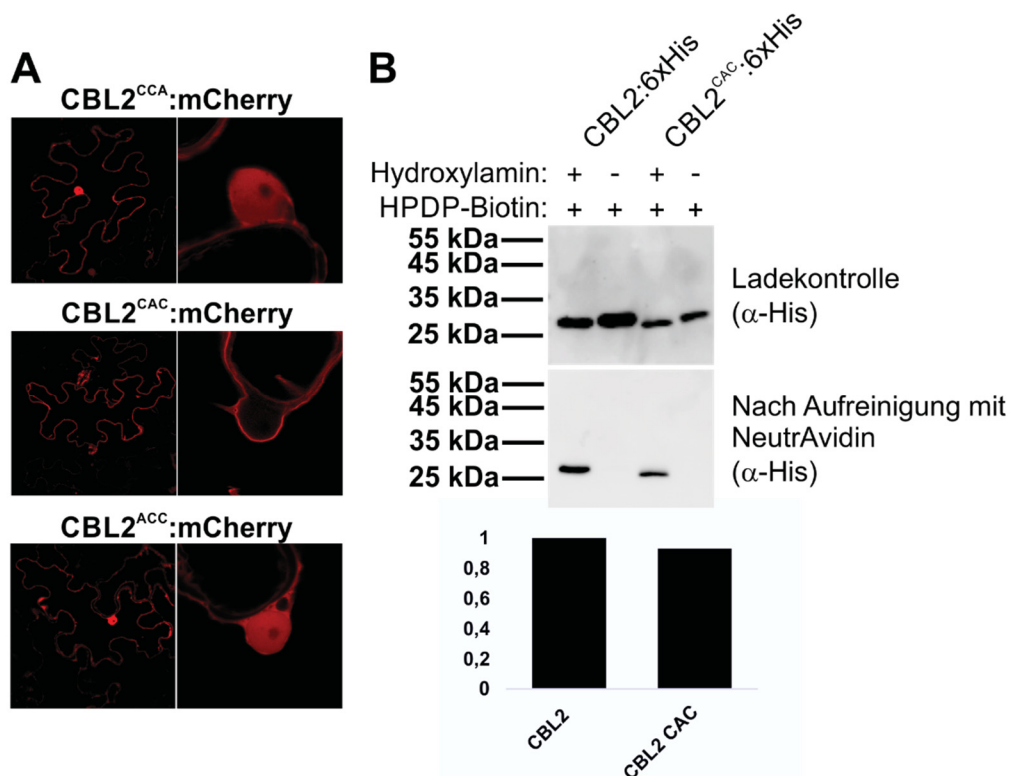


Abb. 32: Cys4 und Cys18 im CBL2 N-Terminus sind für eine Verankerung des Proteins in der Vakuolenmembran essentiell. **A:** Die subzelluläre Lokalisation der Proteine CBL2^{CCA}:mCherry (Cytoplasma), CBL2^{CAC}:mCherry (Tonoplast) und CBL2^{ACC}:mCherry (Cytoplasma) in *N. benthamiana* Epidermiszellen. **B:** Ergebnis der *Biotin Switch* Methode zur Untersuchung der S-Acylierung von CBL2^{CAC}:6xHis im Vergleich zu CBL2:6xHis. Zum besseren Vergleich der Proteinsignale wurde die Intensität der Banden in einem Diagramm dargestellt. Dabei wurde zuerst das Verhältnis vom jeweiligen Proteinsignal aus Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein ermittelt. Das Verhältnis von Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein der Probe CBL2:6xHis wurde dabei gleich 1 gesetzt.

epidermalen Zellen von *N. benthamiana* untersucht. CBL2^{ACC}:mCherry und CBL2^{CCA}:mCherry zeigten eine cytoplasmatische und nukleoplasmatische Lokalisation (Abb. 32A). CBL2^{CAC}:mCherry lag ausschließlich Tonoplast-assoziiert vor. Im Vergleich dazu lokalisierte CBL2^{CSC} cytoplasmatisch und am Tonoplasten (Batistič et al. 2012). Diese cytoplasmatische Lokalisation von CBL2^{CSC} deutete darauf hin, dass die Polarität des Serins den Lipidtransfer auf die übrigen zwei Cysteine von CBL2 beeinflusst hat. Bisher war unbekannt, ob das mittlere Cystein (Cys12) im CBL2 N-Terminus S-acyliert wird oder nicht. Um die S-Acylierung von CBL2 und CBL2^{CAC} biochemisch miteinander zu vergleichen, wurde die *Biotin Switch* Methode angewandt. Dabei wurden sowohl CBL2:6xHis als auch CBL2^{CAC}:6xHis mit Hilfe der NeutrAvidin Matrix aufgereinigt (Abb. 32B). Somit lagen beide Proteine biotinyliert vor, was in diesem Assay nur bei vorheriger S-Acylierung von CBL2 und CBL2^{CAC} möglich ist. Eine Quantifizierung der Proteinbanden ergab, dass das Verhältnis der Bandenintensitäten von Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein bei CBL2:6xHis und CBL2^{CAC}:6xHis jeweils gleich war. Das bedeutet, dass von beiden überexprimierten Fusionsproteinen CBL2:6xHis und CBL2^{CAC}:6xHis, ein jeweils gleich großer Anteil S-acyliert und damit im *Biotin Switch* Assay biotinyliert wurde. Das substituierte mittlere Cystein (Cys₁₂ zu Ala₁₂) hat die S-Acylierung der beiden äußeren Cysteine offenbar nicht beeinträchtigt. Bei diesem Versuch wurde eine im Vergleich zu CBL2 schwächere Proteinbandenintensität bei CBL2^{CAC} beobachtet. Fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigten, dass die Expression des CBL2^{CAC}:mCherry Fusionsproteins im Vergleich zu CBL2:mCherry, zu einer schwächeren Gesamtfluoreszenz in Tabakzellen führte. Es besteht somit die Möglichkeit, dass der zweite Cysteinrest im CBL2 N-Terminus für die Proteinestabilität wichtig ist.

Bei mutierten Cysteinresten an den Positionen 4 und 18 lokalisierte CBL2 cytoplasmatisch. Ob CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC} an keinem Cysteinrest S-acyliert werden oder die S-Acylierung von nur einem Cystein nicht für eine Assoziation mit dem Tonoplasten ausreicht, blieb zu diesem Zeitpunkt unbeantwortet.

Die Untersuchungen haben zusammenfassend ergeben, dass CBL2 S-acyliert wird und in der Vakuolenmembran verankert werden kann, wenn der mittlere Cysteinrest (Cys12) mutiert vorlag. Das Cystein an Position 12 war somit unter diesen Versuchsbedingungen für die S-Acylierung und die Verankerung von CBL2 in der Vakuolenmembran nicht essentiell. Die Membranbindung wurde somit über eine S-Acylierung des ersten und dritten Cysteins vermittelt.

4.6 Die PATs 02, 04, 05, 06 und 10 zeigen Unterschiede in ihrer Substraterkennung

Zwei der drei Cysteinreste (Cys4 und 18) sind für die Tonoplastbindung des CBL2 Proteins essentiell. Ob PAT10 und die anderen CBL2-translokationsfähigen PATs 02, 04, 05 und 06 die gleichen Cysteine im CBL2 N-Terminus S-acylieren, war noch ungeklärt. Um das zu untersuchen wurde zunächst die CBL2^{CAC}-S-Acylierungsaktivität dieser Enzyme überprüft. Dazu wurden weitere BOP Assays durchgeführt, in denen CBL2^{CAC} jeweils mit den PATs 02, 04, 05, 06, 10 und

11 koexprimiert wurde. Zusätzlich wurde $CBL2^{CAC}:yeGFP$ zusammen mit den PATs 02, 04, 05, 06 und 10 in Hefezellen koexprimiert, um die $CBL2^{CAC}$ -S-Acylierungsaktivität dieser Enzyme ohne den Einsatz von 2-Br zu untersuchen.

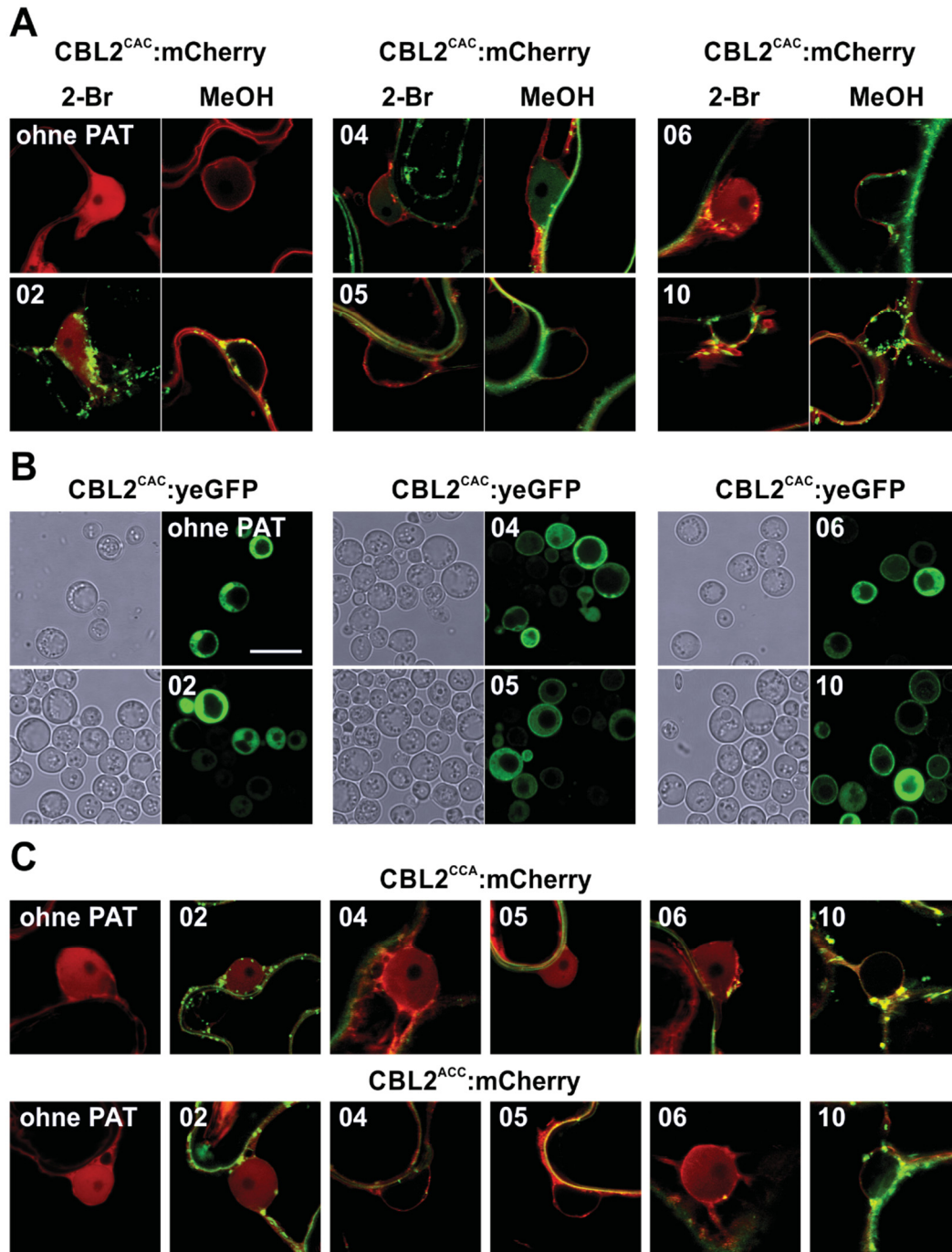


Abb. 33: Im Gegensatz zu den PATs 02, 04, 05 und 06 kann PAT10 eine $CBL2$ -Membranbindung vermitteln, wenn je eins der drei Cysteine im Calciumsensor substituiert ist. **A: Ergebnisse der BOP Assays mit $CBL2^{CAC}:mCherry$ und den PATs 02, 04, 05, 06 und 10 in *N. benthamiana*. **B:** Ergebnisse der Koexpressionen von PAT02, 04, 05, 06 und 10 zusammen mit $CBL2^{CAC}:yeGFP$ in Hefezellen. **C:** Ergebnisse der transienten Koexpressionen der PATs 02, 04, 05, 06 und 10 zusammen mit $CBL2^{CCA}:mCherry$ und $CBL2^{ACC}:mCherry$ in *N. benthamiana* Epidermiszellen. Da die Tonoplast- oder Cytoplasma-Lokalisation am besten am Nukleus der Pflanzenzellen unterschieden werden können, ist hier ausschließlich dieser Bereich der Zellen gezeigt.**

Im induzierbaren BOP Assay verursachten die fünf PATs 02, 04, 05, 06 und 10 bei 2-Br Applikation eine Tonoplastbindung von CBL2. CBL2^{CAC} wurde im BOP Assay bei 2-Br Zugabe durch drei dieser fünf PATs (PAT04, 05 und 10) in der Vakuolenmembran verankert (Abb. 33A). Bei Koexpression der beiden PATs 02 und 06 und 2-Br Applikation lokalisierte CBL2^{CAC} im Cytoplasma. In Hefezellen führten die Koexpressionen aller hier aufgelisteten PATs zur Membranbindung des Wildtyp-Proteins CBL2. Im Vergleich dazu wurde CBL2^{CAC}:yeGFP durch die Koexpression der PATs 04, 05, 06 und 10 in Hefezellmembranen verankert (Abb. 33B). Hier war PAT02 das einzige der getesteten Enzyme, welches keine Membranbindung von CBL2^{CAC} in der Hefe ermöglichte. Somit waren nicht mehr alle der CBL2-translozierenden PATs fähig, eine Membranbindung des Calciumsensors zu vermitteln, in dem das mittlere Cystein mutiert war. Die Anzahl und Position der Cysteine im Substratprotein hat also offenbar einen Einfluss auf die Erkennung durch verschiedene PAT-Enzyme.

Welche PATs eine Membranbindung von CBL2^{CAC} *in planta* oder in Hefezellen vermitteln konnten, ist in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht der CBL2- und CBL2^{CAC}-translozierenden PATs aus den BOP Assays und aus den Koexpressionen in Hefezellen. ↻: durch Koexpression des jeweiligen PAT Proteins wurde eine Tonoplastbindung von CBL2 oder CBL2^{CAC} vermittelt. X: das jeweilige PAT Protein verursachte keine Tonoplastbindung von CBL2 oder CBL2^{CAC}.

	Tonoplast- bindung von CBL2 im BOP/iBOP Assay	Tonoplast- bindung von CBL2 ^{CAC} im BOP Assay	Membran- bindung von CBL2 in Hefezellen	Membran- bindung von CBL2 ^{CAC} in Hefezellen
PAT02	↻	X	↻	X
PAT04	↻	↻	↻	↻
PAT05	↻	↻	↻	↻
PAT06	↻	X	↻	↻
PAT10	↻	↻	↻	↻

Um weitere Einsichten in die Substraterkennung der PATs zu erlangen, wurden die Fusionsproteine CBL2^{CCA}:mCherry und CBL2^{ACC}:mCherry mit den PATs 02, 04, 05, 06 und 10 in Tabak Epidermiszellen koexprimiert. Da die Proteine CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC} in den Pflanzenzellen cytoplasmatisch und nicht am Tonoplast lokalisierten, musste hier kein 2-Br eingesetzt werden. Die Koexpressionen von CBL2^{CCA} mit den PATs ergaben, dass PAT10 als einziges der fünf getesteten PAT-Enzyme eine Tonoplastbindung von CBL2^{CCA} vermitteln konnte (Abb. 33C). Das Protein CBL2^{ACC} wurde durch drei der fünf koexprimierten PATs (PAT04, 05 oder 10) an die Vakuolenmembran gebunden. Diese Untersuchungen ergaben, dass die PATs 02 und 06 *in planta* nur bei Vorhandensein aller drei N-terminalen Cysteine von CBL2 eine Tonoplastbindung des Calciumsensors vermitteln konnten. Für PAT04 und 05 war das dritte Cystein im CBL2 N-Terminus für die Bindung des Proteins an die Vakuolenmembran besonders wichtig. Darüber

hinaus fiel PAT10 bei diesen Analysen auf, da dieses Enzym die Assoziation aller drei Proteine CBL2^{CAC}, CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC} mit dem Tonoplasten ermöglichte. Welche PATs eine Membranbindung von CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC} vermitteln konnten, zeigt die Tabelle 8.

Tabelle 8: Vergleich der Translokationsaktivität verschiedener PATs gegenüber CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC} *in planta*. ↻: durch Koexpression des jeweiligen PAT Proteins wurde eine Tonoplastbindung von CBL2^{CCA} oder CBL2^{ACC} vermittelt. X: das jeweilige PAT Protein verursachte keine Tonoplastbindung von CBL2^{CCA} oder CBL2^{ACC}.

	Tonoplastbindung von CBL2 ^{CCA}	Tonoplastbindung von CBL2 ^{ACC}
PAT02	X	X
PAT04	X	↻
PAT05	X	↻
PAT06	X	X
PAT10	↻	↻

Welche Cysteinreste in CBL2 jeweils durch die überexprimierten PATs 02, 04, 05, 06 und 10 S-acyliert wurden, war unbekannt. Die hier gezeigten Ergebnisse könnten aber ein Hinweis darauf sein, dass unterschiedliche PAT-Enzyme verschieden viele Cysteinreste für ihre Substraterkennung benötigen. So mussten in CBL2 alle drei Cysteinreste vorhanden sein, damit die überexprimierte PAT02 eine Tonoplastbindung des Calciumsensors vermitteln konnte. Für PAT10 waren jedoch zwei Cysteine im CBL2 N-Terminus ausreichend, um eine Assoziation von CBL2 mit der Vakuolenmembran zu vermitteln.

4.7 Die potentielle amphipathische Helix im CBL2 N-Terminus ist für die Tonoplastbindung essentiell

Der Calciumsensor CBL2 stellt ein unkonventionelles S-Acylierungssubstrat dar, da das Protein keine Transmembrandomänen besitzt und auch zusätzlich zu den S-acylierbaren Cysteinen keine weiteren Lipidmodifikationsmotive aufweist. *In silico* Analysen mit den Vorhersageprogrammen „AmphipaSeek“ und „HELIQUEST“ ergaben, dass der N-Terminus des CBL2 Proteins potentiell eine amphipathische Helix (AH) bilden kann (Abb. 34 [O. Batistič, unveröffentlichte Daten]). In dieser AH liegen die drei Cysteine auf der hydrophoben Seite, gegenüber der polaren Seite. Um einen möglichen Einfluss der AH auf die S-Acylierung und die Lokalisation von CBL2 zu untersuchen, wurde eine Lokalisationsstudie mit einem CBL2 Protein mit mutierter AH durchgeführt. Die amphipathische Struktur im CBL2 N-Terminus wurde durch Einfügen

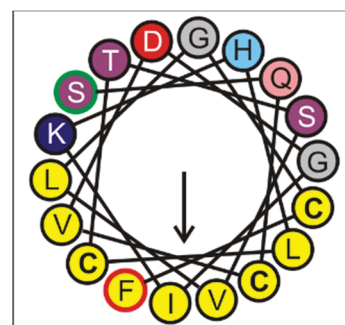


Abb. 34: Modell der potentiellen amphipathischen Helix im CBL2 N-Terminus. Die hydrophobe Seite ist durch die gelbe Aminosäure gekennzeichnet. Hier liegen die drei S-acylierbaren Cysteinreste. Gegenüberliegend befindet sich die polare Seite. Die erste Aminosäure der Helix ist grün eingekreist, die letzte Aminosäure ist rot eingekreist (O. Batistič, unveröffentlichte Daten).

der Aminosäure Prolin auf der polaren Seite zerstört (CBL2^{T13P}). Da es sich bei Prolin um eine Aminosäure handelt, die keine freie Aminogruppe (NH₂) besitzt, wird die stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung der α -Helix unterbrochen (Chakrabarti und Chakrabarti 1998). Frühere Untersuchungen zeigten, dass das Fusionsprotein CBL2^{T13P}:mCherry im Gegensatz zu CBL2:mCherry nicht mehr am Tonoplasten, sondern im Cytoplasma der Pflanzenzellen lokalisierte (O. Batistič, unveröffentlichte Daten, Abb. 35A).

CBL2^{T13P} besitzt zwar keine intakte AH, aber noch alle drei möglichen S-Acylierungsstellen. Da nicht bekannt war, ob das cytoplasmatisch lokalisierte CBL2^{T13P} an den noch vorhandenen Cysteinen lipidmodifiziert werden kann, wurde die S-Acylierung dieses Proteins biochemisch untersucht. CBL2^{T13P} wurde dazu C-terminal mit einem sechsfachen Histidin-Peptid fusioniert (CBL2^{T13P}:6xHis) und die S-Acylierung im Vergleich zu CBL2:6xHis mit Hilfe der *Biotin Switch* Methode untersucht. Überraschenderweise konnte CBL2^{T13P}:6xHis im Anschluss an die *Biotin Switch* Methode mit der NeutrAvidin Matrix aufgereinigt werden und lag dementsprechend in der Pflanzenzelle S-acyliert vor (Abb. 35B). Eine Quantifizierung der Proteinbanden ergab, dass ungefähr gleich viel biotinyliertes CBL2:6xHis und CBL2^{T13P}:6xHis Protein aufgereinigt wurde. Das ist ein Hinweis darauf, dass der Anteil an S-acyliertem Protein der überexprimierten CBL2:6xHis und CBL2^{T13P}:6xHis Fusionsproteine gleich groß war. CBL2^{T13P} assoziierte zwar

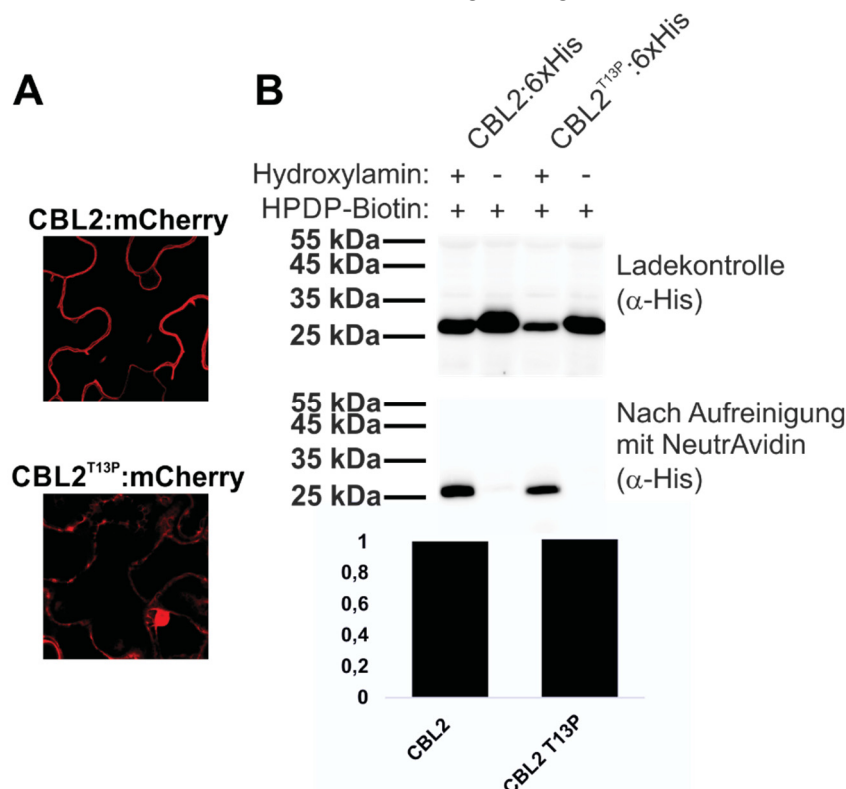


Abb. 35: Eine zerstörte amphipatische Helix verhindert eine Tonoplastbindung von CBL2, jedoch nicht die S-Acylierung des Proteins. (A) Die subzelluläre Lokalisation von CBL2:mCherry und CBL2^{T13P}:mCherry in *N. benthamiana* Epidermiszellen. (B) Untersuchung der S-Acylierung von CBL2:6xHis und CBL2^{T13P}:6xHis mittels *Biotin Switch* Methode. Zum besseren Vergleich der Proteinsignale wurde die Intensität der Banden in einem Diagramm dargestellt. Dabei wurde zuerst das Verhältnis vom jeweiligen Proteinsignal aus Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein ermittelt. Das Verhältnis von Ladekontrolle zu aufgereinigtem Protein der Probe CBL2:6xHis + MeOH wurde dabei gleich 1 gesetzt.

nicht am Tonoplasten, wurde aber S-acyliert. Die AH ist somit keine Voraussetzung für eine S-Acylierung der Cysteine. Die Daten deuteten allerdings darauf hin, dass die AH in Kombination mit der S-Acylierung eine Bindung des Proteins an die Vakuolenmembran vermittelt und eine alleinige S-Acylierung dafür nicht hinreichend ist.

Im Anschluss wurde untersucht, ob die zerstörte AH die Tonoplastbindung vollständig verhindert oder eine Tonoplastassoziation des Proteins trotz zerstörter AH möglich ist. Dazu wurde das Fusionsprotein CBL2^{T13P}:mCherry mit den PATs 02, 04, 05, 06 und 10 in *N. benthamiana* koexprimiert. Die Applikation von 2-Br war hier nicht notwendig, da CBL2^{T13P}:mCherry cytoplasmatisch lokalisierte. Um eine mögliche Tonoplastbindung von CBL2^{T13P}:mCherry auf die Aktivität der überexprimierten *Arabidopsis* PATs zurückführen zu können, wurde zuerst CBL2^{T13P}:mCherry allein exprimiert und dann die PAT-Expression induziert. CBL2^{T13P}:mCherry war ohne PAT-Koexpression cytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 36A). Die durch β -Estradiol induzierte Expression der PATs 02, 04, 05, 06 und 10 führte zu einer Assoziation von CBL2^{T13P}:mCherry mit dem Tonoplasten. Durch ein Überangebot dieser CBL2-S-acylierungsfähigen Enzyme wurde die Wahrscheinlichkeit eines Lipidtransfers auf CBL2^{T13P} vermutlich erhöht und das Protein konnte im Tonoplasten verankert werden. Um mögliche

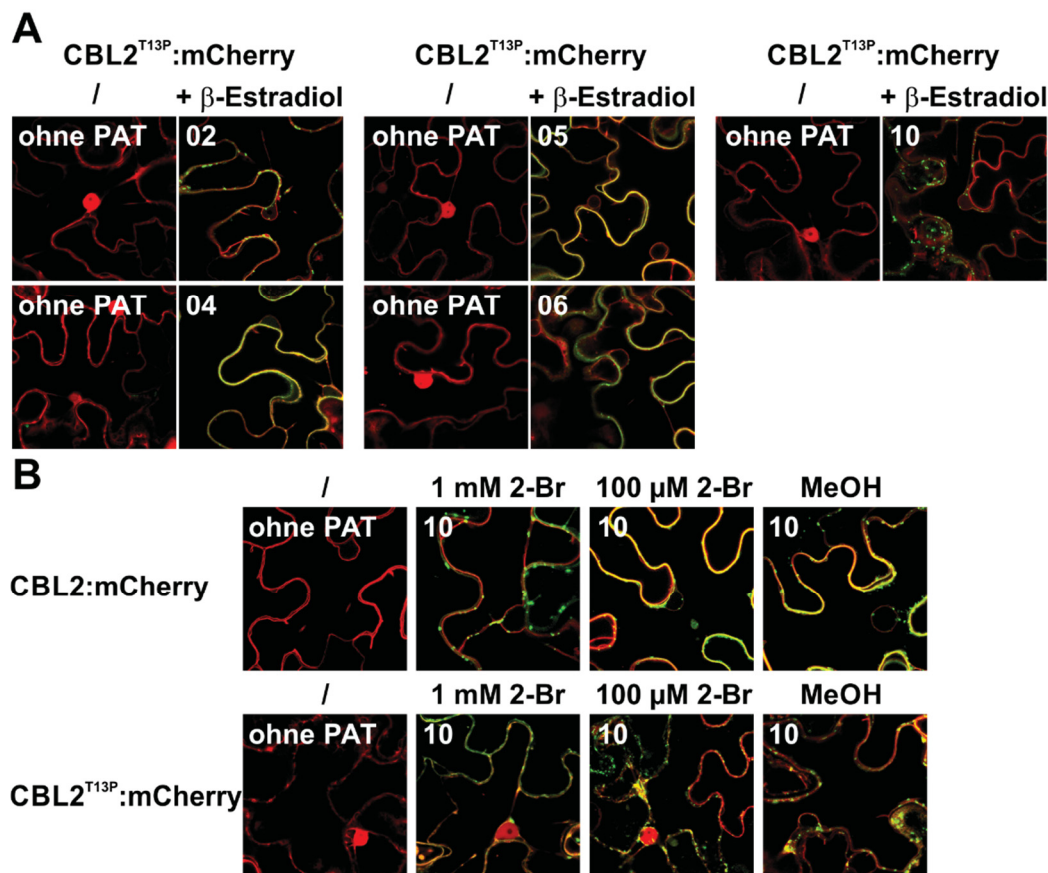


Abb. 36: Durch die Koexpression der PATs 02, 04, 05, 06 und 10 kann CBL2 trotz zerstörter amphipathischer Helix (AH) im Tonoplasten verankert werden. **A:** CBL2^{T13P}:mCherry wurde in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und anschließend die Expression der PATs 02, 04, 05, 06 und 10 durch Zugabe von β -Estradiol induziert. **B:** CBL2:mCherry oder CBL2^{T13P}:mCherry wurden mit PAT10 koexprimiert und zwei verschiedene 2-Br-Konzentrationen bzw. MeOH vakuuminfiltriert.

Unterschiede in der Stärke der PAT10-vermittelten S-Acylierung von CBL2 und CBL2^{T13P} zu untersuchen, wurde PAT10 erneut mit CBL2 und CBL2^{T13P} koexprimiert und der Inhibitor 2-Br eingesetzt. Durch den Inhibitor sollte die S-Acylierungsaktivität des PAT10 Enzyms reduziert werden. Bei 100 µM und 1 mM 2-Br assoziierte das CBL2 Wildtyp-Protein durch die koexprimierte PAT10 mit der Vakuolenmembran (Abb. 36B). Im Gegensatz dazu lokalisierte CBL2^{T13P} trotz PAT10-Koexpression in Anwesenheit des Inhibitors im Cytoplasma der Tabakzellen. Dieses Ergebnis zeigte, dass die S-Acylierungsaktivität von PAT10 durch den Einsatz von 2-Br reduziert werden konnte. Diese inhibierende Wirkung des 2-Br auf die überexprimierte PAT10 hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Tonoplastbindung des CBL2 Wildtyp-Proteins im BOP Assay. Bei zerstörter AH im CBL2 N-Terminus wurde die PAT10-vermittelte S-Acylierung des CBL2^{T13P} Proteins durch 2-Br jedoch sichtbar negativ beeinflusst. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Bildung der AH im CBL2 N-Terminus die Wahrscheinlichkeit eines Lipidtransfers durch das PAT10 Enzym erhöht.

4.8 CBL6 ist ein S-Acylierungssubstrat für ein großes Spektrum an PAT-Enzymen

CBL2, CBL3 und CBL6 besitzen je drei Cysteinreste in ihren N-Termini. Während die Cysteine in CBL2 und CBL3 identisch positioniert sind, weist CBL6 eine leicht veränderte Anordnung der Cysteine auf. Die beiden für die Tonoplastbindung essentiellen äußeren Cysteine in CBL2 (Cys4 und 18), befinden sich an identischer Position in CBL6 (Cys5 und 19 [Abb. 37]). Der mittlere Cysteinrest im CBL2 N-Terminus, der hier als nicht essentiell für die Tonoplastbindung identifiziert wurde, ist im CBL6 N-Terminus nicht vorhanden. CBL6 weist an den Positionen 19 und 20 zwei benachbarte Cysteinreste auf.

	-	M	L	Q	C	L	E	G	F	K	H	L	C	A	S	L	L	K	C	C	D	L	D	L	Y	K	Q	P	G	G	L		
CBL2	-	M	S	Q	C	V	D	G	I	K	H	L	C	T	S	V	L	G	C	F	D	L	D	L	Y	K	Q	S	G	G	L	30	
CBL3	-	M	S	Q	C	I	D	G	F	K	H	V	C	S	S	F	F	R	C	F	D	I	D	I	Y	K	Q	S	G	G	L	30	
CBL6		M	M	M	Q	C	L	D	G	L	K	H	L	A	L	I	L	L	T	C	C	D	A	D	P	P	K	V	R	Q	N	P	31

Abb. 37: Die Tonoplast-lokalisierten CBL2, 3 und 6 besitzen in ihren N-Termini jeweils drei Cysteine mit unterschiedlichen Positionen. CBL2 und 3 zeigen identisch positionierte Cysteine an Position 4, 12 und 18. Die beiden äußeren Cysteine aus CBL2 und 3 sind auch in CBL6 konserviert. Jedoch besitzt der CBL6 N-Terminus zwei benachbarte Cysteine an den Positionen 19 und 20 (aus Batistič et al. 2012).

In einem BOP Assay sollte untersucht werden, ob die Tonoplastbindung von CBL6 aufgrund dieser veränderten Cysteinanordnung im Vergleich zu CBL2 und CBL3 durch andere PATs vermittelt wird. Dazu wurde CBL6 zunächst an den N-Terminus eines mCherry Fluoreszenzproteins gekoppelt. Anschließend wurde das CBL6:mCherry Fusionsprotein in epidermalen Zellen von *N. benthamiana* exprimiert und die Lokalisation von CBL6 bei Zugabe verschiedener 2-Br-Konzentrationen untersucht. CBL6:mCherry assoziierte bei nicht-inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie (MeOH) mit der Vakuolenmembran (Abb. 38A). Ab

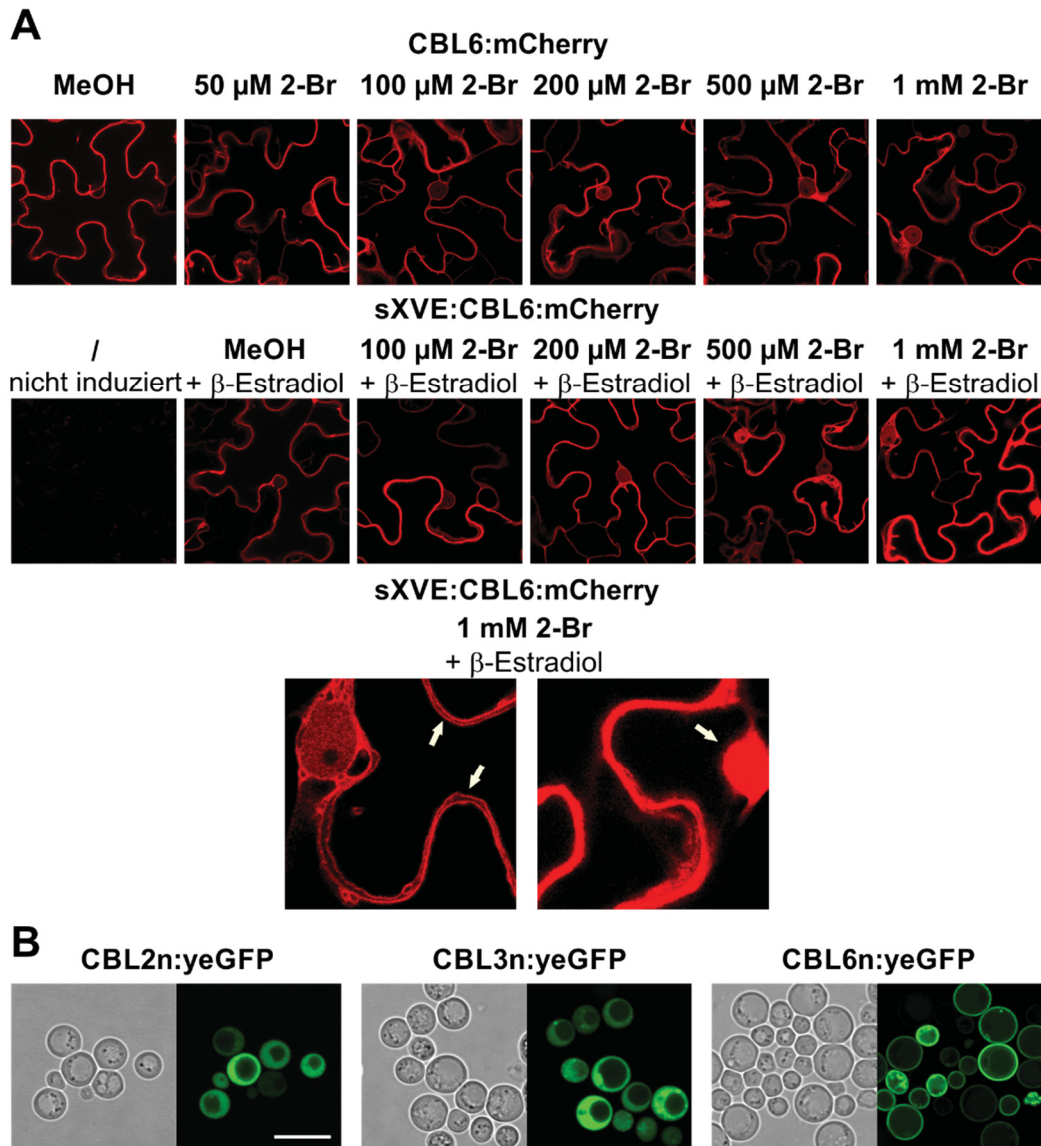


Abb. 38: CBL6 wird im Vergleich zu CBL2 und CBL3 effizienter in der Vakuolenmembran verankert.
A: Untersuchung der CBL6:mCherry Lokalisation bei gleichzeitiger Applikation verschiedener Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br (oben). Darunter sind die Aufnahmen der CBL6-Lokalisationsstudie gezeigt, bei der zuerst die endogene Tabak S-Acylierungsmaschinerie durch 2-Br inhibiert wurde und daraufhin die CBL6:mCherry Expression durch Zugabe von β -Estradiol induziert wurde. Die Tonoplastbindung von CBL6:mCherry wurde nur in Zellen beobachtet, die eine schwächere CBL6:mCherry Expression zeigten (siehe Pfeile in den Vergrößerungen). **B:** Lokalisationen der CBL2, CBL3 und CBL6 N-Termini in Wildtyp-Hefezellen. Maßstab: 10 μ m.

50 μ M und bis zu 1 mM 2-Br lokalisierten die CBL6:mCherry Fusionsproteine im Cytoplasma und am Tonoplasten. Die Tonoplastbindung von CBL6 wurde also durch die Zugabe von 2-Br nicht vollständig verhindert. Möglicherweise muss vor der CBL6-Expression zuerst die endogene Tabak S-Acylierungsmaschinerie inhibiert werden, um eine vollständige cytoplasmatische Lokalisation von CBL6 zu erreichen. Dazu wurde das induzierbare Expressionssystem angewendet. Die CDS von CBL6 wurde in das SUPERR:sXVE:mCherry_c Plasmid eingebracht, welches eine durch β -Estradiol induzierte Proteinexpression ermöglicht (Schlücking et al. 2013). Auch die induzierte CBL6-Expression nach Vakuuminfiltration von 2-Br resultierte in Cytoplasma-

und Tonoplast-lokalisierten Fusionsproteinen. Auffallend war, dass die Tonoplastassoziation von CBL6:mCherry nur in Zellen mit schwacher Fluoreszenz zu erkennen war (siehe Pfeile in der linken Vergrößerung). Der Calciumsensor lokalisierte scheinbar ausschließlich cytoplasmatisch, wenn die Fluoreszenz und damit die Menge an überexprimiertem Protein in der jeweiligen Pflanzenzelle besonders stark war (siehe Pfeile in der rechten Vergrößerung). Vermutlich wurde CBL6 bei schwacher Expression durch nicht vollständig inhibierte endogene Tabak PATs S-acyliert und an den Tonoplasten gebunden. Bei sehr starker Überexpression und in Anwesenheit von 2-Br reichte die Aktivität der endogenen Tabak PATs jedoch nicht für eine effektive CBL6-S-

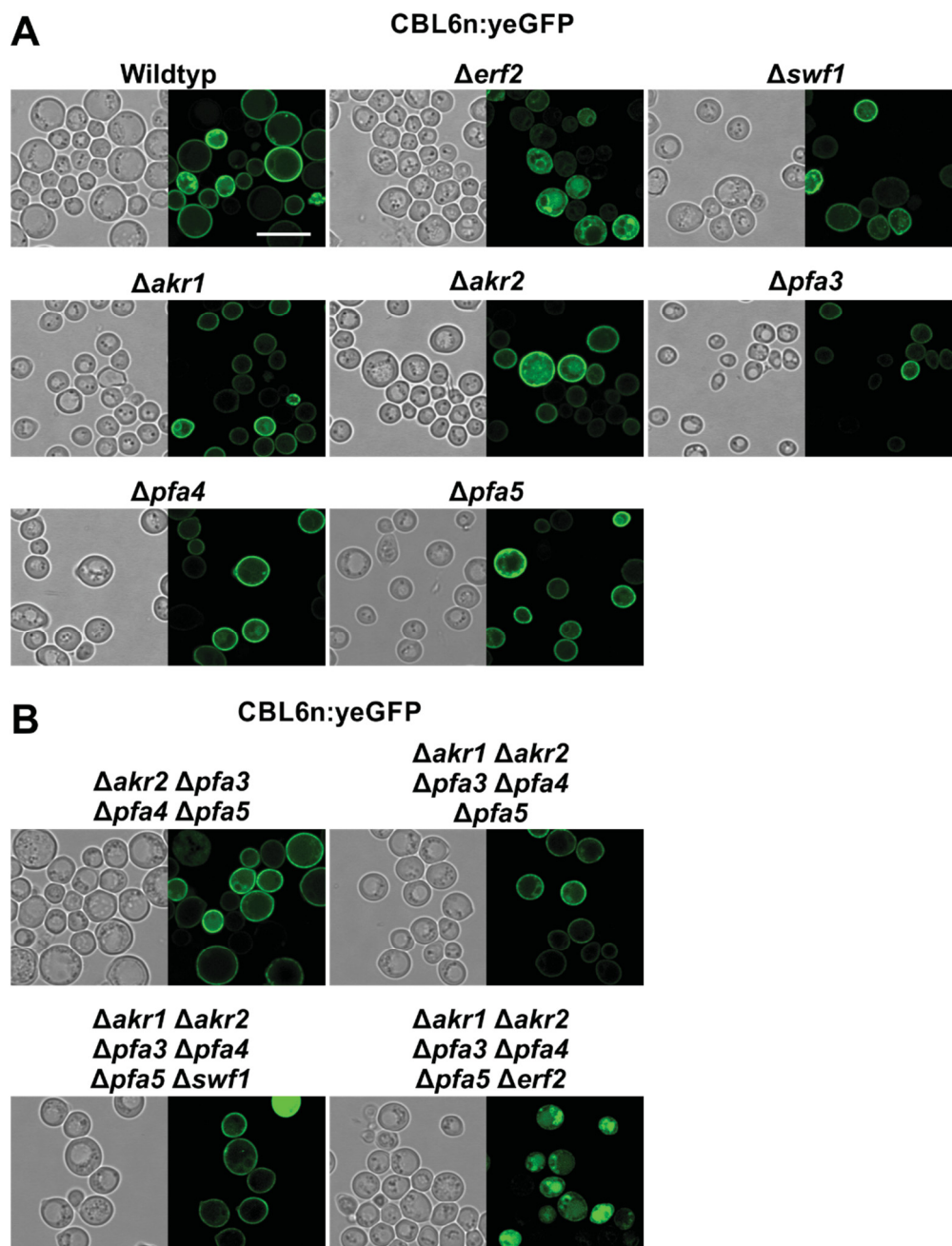


Abb. 39: Der CBL6 N-Terminus wird durch endogene Hefe PATs erkannt. A: Lokalisation von CBL6n:yeGFP in Wildtyp-Hefe und den sieben verschiedenen Hefe *pat* Einzelmutanten. **B:** Lokalisation von CBL6n:yeGFP in einer Hefe *pat* Vierfachmutante, einer Hefe *pat* Fünffachmutante und zwei verschiedenen Hefe *pat* Sechsfachmutanten. Maßstab: 10 µm.

Acylierung aus, wodurch das stark überexprimierte CBL6:mCherry im Cytosol lokalisierte. CBL6 kam als Substratprotein für einen BOP Assay *in planta* somit nur bedingt in Frage, da die Lokalisationsänderung im S-acylierten und nicht-acylierten Zustand kaum unterschieden werden konnten.

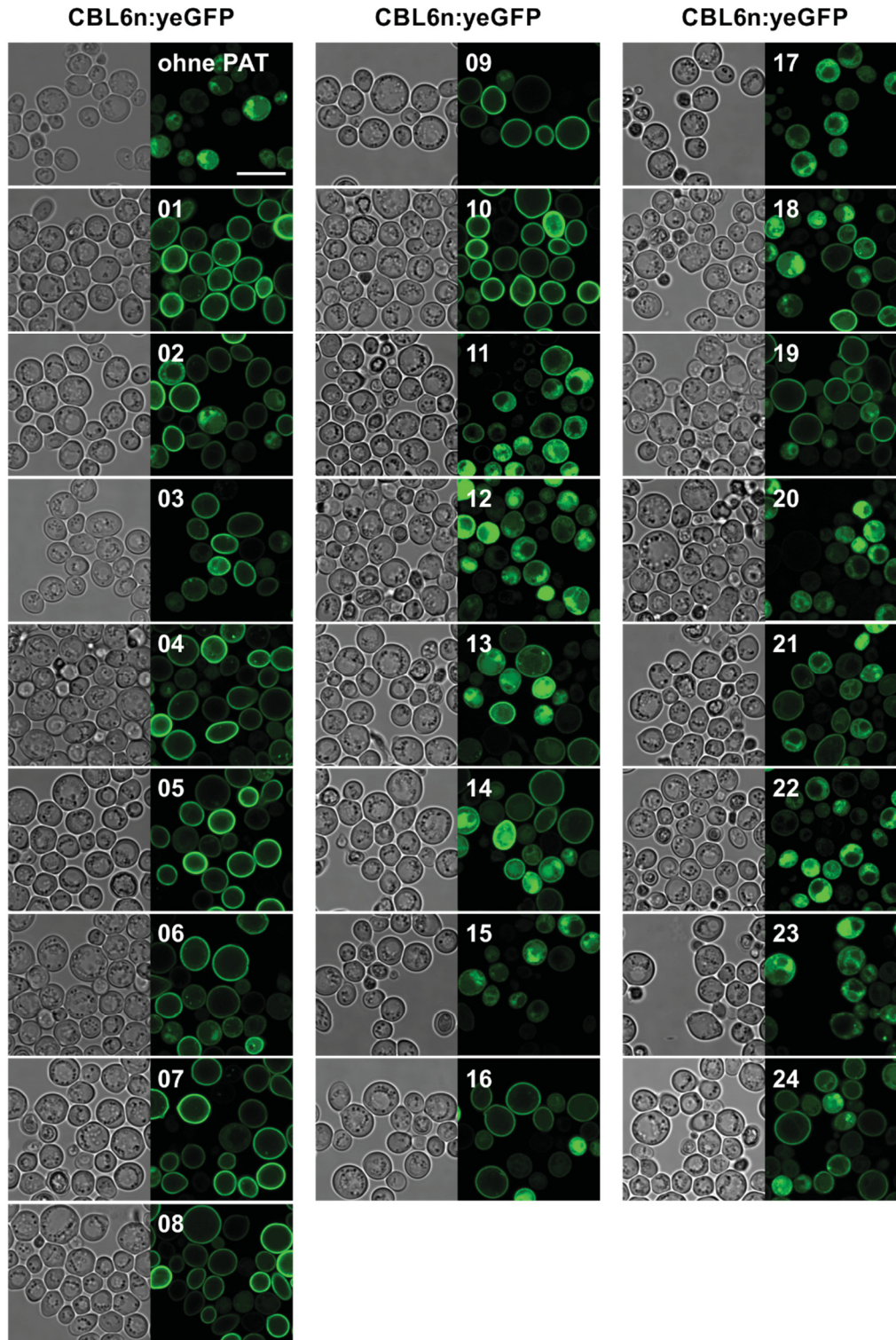


Abb. 40: Der CBL6 N-Terminus wird von 18 der 24 *Arabidopsis* PATs in Membranen verankert. Die 24 *Arabidopsis* PATs wurden mit CBL6n:yeGFP in der Hefe *pat* Sechsfachmutante $\Delta akr1 \Delta akr2 \Delta pfa3 \Delta pfa4 \Delta pfa5 \Delta erf2$ koexprimiert und die Lokalisation von CBL6n:yeGFP untersucht. Hier wurden die PATs 01-10, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 21 und 24 als CBL6-translozierende PATs ermittelt. Maßstab: 10 μm .

Um dennoch mögliche CBL6-S-acylierende PATs ermitteln zu können, wurde die Koexpression der 24 PATs zusammen mit dem CBL6 N-Terminus in *S. cerevisiae* versucht. Dazu wurde zunächst die Lokalisation von CBL6n:yeGFP in Wildtyp-Hefezellen untersucht. Im Gegensatz zu CBL2n:yeGFP und CBL3n:yeGFP assoziierte CBL6n:yeGFP mit der Plasmamembran der Hefezellen (Abb. 38B). Der CBL6 N-Terminus stellte somit offensichtlich ein S-Acylierungssubstrat für eine oder mehrere der sieben Hefe PATs dar. Um zu überprüfen, ob der Funktionsverlust einer Hefe PAT ausreichte, um eine cytosolische Lokalisation von CBL6 zu erreichen, wurde CBL6n:yeGFP zusätzlich in den verschiedenen Hefe *pat* Einzelmutanten exprimiert. Auch in den sieben Einzelmutanten zeigte CBL6n:yeGFP eine Bindung an die Plasmamembran (Abb. 39A). In der $\Delta erf2$ Einzelmutante war eine schwache Plasmamembranbindung zu erkennen. Zusätzlich war eine Lokalisation am ER und teilweise in der Vakuole zu beobachten. Die Hefe PAT Erf2p schien somit wesentlich für die starke Plasmamembranbindung von CBL6n:yeGFP in den Hefezellen verantwortlich zu sein. Da CBL6 aber auch in der $\Delta erf2$ Einzelmutante immer noch an der Plasmamembran-lokalisiert war, wurde die Lokalisation des Calciumsensors zusätzlich in Hefe *pat* Mehrfachmutanten untersucht. Hier zeigte CBL6n:yeGFP in einer Sechsfachmutante ($\Delta akr1 \Delta akr2 \Delta pfa3 \Delta pfa4 \Delta pfa5 \Delta erf2$) eine Lokalisation am ER, partiell im Cytoplasma und in der Vakuole (Abb. 39B). In der Sechsfachmutante wurde keine Assoziation des Calciumsensors mit der Plasmamembran beobachtet. Somit waren neben Erf2p auch weitere endogene Hefe PATs fähig, eine Bindung von CBL6 an die Plasmamembran zu vermitteln.

Zur Ermittlung der CBL6-S-acylierenden *Arabidopsis* PATs wurde diese Sechsfachmutante für die Koexpressionen der 24 PATs mit CBL6n:yeGFP verwendet. Die anschließende Lokalisationsstudie ergab, dass die Koexpression der PATs 01 – 11, 13, 14, 16, 18, 19, 21 und 24 zu einer Plasmamembranbindung von CBL6n:yeGFP führte (Abb. 40). Mit Hilfe einer Western Analyse wurde auch hier die Expression der 24 PATs in der Hefe überprüft (Abb. A4, siehe Anhang). Dabei wurden bis auf die PATs 11, 12, 19 und 22 alle Enzyme detektiert. Die Expression der im Western nicht detektierbaren PATs 11 und 22 führte zu einer Plasmamembranbindung von CBL6n:yeGFP. Diese beiden PATs wurden offenbar trotz nicht nachweisbaren Proteins in den Hefezellen exprimiert.

Die Koexpression von CBL6n:yeGFP mit den *Arabidopsis* PATs in der Hefe PAT Sechsfachmutante ergab, dass 18 der 24 PATs in der Lage waren die Membranbindung von CBL6 in Hefezellen zu ermöglichen. Im Vergleich dazu vermittelten zehn PATs die Membranassoziation von CBL2 und -3 in Hefezellen. Diese Resultate deuteten darauf hin, dass CBL6 im Vergleich zu CBL2 und 3, ein Substrat für ein breiteres Spektrum von PAT-Enzymen darstellt. Beim Vergleich der Koexpressionen von PATs mit den CBLs in Hefe fiel außerdem auf, dass CBL6 ausschließlich an der Plasmamembran zu finden war. Zudem wurden bei den Koexpressionen der PATs 01 - 10 mit CBL6 kaum Hefezellen mit cytoplasmatischer Fluoreszenz

beobachtet. Das wies darauf hin, dass es Unterschiede in der Protein-S-Acylierung der drei Tonoplast-lokalisierten CBLs gibt. Möglicherweise werden diese Unterschiede durch die verschieden angeordneten N-terminalen Cysteine in den Calciumsensoren verursacht.

4.8.1 Die starke Tonoplastbindung von CBL6 wird nicht durch duale S-Acylierung an den benachbarten Cysteinresten 19 und 20 vermittelt

Anhand welcher Motive PATs ihre Substratproteine erkennen ist noch weitestgehend unerforscht. Es wird vermutet, dass einige PATs aus Hefe und Säugern ihre Substrate an Motiven der Proteine erkennen können, die nicht in unmittelbarer Nähe der S-acylierten Cysteine liegen (Scott et al. 2000; Nadolski und Linder 2009; Lemonidis et al. 2015). Die Erkennungsmotive für PAT-Enzyme müssen in CBL2 innerhalb der N-terminalen 22 Aminosäuren liegen, weil diese Sequenz ausreicht, um eine S-Acylierung durch PATs und die Verankerung des Proteins in der Vakuolenmembran zu vermitteln (Batistič et al. 2012). Die möglichen S-Acylierungsstellen im CBL6 N-Terminus sind anders angeordnet als in CBL2 und 3 und es fallen zwei direkt benachbarte Cysteinreste an den Positionen 19 und 20 auf. In den N-Termini von CBL2 und CBL3 liegen keine Cysteinreste direkt nebeneinander. Noch ungeklärt war, ob Cys19 und Cys20 in CBL6 beide S-acyliert werden und die Lipidmodifikation des einen Cysteins die Wahrscheinlichkeit eines Lipidtransfers auf das andere Cystein erhöhen kann. Es ist möglich, dass die effiziente Verankerung von CBL6 im Tonoplasten durch eine duale S-Acylierung an beiden benachbarten Cysteinen vermittelt wird. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden die N-Termini von CBL2 und CBL6 mutagenisiert. Dabei wurde in CBL2 das Cystein an Position 12 durch Alanin und das Phenylalanin an Position 19 durch Cystein ausgetauscht (CBL2^{C12A,F19C} [Abb. 41A]). In CBL6 erfolgte die Substitution an Position 13 von Alanin zu Cystein und an Position 20 von Cystein zu Phenylalanin (CBL6^{A13C,C20F}). Dadurch waren die Cysteine im mutierten CBL2 N-Terminus so angeordnet wie im Wildtyp-CBL6 N-Terminus und umgekehrt. Beide Proteine wurden N-terminal an das Fluoreszenzprotein mCherry gekoppelt und ihre Lokalisation in epidermalen Zellen von *N. benthamiana* bei Zugabe von 100 µM 2-Br bzw. MeOH untersucht. Aus bereits durchgeführten Lokalisationsstudien war bekannt, dass CBL2 in Pflanzenzellen mit dem Tonoplasten assoziiert und durch Zugabe von 2-Br cytoplasmatisch lokalisiert. CBL2^{C12A,F19C}:mCherry lokalisierte sowohl bei nicht-inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie (MeOH) als auch bei inhibierten Tabak PATs durch 2-Br, cytoplasmatisch in den Tabakzellen (Abb. 41B). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass das Phenylalanin an Position 19 im CBL2 N-Terminus für die Tonoplastbindung des Calciumsensors essentiell ist. Es war zudem bekannt, dass CBL6 *in planta* in An- und Abwesenheit von 2-Br in der Vakuolenmembran verankert wird. CBL6^{A13C,C20F}:mCherry assoziierte ebenfalls mit dem Tonoplasten und auch durch 2-Br Applikation wurde diese Membranbindung nicht verhindert. Die veränderte Anordnung der Cysteine in CBL6 hatte somit *in planta* keinen sichtbaren Einfluss auf die Lokalisation des Proteins.

Zusätzlich wurde die Lokalisation von CBL2^{C12A,F19C} und CBL6^{A13C,C20F} in Wildtyp-Hefezellen untersucht. Das CBL2-Wildtyp-Protein lokalisiert in Hefezellen, während CBL6 in der Plasmamembran verankert wird. CBL2^{C12A,F19C}:yeGFP lokalisierte im Cytoplasma der Hefezellen, während CBL6^{A13C,C20F}:yeGFP mit der Plasmamembran assoziierte. In Hefezellen änderte sich die Lokalisation von CBL2 und CBL6 durch Veränderung der Cystein Anordnung somit nicht. Die stärkere Tonoplastbindung und die größere Anzahl an translozierenden PATs des Calciumsensors CBL6 im Vergleich zu CBL2/3, sind somit nicht auf die zwei benachbarten Cysteinsreste Cys19 und Cys20 im CBL6 N-Terminus zurückzuführen. So entstand die Vermutung, dass zusätzlich zur S-Acylierung noch weitere Faktoren für die starke Tonoplastbindung von CBL6 entscheidend sind.

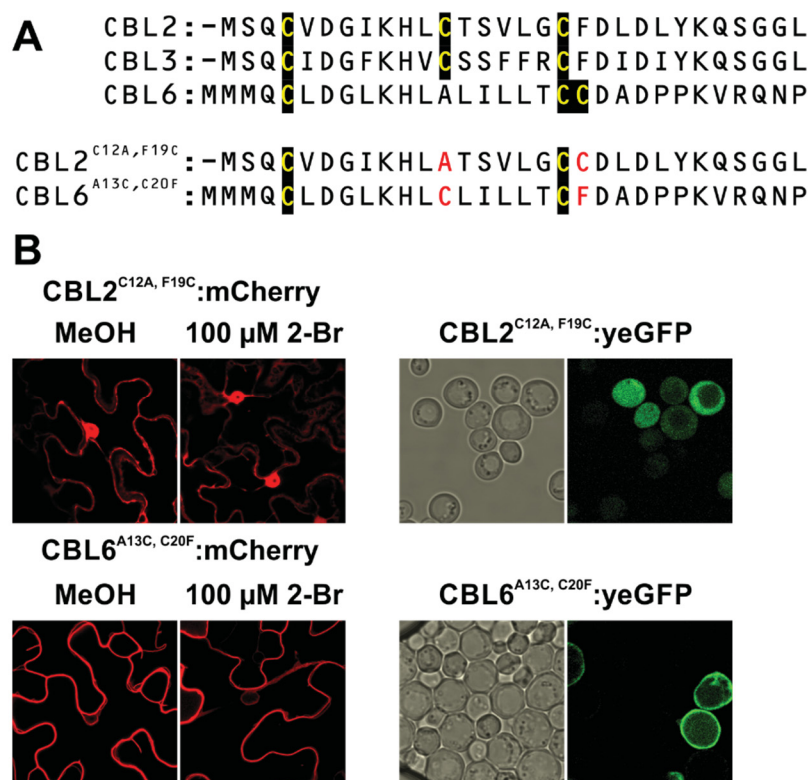


Abb. 41: CBL6 ist stabil im Tonoplasten verankert, auch wenn eins der zwei benachbarten Cysteinreste an den Positionen 19 und 20 mutiert wurde. A: Sequenzvergleich der Tonoplast-lokalisierten CBL N-Termini (verändert aus Batistič et al. 2012). Für den Versuch wurden die Cysteine im CBL2 N-Terminus wie die im CBL6 N-Terminus (CBL2^{C12A,F19C}) angeordnet und umgekehrt (CBL6^{A13C,C20F}). **B:** Lokalisationen von CBL2^{C12A,F19C} und CBL6^{A13C,C20F} in *N. benthamiana* Epidermiszellen mit MeOH oder 2-Br (links) und in Hefezellen (rechts).

4.9 Der BOP Assay *in planta* und Koexpressionen in Hefezellen können erfolgreich zur Ermittlung funktionaler PAT-Substrat Module eingesetzt werden

4.9.1 Die Wildtyp-Proteine HIR1 und HIR2 sind stabil in der Plasmamembran verankert

Der BOP Assay stellt eine effiziente Methode zur Identifizierung von PAT-Enzymen für ein bestimmtes Substratprotein dar. Entwickelt wurde diese Technik mit den Calciumsensoren CBL2 und CBL3. Ob der BOP Assay auch zur Ermittlung S-acylierender PATs von Proteinen genutzt werden kann, die nicht zur Familie der CBLs gehören, sollte anhand anderer Substrate untersucht

werden. Aus diesem Grund wurden etwa 600 Proteine, die von Hemsley et al. als S-acylierte Proteine identifiziert wurden, nach möglichen BOP Assay Kandidaten durchsucht (Hemsley et al. 2013). Da sich diese Arbeit auf die Protein-S-Acylierung am Tonoplasten fokussierte, wurde dabei zum einen nach tonoplastidären Proteinen gesucht. Zusätzlich sollten die Proteine keine Transmembrandomänen aufweisen, damit ein möglicher S-acylierter Zustand vom nicht-acylierten Zustand fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden kann. Darüber hinaus konzentrierte sich die Suche auf Proteine, die in Hemsley et al. 2013 als „sehr wahrscheinlich S-acyliert“ markiert wurden. Bei dieser Durchsicht wurden vier Proteine gefunden, die dort als Mitglieder der *Band 7* Proteinfamilie bezeichnet wurden (Hemsley et al. 2013). Darüber hinaus sind diese Proteine auch als HIR Proteine (*Hypersensitive Induced Reaction Protein*) bekannt und stehen mit der pflanzlichen hypersensitiven Reaktion in Zusammenhang (Nadimpalli et al. 2000; Qi et al. 2011). Die vier HIR Proteine weisen keine Transmembrandomänen auf und sie wurden bereits mittels Proteomanalysen an Vakuolen aus *A. thaliana* Zellkultur im Tonoplasten nachgewiesen (Shimaoka et al. 2004; Endler et al. 2006; Yoshida et al. 2013). Um die Lokalisationen von HIR1 und HIR2 zu untersuchen, wurden beide Proteine C-terminal mit einem mCherry Fluorophor fusioniert und in epidermalen Zellen von *N. benthamiana* exprimiert. Zusätzlich wurde 2-Br oder MeOH vakuuminfiltiert, um die Lokalisation bei inhibierter und nicht-inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie zu analysieren. Diese Lokalisationsstudien ergaben, dass HIR1 Plasmamembran-gebunden vorlag und sich diese subzelluläre Lokalisation durch die Zugabe von 2-Br nicht änderte (Abb. 42). Bei 100 μ M 2-Br lokalisierte HIR1:mCherry zwar zusätzlich cytoplasmatisch, die Fusionsproteine assoziierten

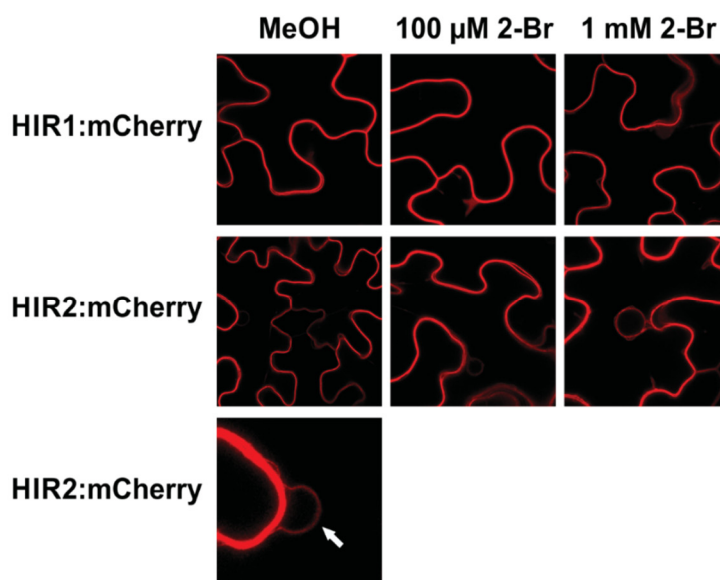


Abb. 42: HIR1 und HIR2 lokalisieren bei inhibierter und nicht-inhibierter endogener Protein-S-Acylierung hauptsächlich an der Plasmamembran von Pflanzenzellen. HIR1:mCherry und HIR2:mCherry wurden transient in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert. Anschließend wurden 100 μ M und 1mM des S-Acylierungsinhibitors 2-Br oder das Lösungsmittel MeOH vakuuminfiltiert. HIR2:mCherry lokalisierte zusätzlich schwach am Tonoplasten (siehe Pfeil in der Vergrößerung).

jedoch größtenteils mit der Plasmamembran. Auch die höhere Konzentration von 1 mM 2-Br hatte keinen Einfluss auf diese Lokalisation. HIR2:mCherry lokalisierte ebenfalls an der Plasmamembran. Zusätzlich wurden bei Überexpression von HIR2:mCherry sehr schwache Fluoreszenzen an einer Membran beobachtet, bei der es sich möglicherweise um den Tonoplasten handelte (siehe Pfeil). Durch die Zugabe von 100 μ M und 1 mM 2-Br wurde die Lokalisation des Proteins HIR2:mCherry kaum beeinflusst. Aus diesem Grund war die Durchführung von BOP Assays mit HIR1 und HIR2 zunächst nicht möglich, denn bei dieser Methode stellt ein sichtbarer Unterschied der Protein Lokalisation im S-acylierten und nicht-acylierten Zustand die Voraussetzung zur Identifikation der PATs dar.

4.9.2 HIR1 und HIR2 werden durch verschiedene Lipidmodifikationen in der Plasmamembran verankert

In HIR1 und HIR2 wurden nicht nur Cysteine als S-Acylierungsstellen, sondern jeweils auch ein potentiell N-Myristylierungsmotiv identifiziert. HIR1 weist die N-terminale Aminosäureabfolge Met-Gly-Gln-Ala-Leu-Gly-Cys (MGQALGC) auf und HIR2 eine N-terminale Met-Gly-Asn-Leu-Phe-Cys-Cys (MGNLFCC) Sequenz. Beide Proteine besitzen somit nicht das klassische duale Lipidmodifikationsmotiv MGCXX(S/T) auf, da zwischen dem Glycin und dem Cystein in HIR1 vier weitere Aminosäuren und in HIR2 drei weitere Aminosäuren liegen (Abb. 43A). Um den Einfluss einer möglichen N-Myristylierung auf die Lokalisation von HIR1 und HIR2 zu untersuchen, wurde das N-terminale Glycin der potentiellen N-Myristylierungsstelle durch die Aminosäure Alanin substituiert und die Lokalisation der Fusionsproteine HIR1^{G2A}:mCherry und HIR2^{G2A}:mCherry in *N. benthamiana* Epidermiszellen überprüft. Die Substitution des N-Myristylierungsmotivs in HIR1 führte zu einer cytoplasmatischen Lokalisation von HIR1^{G2A} *in planta* (Abb. 43B). HIR2 und HIR2^{G2A} assoziierten beide mit der Plasmamembran der Pflanzenzellen. Diese Resultate deuteten darauf hin, dass eine N-Myristylierung am Gly2 im HIR1 N-Terminus für die Plasmamembranbindung des Proteins essentiell ist. Da eine alleinige N-Myristylierung aber keine Membranbindung vermitteln kann, musste HIR1 zusätzlich lipidmodifiziert werden (Shahinian und Silvius 1995; Hemsley und Grierson 2008). Die N-Myristylierung diente somit möglicherweise als Voraussetzung für eine S-Acylierung an Position 7 (MGQALGC).

Da HIR2 und HIR2^{G2A} beide an der Plasmamembran lokalisierten, wurde HIR2 im N-terminalen MGNLFCC Motiv entweder nicht N-myristyliert, oder die N-Myristylierung hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Lokalisation von HIR2. Um zu untersuchen, ob die Plasmamembranbindung von HIR2 durch eine S-Acylierung im N-terminalen MGNLFCC vermittelt wird, wurde zusätzlich zum Gly2, das Cystein an Position 7 zu Alanin substituiert (HIR2^{G2A,C7A}). Das Fusionsprotein HIR2^{G2A,C7A}:mCherry lokalisierte ungleichmäßig im Cytoplasma der Tabak Epidermiszellen (Abb. 43C). Die Substitution von Cys6 und Cys7 zu Alanin resultierte in gleichmäßig cytoplasmatisch lokalisierten HIR2^{G2A,C6&7A}:mCherry Fusionsproteinen. Diese Ergebnissen ließen schlussfolgern, dass eine duale S-Acylierung an Cys6 und Cys7 in HIR2 die Plasmamembranbindung des

Proteins vermittelt. War nur das Cys7 mutiert, konnte HIR2 an Cys6 eventuell S-acyliert werden. Diese S-Acylierung reichte jedoch nicht für eine Verankerung in der Plasmamembran aus und durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den S-Acylgruppen kam es zu Akkumulationen im Cytoplasma. Um stabil in der Plasmamembran verankert zu werden, mussten Cys6 und Cys7 also S-acyliert vorliegen. Zusammengefasst lieferten diese Resultate Hinweise darauf, dass HIR1 und HIR2 auf unterschiedliche Weise mit der Plasmamembran assoziiert werden. HIR1 wird N-myristyliert und S-acyliert und dadurch mit der Plasmamembran assoziiert. HIR2 wird wahrscheinlich nicht N-myristyliert und durch eine duale S-Acylierung an zwei benachbarten Cysteinen an die Plasmamembran und den Tonoplasten gebunden.

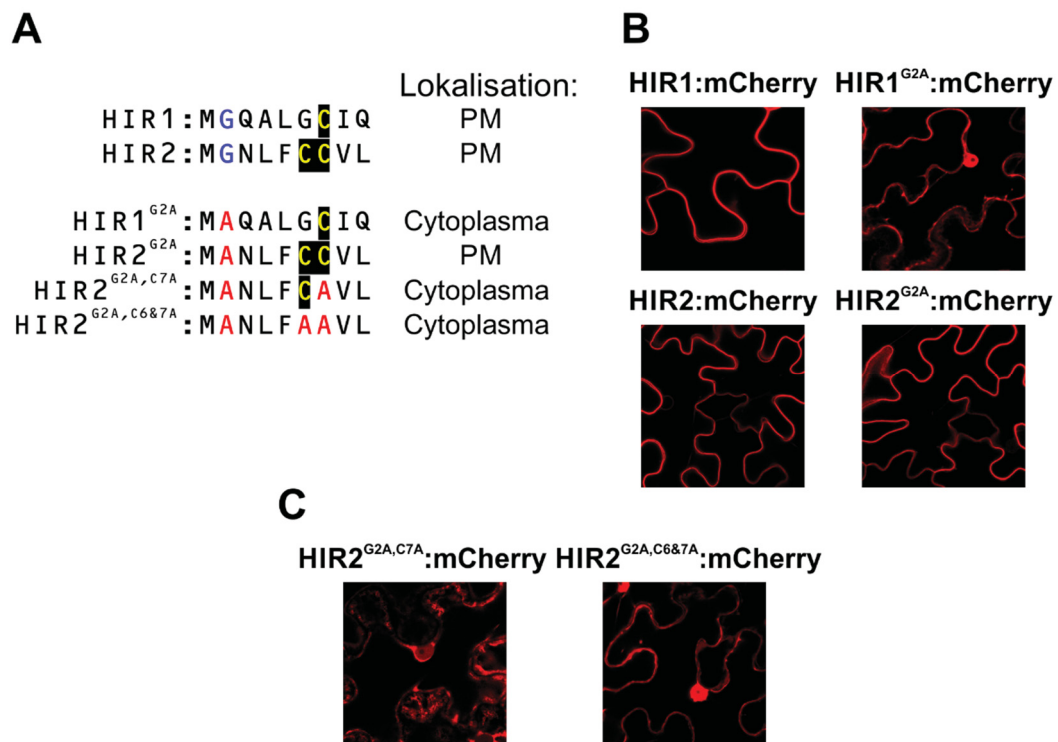


Abb. 43: Die Plasmamembranbindung von HIR1 und HIR2 wird über verschiedene Lipidmodifikationen vermittelt. A: Sequenzvergleich der neun N-terminalen Aminosäuren von HIR1 und HIR2, sowie den mutierten Proteinen HIR1^{G2A}, HIR2^{G2A}, HIR2^{G2A,C7A} und HIR2^{G2A,C6&7A}. Zusätzlich sind die Lokalisationen der jeweiligen Proteine angegeben (PM: Plasmamembran). **B:** Subzelluläre Lokalisation von HIR1:mCherry, HIR1^{G2A}:mCherry, HIR2:mCherry und HIR2^{G2A}:mCherry in *N. benthamiana* Epidermiszellen. **C:** Subzelluläre Lokalisation von HIR2^{G2A,C7A}:mCherry und HIR2^{G2A,C6&7A}:mCherry in *N. benthamiana* Epidermiszellen.

4.9.3 Im BOP Assay können fünf PATs die Plasmamembranbindung von HIR1 vermitteln

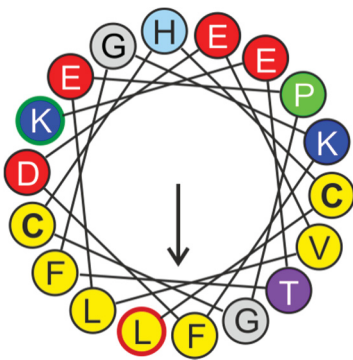


Abb. 44: Modell der potentiellen amphipatischen Helix im HIR1 Protein. Dieses Motiv wird möglicherweise im Bereich der Aminosäuren 18 - 36 gebildet. Die hydrophobe Seite ist durch gelbe Aminosäuren gekennzeichnet. Hier liegen zwei S-acylierbare Cysteinreste. Gegenüberliegend befindet sich die polare Seite. Die erste Aminosäure der Helix ist grün eingekreist, die letzte Aminosäure ist rot eingekreist.

Das HIR1 Wildtyp-Protein konnte bisher nicht für einen BOP Assay eingesetzt werden, da der Einsatz von 2-Br keinen sichtbaren Einfluss auf die stabile Plasmamembranbindung des Proteins hatte. Das nicht-myristylierbare HIR1^{G2A} Protein zeigte jedoch *in planta* eine cytoplasmatische Lokalisation. Darüber hinaus besitzt HIR1 zusätzlich zum potentiell S-acylierbaren Cys7 und noch vier weitere Cysteine an den Positionen 32, 34, 38 und 58. *In silico* Analysen mit dem Vorhersageprogramm „HELIQUEST“ deuteten darauf hin, dass HIR1 im Bereich der Aminosäuren 18 – 36 eine AH bildet (Abb. 44). Cys32 und Cys34 sind dabei im hydrophoben Bereich dieser AH platziert. Anhand bereits gezeigter Daten wurde festgestellt, dass die Tonoplastbindung des Calciumsensors CBL2 die Bildung einer AH in Kombination mit der S-Acylierung von Cysteinresten in dieser AH voraussetzt. Möglicherweise erfüllt die potentielle AH in HIR1 zusammen mit den S-

acylierbaren Cysteinresten ähnliche Funktionen. Weitere Daten aus dieser Arbeit haben gezeigt,

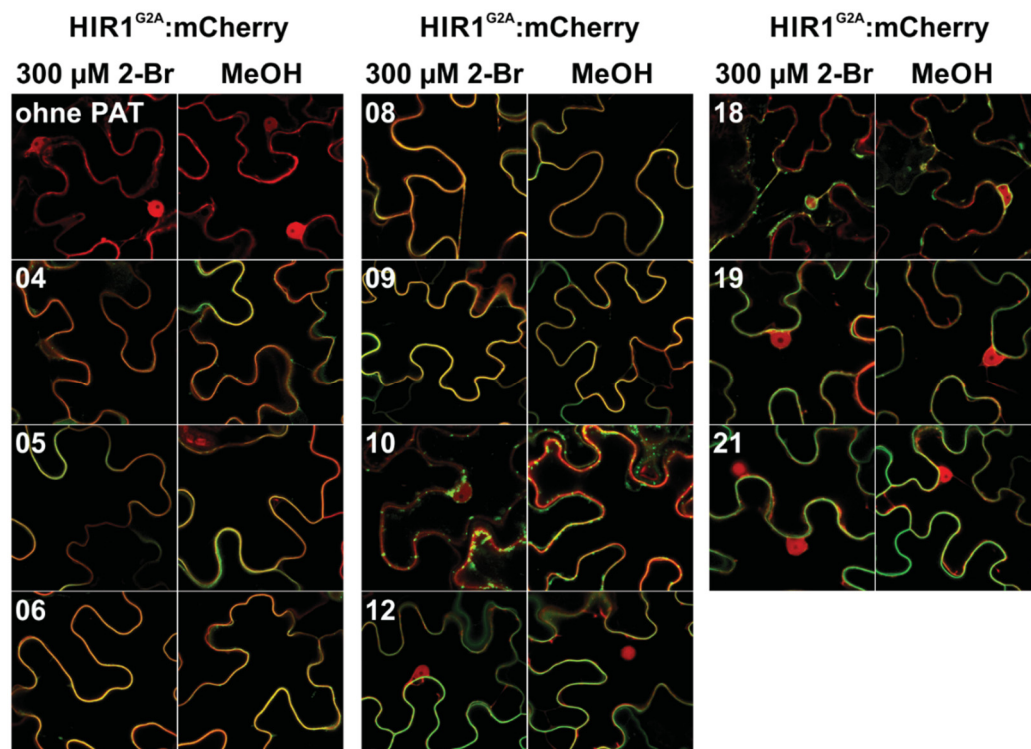


Abb. 45: HIR1^{G2A} kann durch überexprimierte Plasmamembran-lokalisierte *Arabidopsis* PATs an die Plasmamembran von Pflanzenzellen gebunden werden. HIR1^{G2A}:mCherry wurde mit den *Arabidopsis* PATs 04 – 06, 08 -10, 12, 18, 19 und 21 in *N. benthamiana* Epidermiszellen koexprimiert und 2-Br oder MeOH vakuuminfiltiert.

dass mutierte cytoplasmatisch-lokalisierte Substrate durch Koexpression einer Substrat-funktionalen PAT wieder an Membranen transloziert werden konnten (CBL2^{CAC}, CBL2^{CCA}, CBL2^{ACC}, CBL2^{T13P}). Im nachfolgenden Versuch sollten also auch das cytoplasmatisch-lokalisierte HIR1^{G2A}:mCherry und verschiedene PATs *in planta* koexprimiert werden. Durch Koexpression HIR1-funktionaler PATs kann der S-Acyl-Transfer auf die Cysteine in der AH von HIR1^{G2A} eventuell positiv beeinflusst und eine Translokation des Proteins an Membranen ermöglicht werden. Um dabei zwischen starken und schwachen HIR1-S-acylierungsfähigen PAT-Enzymen unterscheiden zu können, wurde ein BOP Assay mit 2-Br durchgeführt. Dabei wurde eine höhere 2-Br-Konzentration als bisher gewählt (300 µM), um die Selektivität der Methode zu erhöhen. Da HIR1 an der Plasmamembran lokalisiert, wurden im BOP Assay mit HIR1^{G2A}:mCherry die Plasmamembran-gebundenen PATs 04, 05, 06, 08, 09, 12, 19 und 21 getestet. Um zusätzlich nicht-Plasmamembran-lokalisierte PATs auf ihre Aktivität gegenüber HIR1^{G2A} zu untersuchen, wurde zudem eine Tonoplast- und Golgi-lokalisierte PAT (PAT10) und eine ER-lokalisierte PAT (PAT18) für den BOP Assay ausgewählt. Die Koexpression der Plasmamembran-lokaliserten PATs 04, 05, 06, 08 und 09 mit und ohne 2-Br, verursachte eine Bindung von HIR1^{G2A}:mCherry an die Plasmamembran der Pflanzenzellen (Abb. 45). Diese Enzyme zeigten im BOP Assay *in planta* somit eine hohe Aktivität gegenüber HIR1. Bei Koexpression von PAT10 war die Plasmembranbindung von HIR1^{G2A}:mCherry nur ohne 2-Br zu beobachten. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass PAT10 gegenüber HIR1 eine niedrige Aktivität aufweist. Durch das 2-Br wurde die überexprimierte PAT10 inhibiert und in dem Fall reichte die niedrige Aktivität des Enzyms nicht aus, um eine Membranbindung von HIR1^{G2A} zu vermitteln. Die koexprimierten PATs 12, 18, 19 und 21 vermittelten keine Membranbindung von HIR1^{G2A}:mCherry und waren dem Protein gegenüber inaktiv. HIR1^{G2A} wurde somit trotz fehlender N-Myristylierung durch Koexpression HIR1-funktionaler PATs in der Plasmamembran verankert. Als mögliche HIR1-S-acylierende PATs wurden PAT04, 05, 06, 08 oder 09 ermittelt. Falls die N-Myristylierung im HIR1 N-Terminus die Voraussetzung für eine S-Acylierung am Cys7 darstellt, konnte Cys7 im HIR1^{G2A} Protein nicht S-acyliert werden. In dem Fall ist das Protein somit an Cysteinen außerhalb des N-terminalen Motivs S-acyliert worden. Möglicherweise wurden in HIR1 die Cysteine im hydrophoben Bereich der AH S-acyliert und die Plasmamembranbindung konnte darüber vermittelt werden.

4.9.4 HIR1 wird in einem N-terminalen MGQALGC Motiv und an weiteren Cysteinen S-acyliert

Als unterstützende Methode zum BOP Assay, sollten HIR1 und die PAT-Enzyme zur Ermittlung der HIR1-S-acylierenden PATs in Hefezellen koexprimiert werden. Dazu wurde zunächst die Lokalisation des Fusionsproteins HIR1:yeGFP in Wildtyp-Hefezellen untersucht. Dort war HIR1:yeGFP in der Plasmamembran verankert (Abb. 46A). Auffallend waren hier punktartige Akkumulationen des Proteins im Bereich der Plasmamembran, bei denen es sich um mögliche

Membran-Subdomänen handelt. HIR1 wurde wahrscheinlich durch endogene Hefe N-Myristyltransferasen und S-Acyltransferasen erkannt, lipidmodifiziert und dadurch in der Plasmamembran verankert. Aus diesem Grund erfolgte zusätzlich die Expression des HIR1^{G2A} Proteins mit mutierter N-Myristylierungsstelle. HIR1^{G2A}:yeGFP lokalisierte im Cytoplasma der Hefezellen. Zur Ermittlung der HIR1-S-acylierenden PATs wurden demzufolge Koexpressionstudien mit PATs und dem cytoplasmatisch lokalisierten HIR1^{G2A}:yeGFP Protein in *S. cerevisiae* durchgeführt. Bei diesen Koexpressionen wurden zusätzlich zu den Plasmamembran-lokalisierten *Arabidopsis* PATs 04 – 09, 12, 19 und 21 auch einige nicht-Plasmamembran-lokalisierte PATs auf ihre HIR1^{G2A}-Aktivität hin untersucht. Darunter eine Vesikel-lokalisierte (PAT01), eine ER-lokalisierte (PAT18) und eine Tonoplast- und Golgi-lokalisierte (PAT10). HIR1^{G2A}:yeGFP lokalisierte bei Koexpression der PATs 01, 04 – 10, 18, 19 und 21 an Hefezellmembranen (Abb. 46B). Die Koexpression von PAT12 verursachte keine Membranbindung von HIR1^{G2A}:yeGFP. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der BOP

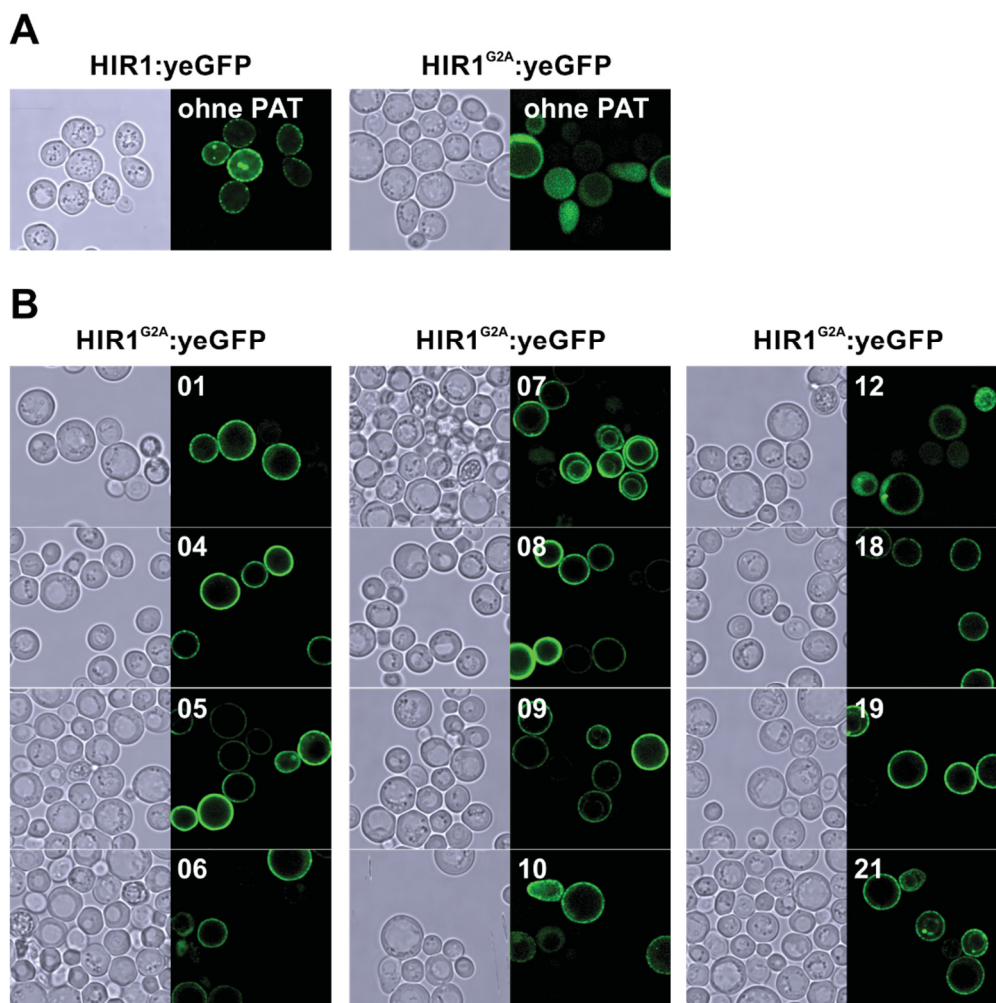


Abb. 46: HIR1^{G2A} wird trotz mutierter N-Myristylierungsstelle durch Koexpression verschiedener *Arabidopsis* PATs in Membranen von Hefezellen verankert. **A:** HIR1:yeGFP und HIR1^{G2A}:yeGFP wurden in der Wildtyp-Hefe *S. cerevisiae* exprimiert. **B:** HIR1^{G2A}:yeGFP wurde mit den *Arabidopsis* PATs 01, 04 - 10, 12, 18, 19 und 21 in Hefezellen koexprimiert.

Assays und der Koexpressionen in Hefe mit HIR1^{G2A}, in der Tabelle 9 (Seite 96) zusammengefasst. Die Anzahl der HIR1^{G2A}-translozierenden PATs war im BOP Assay *in planta* geringer als bei den Koexpressionen in Hefe. Wie auch schon bei Anwendung der Methoden mit CBL2 beobachtet wurde, weist der BOP Assay *in planta* somit eine höhere Selektivität auf.

Die Koexpressionen in Hefezellen ohne den Einsatz von 2-Br haben insgesamt gezeigt, dass elf der zwölf getesteten *Arabidopsis* PATs eine Plasmamembranbindung von HIR1^{G2A} vermitteln konnten.

Zur Untersuchung einer möglichen HIR1-S-Acylierung außerhalb des N-terminalen dualen Lipidmodifikationsmotivs MGQALGC, wurde eine Membranbindung eines mutierten HIR1 Proteins analysiert, in dem das MGQALGC Motiv fehlt. Dazu wurden die ersten sieben Aminosäuren MGQALGC vollständig deletiert und das Protein HIR1^{ΔN}:yeGFP mit den PATs 01, 04 – 10, 12, 18, 19 und 21 in Hefezellen koexprimiert. Ohne koexprimierte PAT lokalisierte HIR1^{ΔN}:yeGFP cytoplasmatisch (Abb. 47A). Trotz deletierter MGQALGC Sequenz wurde HIR1^{ΔN}:yeGFP durch die koexprimierten PATs 01, 04, 06, 08 und 10 an Hefezellmembranen transloziert (Abb. 47B). Außerhalb des MGQALGC Motivs wurden also wahrscheinlich weitere Cysteine S-acyliert. Unbekannt war, ob diese S-Acylierung eine Plasmamembranbindung in Pflanzenzellen vermitteln kann. Das kann zukünftig durch Koexpression der PATs mit HIR1^{ΔN} *in planta* untersucht werden. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Koexpressionen von PAT Enzymen mit HIR1^{G2A} und HIR1^{ΔN} in Hefezellen, zeigt ebenfalls die Tabelle 9 (Seite 96).

Das nicht-myristylierbare HIR1^{G2A}:yeGFP wurde durch koexprimierte PATs meistens in der Plasmamembran der Hefezellen verankert. HIR1^{ΔN}:yeGFP lokalisierte bei Koexpression der PATs jedoch in punktförmigen Strukturen der Vakuolen- und Plasmamembran. HIR1^{G2A} und HIR1^{ΔN} zeigten demzufolge Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation in den Hefezellen. Diese unterschiedlichen Lokalisationen von HIR1^{G2A} und HIR1^{ΔN} bei Koexpression der gleichen PAT sind ein Hinweis darauf, dass das Cystein im HIR1^{G2A} MAQALGC Motiv trotz mutiertem N-Myristylierungsmotiv durch Koexpression der HIR1-funktionalen PAT-Enzyme S-acyliert werden konnte. Darüber hinaus führte die S-Acylierung an den unterschiedlichen Positionen in HIR1 offenbar zu verschiedenen subzellulären Lokalisationen des Proteins in Hefezellen. Die PATs 05, 07, 09, 18, 19 und 21 zeigten Aktivität gegenüber HIR1^{G2A}, konnten HIR1^{ΔN} jedoch nicht an Hefezellmembranen translozieren. Möglicherweise S-acylierten diese PATs ausschließlich das Cystein im dualen Lipidmodifikationsmotiv MGQALGC und nicht die zusätzlichen Cysteine außerhalb dieses Motivs in HIR1. Die PATs 01, 04, 06, 08 und 10 vermittelten hingegen Membranbindungen von HIR1^{G2A} und HIR1^{ΔN}. Dieses Resultat ließ schlussfolgern, dass diese PATs das Cystein im N-terminalen MGQALGC Motiv, sowie weitere Cysteine außerhalb des Motivs S-acylieren konnten.

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass der BOP Assay und die Substrat-PAT-Koexpressionen in Hefezellen auch mit nicht-CBL Proteinen zur Identifikation ihrer funktionalen

PATs genutzt werden können. Mit diesen Methoden wurden CBL2-, CBL3-, CBL6- und HIR1-S-acylierungsfähige PAT-Enzyme ermittelt. Beim Vergleich beider Methoden zeigte sich, dass der BOP Assay *in planta* sowohl mit CBL2, als auch mit HIR1, die selektivere Technik war. Die Untersuchungen mit HIR1 ergaben, dass beide Methoden auch dann angewendet werden

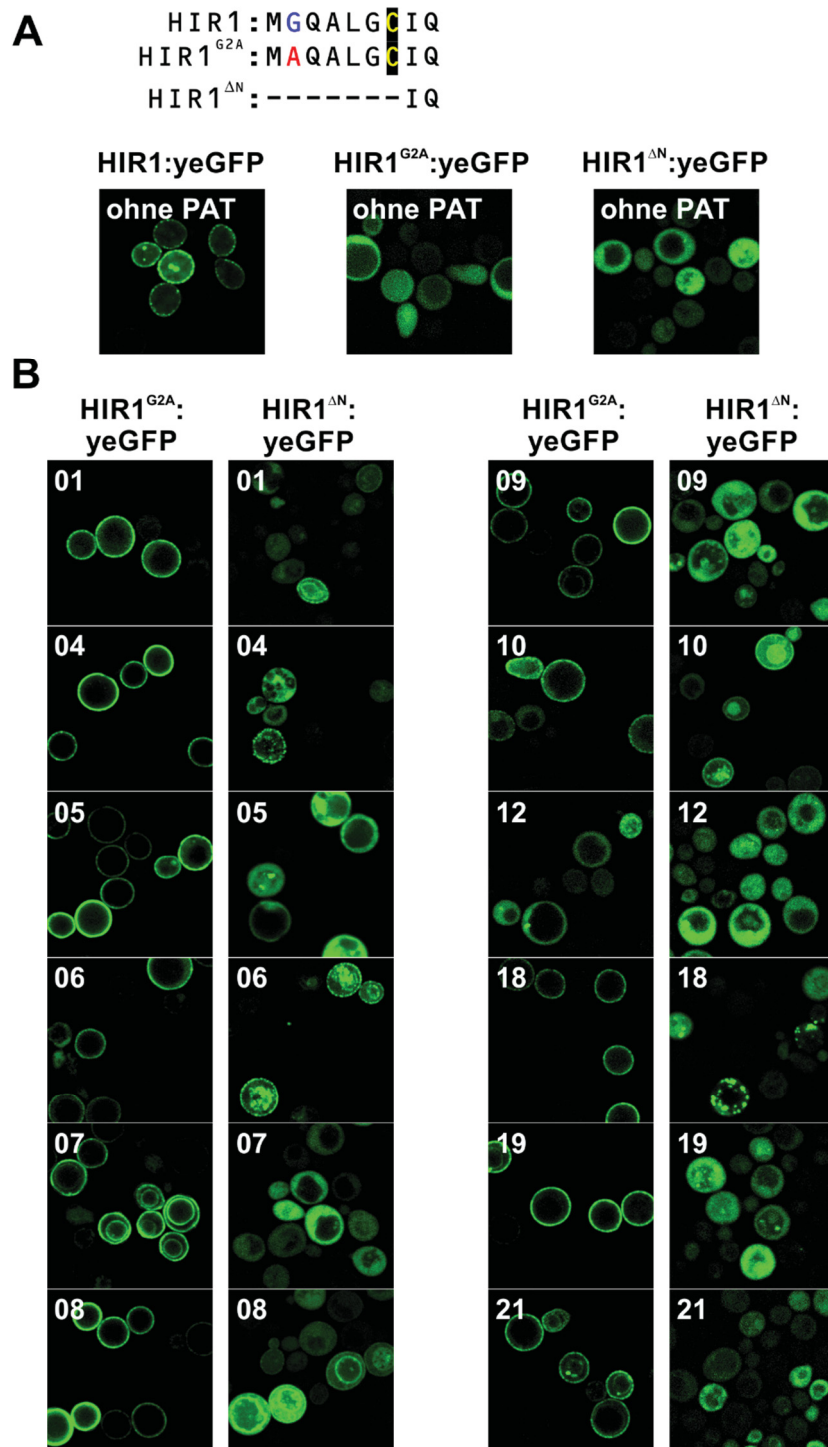


Abb. 47: HIR1^{ΔN} wird durch koexprimierte *Arabidopsis* PATs in Hefezellmembranen verankert. A: Die N-terminalen Aminosäuren von HIR1, HIR1^{G2A} und HIR1^{ΔN} und die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine (fusioniert mit yeGFP) in Hefezellen. **B:** Koexpressionen der PATs 01, 04 – 10, 12, 18, 19 und 21 mit HIR1^{ΔN}:yeGFP in Hefezellen. Zum besseren Vergleich sind hier erneut die Fluoreszenzaufnahmen der Koexpressionen mit HIR1^{G2A}:yeGFP aus der Abb. 46 dargestellt.

können, wenn das Wildtyp-Substrat zusätzlich N-myristyliert wird und *in vivo* keine deutlich sichtbare Lokalisationsänderung bei inhibierter oder nicht-inhibierter endogener Protein-S-Acylierungsmaschinerie aufweist. Durch Koexpression eines mutierten nicht-myristylierbaren Proteins (G zu A Substitution) wurde hier der nicht-membrangebundene Zustand des Substrats erreicht. Dieses Protein konnte durch Koexpression bestimmter funktionaler PATs auch ohne N-Myristylierung in Zellmembranen verankert werden.

Tabelle 9: Übersicht der HIR1^{G2A}- und HIR1^{ΔN}-translozierenden PATs aus den Koexpressionen *in planta* und in Hefezellen. ↷: durch Koexpression des jeweiligen PAT Proteins wurde eine Membranbindung von HIR1^{G2A} vermittelt. **X**: das jeweilige PAT Protein verursachte keine Membranbindung von HIR1^{G2A}.

	Plasmamembran- bindung von HIR1 ^{G2A} <i>in planta</i>	Membran- bindung von HIR1 ^{G2A} in Hefezellen	Membran- bindung von HIR1 ^{ΔN} in Hefezellen
PAT01	nicht getestet	↷	↷
PAT04	↷	↷	↷
PAT05	↷	↷	X
PAT06	↷	↷	↷
PAT07	nicht getestet	↷	X
PAT08	↷	↷	↷
PAT09	↷	↷	X
PAT10	nur in Abwesenheit von 2-Br	↷	↷
PAT12	X	X	X
PAT18	X	↷	X
PAT19	X	↷	X
PAT21	X	↷	X

5 Diskussion

5.1 Neu entwickelte Methoden ermöglichen die Identifikation funktionaler PAT-Enzym-Substrat Kombinationen

5.1.1 Mit dem BOP Assay können *in vivo* funktionale PAT-Enzym-Substrat Paare ermittelt werden

In *Arabidopsis thaliana* wurden 24 Protein-S-Acyltransferasen (PATs) identifiziert, von denen erst vier Enzyme genauer charakterisiert wurden (Hemsley et al. 2005; Batistič 2012; Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013; Lai et al. 2015). Die deutlich sichtbaren Phänotypen der bereits isolierten *A. thaliana* PAT Funktionsverlustmutanten, weisen auf essentielle physiologische Funktionen dieser

Enzyme in Pflanzen hin. Die Zahl der Substrate übersteigt die Zahl der PAT-Enzyme jedoch deutlich und in *A. thaliana* wurden bereits 600 S-acylierte Proteine identifiziert (Hemsley et al. 2013). Es muss also PAT-Enzyme geben, die mehrere Substrate S-acylieren können. Einige Substrate können wiederum teilweise von verschiedenen PATs lipidmodifiziert werden, sind also nicht-selektiv was ihre S-acylierenden Enzyme angeht (Hou et al. 2009). Bei der Ermittlung funktionaler PAT-Substrat Paare mit PAT Funktionsverlustmutanten können demzufolge Substratproteine der jeweiligen PAT übersehen werden, wenn diese möglicherweise durch andere PATs S-acyliert wurden. Eine solche Redundanz kann ein Grund dafür sein, dass bisher nur wenige pflanzliche PAT-Substrat Beziehungen beschrieben worden sind. Die S-Acylierung der vielen bereits identifizierten Substrate aus *A. thaliana* konnte bisher nicht auf die Aktivität einzelner PATs zurückgeführt werden. Damit geht einher, dass auch die PAT-Substraterkennung, sowie die Voraussetzungen für den Lipidtransfer von PAT-Enzymen auf ihre jeweiligen Substrate noch weitestgehend unverstanden sind. Um die Mechanismen der pflanzlichen Protein-S-Acylierung detaillierter zu untersuchen, war zunächst die Etablierung neuer Methoden notwendig, mit denen funktionale PAT-Substrat Module identifiziert werden können.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass funktionale PAT-Substrat Module durch eine Methode ermittelt werden können, die auf der heterologen Expression des Substrats zusammen mit den AtPATs in *Nicotiana benthamiana* beruht. Dazu muss die endogene Tabak S-Acylierungsmaschinerie unterdrückt werden, um die S-Acylierung des heterolog exprimierten Substrats durch endogene Tabak PATs zu verhindern. Unter den als S-Acylierungsinhibitoren beschriebenen Chemikalien 2-Br, 2-Fluorpalmitat, Tunicamycin und Cerulenin konnte 2-Br als einzige Substanz zur effektiven Inhibition der S-Acylierung *in planta* eingesetzt werden. Aufgrund der Applikation von 2-Br und gleichzeitiger Überexpression der PATs, wurde die Methode als BOP Assay bezeichnet (*2-Bromopalmitate and Overexpression of PAT proteins* [Abb. 48]). Die Voraussetzung für die Durchführbarkeit eines BOP Assay ist eine sichtbare Lokalisationsänderung des S-acylierten Substrats (+ MeOH) im Vergleich zum nicht-acylierten Substrat (+ 2-Br). So lässt sich die durch S-Acylierung vermittelte Membranbindung des Proteins durch die jeweiligen PATs in den Pflanzenzellen fluoreszenzmikroskopisch nachverfolgen. Mit dem BOP Assay ist es nun möglich, bestimmte Substrat-S-acylierende PATs innerhalb weniger Tage *in planta* zu ermitteln.

Die Protein-S-Acylierung wurde unter anderem bereits im Mycel von *Aspergillus fumigatus*, in humaner Zellkultur (HEK-293 Zellen) oder auch im parasitischen Protozoon *Toxoplasma gondii* durch 2-Br Applikation inhibiert (Fortwendel et al. 2012; Arango-Lievano et al. 2016; Caballero et al. 2016). Der BOP Assay kann also auf jedes biologische System übertragen werden und ist nicht auf Pflanzenzellen beschränkt. Durch Anwendung dieser Methode können zukünftig funktionale eukaryotische PAT-Substrat Paare identifiziert werden, um die Mechanismen der Protein-S-Acylierung in verschiedenen Organismen zu untersuchen.

Wurden durch den BOP Assay mehrere Substrat-S-acylierungsfähige PATs identifiziert, lässt sich die Zahl durch Anwendung des induzierbaren BOP Assay (iBOP Assay) weiter reduzieren. Dabei wird zuerst das Substrat exprimiert und der nicht-acylierte Zustand durch 2-Br Applikation verursacht. Anschließend erfolgt die induzierte PAT-Expression. Somit wird die Wirkung des toxischen 2-Br auf die PATs minimiert und eine zeitliche Trennung von Inhibition der endogenen S-Acylierungsmaschinerie im Expressionssystem und der PAT-Expression erreicht. Es ist möglich, dass die S-Acylierungsaktivität einiger PATs im iBOP Assay gegenüber dem bereits nicht-acyliertem Substrat nicht stark genug ist, um eine Membranbindung des Substrats zu vermitteln. Um die S-Acylierung eines bestimmten Substrats auf die Aktivität einer PAT zurückzuführen, kann der iBOP also als zusätzliche Enzym-selektierende Methode angewendet werden.

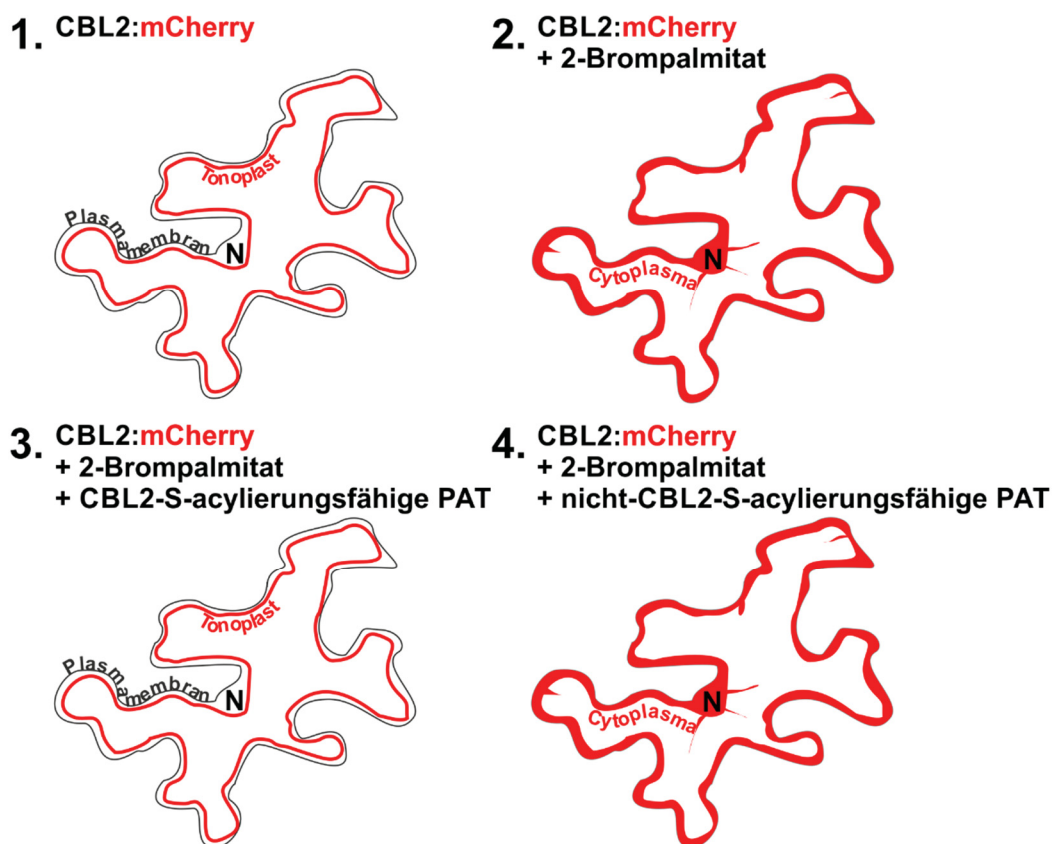


Abb. 48: Die Funktionsweise des BOP Assay am Beispiel des Substrats CBL2. 1. Wird CBL2 (rot) in *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert, erfolgt eine S-Acylierung des Proteins durch endogene Tabak PATs und CBL2 wird im Tonoplasten verankert. 2. Durch die Zugabe des S-Acylierungsinhibitors 2-Brompalmitat (2-Br) werden endogene Tabak PATs inhibiert, CBL2 liegt nicht-acyliert vor und verbleibt somit im Cytoplasma der Pflanzenzellen. 3. Wird nun eine CBL2-S-acylierungsfähige PAT überexprimiert, kann das Enzym die inhibitorische Wirkung von 2-Br kompensieren und CBL2 S-acylieren. Durch die S-Acylierung wird CBL2 wieder im Tonoplasten verankert. 4. Im Gegensatz dazu zeigen nicht-CBL2-S-acylierungsfähige PATs keine Aktivität gegenüber CBL2 und der Calciumsensor lokalisiert cytoplasmatisch. N: Nukleus.

Ein Nachteil des BOP Assay ist, dass die Substrat-Lokalisation in An- und Abwesenheit von 2-Br für jede PAT-Substrat Kombination analysiert werden muss. Für ein schnelleres Screenen von funktionalen PAT-Substrat Modulen, wäre eine Weiterentwicklung des BOP Assays von Vorteil,

die eine einfache Ja/Nein-Selektion erlaubt. Dazu kann diese Methode mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) kombiniert werden. Bei dieser BOP-BiFC Kombination kann eine Hälfte des Fluoreszenzproteins YFP (*yellow fluorescent protein*) durch ein Signalpeptid mit einer beliebigen Zellmembran assoziiert werden. Die zweite Fluorophorhälfte sollte mit dem S-Acylierungssubstrat fusioniert werden. Bei Koexpression einer Substrat-S-acylierungsfähigen PAT, wird das Substrat in Zellmembranen verankert und gelangt so in räumliche Nähe der dort lokalisierten Fluorophorhälfte. Dadurch kommt es zur Komplementation der beiden Fluorophorhälften und damit zur Fluoreszenz. Zeigt die jeweilige PAT keine Substrat-S-Acylierungsfähigkeit, gelangen die Fluorophorhälften nicht in räumliche Nähe und es ist keine Fluoreszenz sichtbar. In diesem Assay muss nicht die Lokalisationsänderung des Substrats beobachtet, sondern nur zwischen fluoreszierend und nicht-fluoreszierend unterschieden werden. Darüber hinaus können die Zielmembranen des Substrats bestimmt werden, indem eine Fluorophorhälfte durch Signalpeptide an bestimmte Membranen in der Pflanzenzelle gebunden wird und die Fluoreszenz anschließend subzellulär lokalisiert werden kann.

5.1.2 Mit dem BOP Assay können S-acylierungsfähige PATs von dual lipidmodifizierten Substratproteinen ermittelt werden

Die Voraussetzung für das Substratprotein zur Durchführung eines BOP Assay war bisher die Lokalisationsänderung im S-acylierten und nicht-acylierten Zustand. Im Laufe dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass nicht jedes S-Acylierungssubstrat durch 2-Br Applikation cytoplasmatisch lokalisiert wurde. Das N-myristylierte und S-acylierte Protein HIR1 assoziierte trotz inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie durch 2-Br Applikation mit der Plasmamembran. Es war jedoch möglich, eine cytoplasmatische Lokalisation durch Mutieren der N-Myristylierungsstelle von HIR1 zu erreichen (Gly₂- zu Ala₂-Substitution). Durch Koexpression bestimmter PAT-Enzyme konnte das Substrat mit mutierter N-Myristylierungsstelle wieder an Pflanzenzellmembranen transloziert werden. Da das mutierte Substrat HIR1^{G2A} von endogenen Tabak PATs nicht an die Plasmamembran transloziert wurde, musste in den Assays mit diesem Protein nicht zwingend 2-Br appliziert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die 2-Br Applikation zwischen starker und schwacher S-Acylierungsfähigkeit der PAT-Enzyme unterschieden werden konnte. Der S-Acylierungsinhibitor 2-Br kann also bei dieser Methode zusätzlich eingesetzt werden, um die Selektivität der Methode zu erhöhen. Der BOP Assay ist somit auch bei Substraten anwendbar, die durch N-Myristylierung und S-Acylierung stabil in Pflanzenzellmembranen verankert sind. Durch eine Aminosäuresubstitution im Substrat wurden *in planta* PAT-Enzyme identifiziert, die ein dual lipidmodifiziertes Substrat S-acylieren können.

5.1.3 Mit dem BiBOP Assay kann die Thioveresterung eines Proteins durch ein PAT-Enzym biochemisch und translokationsunabhängig untersucht werden

Durch eine S-Acylierung erhöht sich die Hydrophobizität der lipidmodifizierten Proteine. So können nicht-acylierte lösliche Proteine durch den Lipidanker an Membranen binden und dadurch ihre Lokalisation innerhalb der Zelle ändern (Yalovsky et al. 1999; Hurst und Hemsley 2015). Einige S-Acylierungssubstrate sind jedoch auch membranständige Proteine, die im S-acylierten und nicht-acylierten Zustand gleich lokalisieren können (Bijlmakers und Marsh 2003; Magee und Seabra 2005). Um dennoch die S-Acylierung solcher Proteine auf die Aktivität bestimmter PATs zurückzuführen, kann zukünftig der BiBOP Assay eingesetzt werden (*Biotin Switch* und BOP Assay). Der erste Schritt dabei ist die Durchführung eines BOP Assay. Das jeweilige PAT-Substrat Paar wird in *N. benthamiana* bei inhibierter endogener Tabak S-Acylierungsmaschinerie heterolog exprimiert. Im Anschluss erfolgt die biochemische Untersuchung der S-Acylierung des Substrats durch die jeweilige koexprimierte PAT mit Hilfe der *Biotin Switch* Methode. Durch Anwendung des BiBOP Assay war in dieser Arbeit erstmals die Thioveresterung des Calciumsensors CBL2 durch die koexprimierte PAT10 biochemisch nachweisbar. Eine mögliche Weiterentwicklung zu dieser Methode ist der Einsatz der bioorthogonalen Markierung mit azido-Fettsäure Analoga. Dabei werden die jeweiligen Proteine direkt mit einer azido-Fettsäure lipidmodifiziert. Anschließend binden die lipidmodifizierten Proteine über die azido-Fettsäure an Phosphin-Biotin und können dadurch aufgereinigt werden (Hang et al. 2007; Charron et al. 2009). Mit dieser Methode sind die Blockierung freier S-Acylgruppen durch N-Ethylmaleimid (NEM) und auch der Austausch der S-Acylgruppen durch Biotin nicht mehr notwendig. Wird diese Methode mit dem BOP Assay kombiniert, kann die S-Acylierung eines Proteins durch die jeweilige überexprimierte PAT direkt biochemisch nachverfolgt werden.

5.1.4 Funktionale PAT-Substrat Kombinationen können durch Koexpressionen in Hefezellen ohne den Einsatz von 2-Br identifiziert werden

Mit dem neu entwickelten BOP Assay ist es nun möglich Substrat-spezifische PAT-Enzyme in Pflanzenzellen zu identifizieren. Dabei muss jedoch die endogene Tabak S-Acylierungsmaschinerie durch 2-Br inhibiert werden, um die Substrat-S-Acylierung durch endogene Tabak PATs auszuschließen. Bei 2-Br handelt es sich jedoch um einen unspezifischen Inhibitor verschiedener Prozesse, der bei hohen Konzentrationen zudem cytotoxisch ist. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, neben der Etablierung des BOP Assay, eine Inhibitor-unabhängige Methode zu entwickeln, mit der funktionale PAT-Substrat Paare identifiziert werden können. Im Gegensatz zu *A. thaliana* mit 24 PATs besitzt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur sieben PAT-Enzyme (Hou et al. 2009). Werden pflanzliche Proteine in Hefezellen exprimiert, besteht zum einen die Möglichkeit, dass diese durch die endogenen Hefe PATs nicht erkannt und nicht S-acyliert werden. In dem Fall ist eine Koexpression der PAT-Substrat Paare in Wildtyp-Hefezellen möglich. Wird das Substratprotein mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert, kann eine

mögliche Lokalisationsänderung des Substrats fluoreszenzmikroskopisch nachverfolgt werden. Wird das Substratprotein durch die endogenen Hefe PATs erkannt und S-acyliert, können Hefe *pat* Mehrfachmutanten mit reduzierter endogener S-Acylierungsaktivität eingesetzt werden (Hou et al. 2009). Im Fall von membranständigen Substratproteinen können die PAT-Substrat Paare zukünftig in Hefe koexprimiert und anschließend die *Biotin Switch* Methode angewendet werden. Die Koexpression von PAT-Substrat Paaren in Hefezellen ist damit zur Identifikation spezifischer Substrat-S-acylierender PATs ohne den Einsatz eines S-Acylierungsinhibitors geeignet und bietet neben dem *in planta* BOP Assay ein zweites, unabhängiges experimentelles System.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den BOP Assays und aus den Koexpressionen der PAT-Substrat Kombinationen in Hefezellen, stellte sich der *in planta* BOP Assay als selektivere Methode heraus. Die Anzahl der S-acylierungsfähigen PATs war in Hefezellen stets größer als bei den BOP Assays *in planta*. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass in der Hefe bestimmte Proteinmodifikationen fehlen, die die Aktivität der heterolog exprimierten pflanzlichen PATs beeinflussen können. So wurde bereits gezeigt, dass die Oligomerisierung zweier PAT-Enzyme aus Säugern einen Einfluss auf die katalytische Aktivität dieser Enzyme hat. Die katalytische Aktivität der beiden jeweiligen PAT Dimere ist niedriger, als die katalytische Aktivität der Monomere (Lai und Linder 2013). Es ist also denkbar, dass die erhöhte S-Acylierung in Hefezellen durch die nicht mögliche PAT Dimerisierung aufgrund fehlender Modifikationen in Hefe zustande kommt. Eine weitere Erklärung für die erhöhte Selektivität des *in planta* BOP Assays kann der eingesetzte Inhibitor 2-Br sein. Da die verschiedenen PATs unterschiedliche Affinitäten zu ihrem Lipiddonor Acyl-CoA aufweisen, zeigen sie möglicherweise auch dem 2-Brompalmityl-CoA gegenüber unterschiedliche Affinitäten (Jennings und Linder 2012). Aufgrund dieser Unterschiede werden einige heterolog exprimierte PATs eventuell stärker inhibiert als andere Enzyme und können das Substrat daher nicht in den Pflanzenzellen S-acylieren. Zwar wurde durch die BOP Assays und Koexpressionen in Hefezellen nicht exakt die gleiche Anzahl an Substrat-S-acylierungsfähigen PAT-Enzymen ermittelt. Dennoch wurden alle *in planta* identifizierten funktionalen PAT-Substrat Paare auch in Hefezellen verifiziert. Die Koexpressionen der PAT-Substrat Kombinationen in Hefezellen stellt somit eine zuverlässige Methode dar, um funktionale PAT-Substrat Paare ohne den zusätzlichen Einsatz von Chemikalien zu identifizieren und die *in planta* Studien in einem anderen Expressionssystem zu überprüfen.

5.2 Der Calciumsensor CBL2 wird in *Arabidopsis thaliana* unter normalen Wachstumsbedingungen durch PAT10 S-acyliert

5.2.1 Durch Anwendung der neu etablierten Methoden wurde PAT10 als CBL2-S-acylierendes Enzym bestätigt

pat10 und auch die *cbl2/3* Pflanzen zeigen einen auffallenden zwergwüchsigen Phänotyp, Defekte in der Embryonalentwicklung und eine beeinträchtigte Funktion der Reproduktionsorgane

(Tang et al. 2012; Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013; Eckert et al. 2014). Die phänotypische Ähnlichkeit der *cb1/2/3* Doppelverlustmutante und der *pat10* Verlustmutante deutet darauf hin, dass die Proteine an den gleichen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Diese Ähnlichkeiten der *pat10* und *cb1/2/3* Pflanzen, zusammen mit der cytoplasmatischen Lokalisation des überexprimierten CBL2 Proteins in Protoplasten einer *Arabidopsis pat10* Funktionsverlustmutante führten zu der Annahme, dass PAT10 für die S-Acylierung und damit für die Tonoplastbindung des Calciumsensors verantwortlich ist (Zhou et al. 2013). Die cytoplasmatische CBL2 Lokalisation konnte auch durch Studien in epidermalen *A. thaliana pat10* Pflanzen während dieser Arbeit bestätigt werden. Sowohl bei starker Expression unter Kontrolle des Promotors pUBI10, als auch bei schwächerer Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors pCBL2, lokalisierte CBL2 in *A. thaliana pat10* Epidermiszellen cytoplasmatisch (Abb. 27 und 28). Die Ergebnisse der neu etablierten BOP/iBOP Assays und der Koexpressionen in Hefezellen haben PAT10 als CBL2-translozierendes Enzym zusätzlich verifiziert. Diese Translokationsfähigkeit ist abhängig von der Autoacylierungsfähigkeit des Enzyms, da ein PAT10 Protein mit mutiertem autoacylierbarem Cystein im DHHC Motiv (PAT10^{DHHA}), CBL2 nicht translozieren konnte. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit erstmals die Thioveresterung der CBL2 Cysteinreste durch das PAT10 Enzym biochemisch durch Anwendung des BiBOP Assay nachgewiesen. Die neu etablierten Methoden aus dieser Arbeit haben somit bestätigt, dass CBL2 durch PAT10 an N-terminalen Cysteinen S-acyliert wird und der Calciumsensor dadurch in der Vakuolenmembran verankert wird.

5.2.2 Neben PAT10 sind weitere PAT-Enzyme in der Lage CBL2 zu S-acylieren

In den durchgeführten BOP Assays *in planta* wurden neben PAT10 noch weitere PATs identifiziert, die eine Tonoplastbindung von CBL2 und CBL3 vermitteln konnten. Die CBL2-Translokationsfähigkeit ist auf die S-Acylierungsaktivität dieser Enzyme zurückzuführen, da die nicht-autoacylierbaren PAT^{DHHA} Proteine keine Membranbindung von CBL2 in Hefezellen vermitteln konnten. Durch den Einsatz des iBOP Assays wurden neben der PAT10, die PATs 02, 04, 05 und 06 als CBL2-S-acylierungsfähige Enzyme identifiziert. Die CBL2 Lokalisationsstudien in den *A. thaliana pat10* Funktionsverlustmutanten deuteten jedoch auf eine ausschließlich PAT10-vermittelte S-Acylierung des Calciumsensors hin. Eine mögliche Erklärung für mehrere CBL2-S-acylierungsfähige PATs ist die simultane heterologe Expression der Enzyme zusammen mit dem Substratprotein in Pflanzenzellen. Es muss berücksichtigt werden, dass die Proteine unter natürlichen Bedingungen möglicherweise in verschiedenen Zelltypen oder Geweben, in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder auch unter verschiedenen Umweltbedingungen exprimiert sein können. Es ist also denkbar, dass die in den BOP Assays funktionalen PAT-Substrat Paare in der Pflanze nie in räumliche Nähe gelangen. Durch eine solche räumliche oder zeitliche Trennung unterlagen die funktional teilweise überlappenden PATs möglicherweise

keinem Selektionsdruck hinsichtlich ihrer Substratspezifität und können somit im BOP Assay das gleiche Substrat S-acylieren (Kudla und Bock 2016).

Trotz der cytoplasmatischen Lokalisation von CBL2 in *pat10* Epidermiszellen, kann eine S-Acylierung der Calciumsensoren durch andere PATs in anderen Geweben oder unter bestimmten Stressbedingungen nicht ausgeschlossen werden. Die im BOP Assay als CBL2-translozierend identifizierte PAT02 wird vor allem in *Arabidopsis* Pollen exprimiert (Batistič 2012). Auch CBL2 zeigt eine erhöhte Expression in Pollen und wird für die korrekte Entwicklung der Vakuole in wachsenden Pollenschläuchen benötigt (Steinhorst et al. 2015). Die während dieser Arbeit durchgeführte Koexpression der PAT02 zusammen mit CBL2 in Tabak Pollenschläuchen hat gezeigt, dass das Enzym eine Verankerung des Calciumsensors in verschiedenen Membranen der Pollenschläuche vermitteln kann (Plasma- und Vakuolenmembran). Im Vergleich dazu verursachte die koexprimierte PAT10 eine Assoziation von CBL2 an einer Membran in Tabak Pollenschläuchen (Plasmamembran). Der Funktionsverlust des PAT10 Enzyms in *Arabidopsis pat10* Pflanzen löst Defekte in der Pollenkeimungsrate, sowie im Pollenschlauchwachstum aus (Zhou et al. 2013). Es ist also möglich, dass CBL2 in *Arabidopsis* Pollenschläuchen von beiden PATs S-acyliert werden kann und so verschiedene Membranen oder Membranbereiche während des Pollenschlauchwachstums erreicht. Ob die PAT02 als CBL2-S-acylierendes Enzym in Pollenschläuchen fungiert, sollte durch CBL2 Lokalisationsstudien in diesen Reproduktionsorganen von *pat02* Pflanzen, und vergleichend dazu auch in *pat10* Verlustmutanten und einer *pat02/pat10* Doppelmutante untersucht werden.

Neben der Gewebe-spezifischen wäre zudem eine Stress-induzierte oder auch eine Hormon-induzierte CBL2-S-Acylierung durch andere PATs als PAT10 denkbar. Die Expressionen der Gene *CBL2* und *PAT02* werden nach Zugabe des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) hochreguliert, im Gegensatz dazu ist die *PAT10* Genexpression nach ABA Zugabe leicht reduziert (Goda et al. 2008). Möglicherweise wird das Verhältnis der exprimierten PAT02- und PAT10-Mengen in einer Zelle durch ABA reguliert. Dadurch könnte ein Substrat je nach ABA-Konzentration durch verschiedene PATs S-acyliert und daraufhin an verschiedene Membranen oder Membransubdomänen gebunden werden. Eine CBL2 Lokalisationsstudie in einer *A. thaliana pat10* Mutante nach ABA Zugabe kann diesbezüglich zur genaueren Aufklärung beitragen.

5.3 Der C-Terminus ist für die Tonoplast-Lokalisation und die S-Acylierungsaktivität von PAT10 essentiell

Die verschiedenen *A. thaliana pat10* Mutanten zeigen starke Einschränkungen im Wachstum (Qi et al. 2013; Zhou et al. 2013). In den zwei von Qi und Kollegen charakterisierten *pat10* T-DNA Insertionslinien (*pat10.1* und *pat10.3*) befand sich die T-DNA jeweils nahe des 3'-Endes des *PAT10* Gens. Diese T-DNA Insertion führt dazu, dass in *pat10.1* und *pat10.3* noch verkürzte *PAT10* Transkripte vorhanden sind. Aus diesen Transkripten könnten wiederum Proteine synthetisiert werden, die noch die katalytisch essentielle DHHC-CRD Domäne der *PAT10*

enthalten (Qi et al. 2013). Im BOP Assay zeigten die verkürzten Proteine PAT10.1 und PAT10.3 jedoch keine CBL2-Translokationsaktivität mehr. Darüber hinaus wiesen PAT10.1 und PAT10.3 in Hefezellen keine generelle S-Acylierungsaktivität gegenüber dem nicht-selektiven S-Acylierungssubstrat Vac8p auf (Beckmann und Batistič, in Vorbereitung). PAT10.1 und PAT10.3 sind somit katalytisch inaktiv und die zwei *pat10* T-DNA Insertionslinien konnten experimentell als *pat10* Funktionsverlustmutanten bestätigt werden.

Die Ergebnisse des BOP Assay mit den verkürzten PAT10 Proteinen lieferten zudem Erkenntnisse zum Mechanismus der Tonoplast- und Golgi-Lokalisation von PAT10. In beiden verkürzten Proteinen fehlt der cytosolisch orientierte C-Terminus. Sowohl die längere PAT10.1 als auch die kürzere PAT10.3 sind *in planta* nicht Tonoplast-lokalisiert. Die Lokalisation in Golgi-Vesikeln ist bei dem etwas längeren PAT10.1 Transkript noch vorhanden und der C-Terminus ist damit für die Golgi-Lokalisation nicht notwendig. Der PAT10 C-Terminus ist demzufolge für die Lokalisation am Tonoplasten und für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell.

5.3.1 Die cytosolisch orientierten Domänen der PATs kooperieren und tragen so zur korrekten Lokalisation und katalytischen Aktivität der Enzyme bei

Der cytosolisch orientierte C-terminale Bereich von PAT10 wird für die korrekte Lokalisation und katalytische Aktivität des Enzyms benötigt. Ob der C-Terminus auch die substratspezifische S-Acylierung vermittelt, war jedoch unbekannt. Es stellte sich die Frage, ob die CBL2-S-Acylierungsaktivität von PAT10 auf eine PAT übertragen werden kann, die ursprünglich nicht in der Lage ist, CBL2 zu translozieren. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der PAT10 C-Terminus durch den C-Terminus in der zweiten Tonoplast-lokalisierten AtPAT11 substituiert. PAT11 weist im Gegensatz zu PAT10 keine CBL2-Translokationsaktivität auf. Die Substitutionen der C-Termini führten jedoch zu fehllokalisierten und katalytisch inaktiven Proteinen. Auch der Austausch des katalytischen Zentrums, also der DHHC-CRD Domäne, sowie der Austausch von DHHC-CRD und C-Terminus hat fehllokalisierte PAT Chimäre ergeben. Die Substitution von Domänen zwischen verschiedenen Enzymen führt oft zu einem Verbleib der chimären Proteine im ER, aufgrund fehlender ER Exportsignale oder Fehlfaltung der Proteine (Pedrazzini et al. 2013). So ist beispielsweise ein nicht-konserviertes Motiv im C-Terminus des Kaliumkanals TPK1 (*Two-pore-K⁺ channel 1*) für dessen Lokalisation an den Tonoplasten verantwortlich. Die Tonoplast-Lokalisation kann jedoch nicht auf den Plasmamembran-lokalisierten Kanal TPK4 durch Austausch der C-Termini übertragen werden und die chimären Proteine verbleiben im ER (Dunkel et al. 2008). Für die korrekte Lokalisation der pflanzlichen PATs ist der C-Terminus somit zwar essentiell, er muss aber offenbar im richtigen Sequenzkontext vorhanden sein, damit die Enzyme ihre Zielmembran erreichen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die cytosolisch orientierten Domänen der PATs miteinander kooperieren und so die korrekte Lokalisation und katalytische Aktivität der Enzyme vermitteln. Zusätzlich zur DHHC-CRD und den C-Termini

sollten demzufolge auch die N-terminalen Enden der beiden Tonoplast-lokaliserten PATs ausgetauscht und die CBL2-spezifische S-Acylierung der chimären Enzyme untersucht werden.

5.3.2 Die C-Termini der CBL2-translozierenden PATs unterscheiden sich durch zwei Motive von den C-Termini der nicht-CBL2-translozierenden PATs



Abb. 49: Sequenzvergleich der *A. thaliana* (At) und *S. cerevisiae* (Sc) PAT C-Termini im Bereich des NxTTxE Motivs. Die CBL2-S-acylierungsfähigen PATs 01 – 10 grenzen sich durch ein TNQ[S/T]T Motiv und ein davon stromabwärts gelegenes RY[Rx] Motiv (PAT01- 09) bzw. RRRR Motiv (PAT10) von den nicht-CBL2-S-acylierungsfähigen *Arabidopsis* PATs (11 – 24) und den 7 Hefe PATs ab. Die Aminosäuren werden mit dem Farbcode Zappo dargestellt (Rosa: hydrophobe AS [ILVAM], Pink: Prolin/Glycin, Rot: negativ geladene AS [ED] Gelb: Cystein, Grün: hydrophile AS [STNQ], Blau: positiv geladene AS [KRH], Orange: aromatische AS [FWY]).

Bei der Ermittlung funktionaler PAT-CBL2 Kombinationen wurden neben der PAT10 noch weitere PATs identifiziert, die in der Lage sind CBL2 zu S-acylieren. Interessanterweise gehören alle diese Enzyme der Untergruppe A an (PAT01 – 09 [Batistič 2012]). Da der C-Terminus als notwendige Domäne für die korrekte Lokalisation und katalytische Aktivität der PATs identifiziert wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Aminosäuresequenz-Alignment der PAT C-Termini *in silico* auf konservierte Bereiche innerhalb der CBL2-translozierenden PATs durchsucht. Im C-Terminus einiger *Arabidopsis* PATs befindet sich das sogenannte NxTTxE Motiv, über dessen Funktion bisher in den pflanzlichen PATs jedoch noch nichts bekannt ist (Batistič 2012). Im Bereich dieses Motivs fällt eine Variante in den CBL2-translozierenden PATs 01 - 10 auf, die hier ein TNQ[S/T]T Motiv besitzen (Abb. 49). Dieses Motiv ist in den AtPATs 11 – 24 und auch in den sieben Hefe PATs, welche CBL2 nicht erkennen und S-acylieren, nur verkürzt oder nicht vorhanden. Darüber hinaus besitzen die *Arabidopsis* PATs 01 – 10 einen Bereich aus basischen und aromatischen Aminosäuren, welcher vier Aminosäuren abwärts des TNQ[S/T]T Motiv gelegen ist. In PAT10 liegen hier vier stark basische Arginin Reste vor (RRRR), in den PATs 01 – 09 eine kurze Abfolge von Arginin-Tyrosin-Arginin RY[Rx]. Im C-Terminus der sieben Hefe PATs ist an dieser Position kein

derartiges Motiv zu finden. Die Hefe PAT Pfa3 weist hinter ihrem NQTT Motiv zwar die Aminosäuren RRYRR auf, diese liegen jedoch nicht exakt an derselben Position wie in den *Arabidopsis* PATs 01 - 10. Das chimäre PAT10^{11C.31AS} Protein, bei dem die erste C-terminale Hälfte mit dem TNQ[S/T]T und dem (RRRR) Motiv noch vorhanden war und die zweite C-terminale Hälfte durch die der PAT11 substituiert wurde, wies *in planta* noch die ursprüngliche Tonoplast- und Golgi-Lokalisation auf und zeigte im BOP Assay CBL2-Translokationsaktivität (Abb. 31). Dieses Ergebnis deutet zusätzlich auf die Bedeutung beider Motive im PAT10 C-Terminus für die korrekte Funktionsweise des Enzyms hin (Abb. 50). Eine mögliche Funktion des RRRR oder RY[Rx] Motivs bei der CBL2-S-Acylierung könnte eine Veränderung der chemischen Eigenschaften der Thiolgruppen S-acylierbarer Cysteine sein. Die Wahrscheinlichkeit einer S-Acylierung der Thiolgruppe eines Cysteins wird höher, je niedriger die Säurekonstante (pK_s) der Thiolgruppe ist. Diese wird sowohl intra- als auch intermolekular durch aromatische oder basische Aminosäurereste nahe des Cysteins gesenkt (Bizzozero et al. 2001; Hemsley und Grierson 2008). Basische oder aromatische Bereiche in Protein-S-Acyltransferasen können somit bei einer Interaktion mit dem Substratprotein die Säurekonstante der jeweiligen Cysteine des Substrats erniedrigen und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer S-Acylierung erhöhen (Dietrich und Ungermann 2004; Hemsley und Grierson 2008). Es ist also möglich, dass die Wahrscheinlichkeit einer S-Acylierung der CBL2 Cysteine stark erhöht wird, wenn die gerade erwähnten basischen oder aromatischen Aminosäuren in den C-Termini der PATs 01 – 10 in räumliche Nähe des CBL2 N-Terminus gelangen. Ob die beiden C-terminalen Motive in den PATs tatsächlich die S-

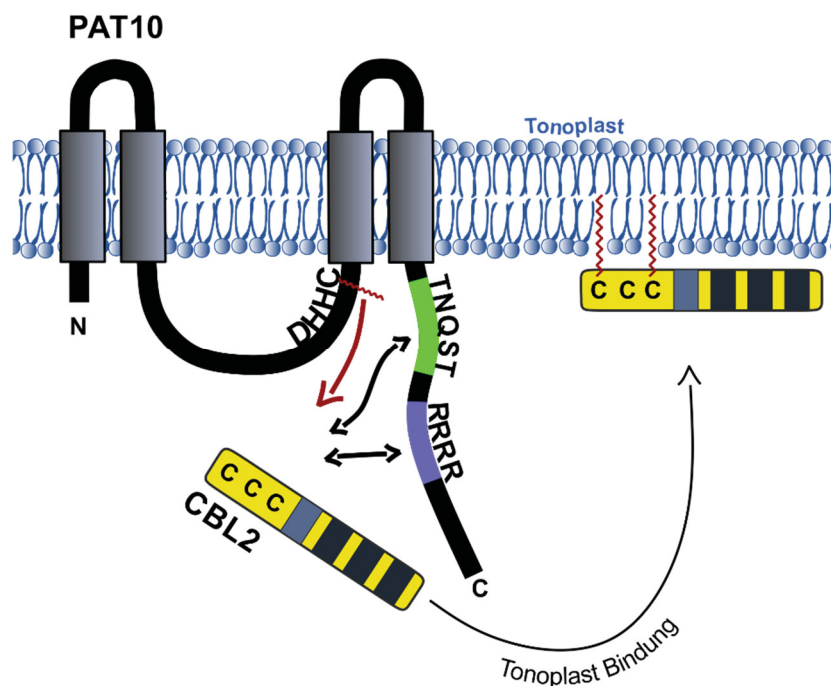


Abbildung 50: Zwei Motive im PAT10 C-Terminus sind potentiell entscheidend für die CBL2-S-Acylierungsaktivität. Das C-terminale TNQST und das RRRR Motiv der PAT10 vermitteln möglicherweise die CBL2-spezifische S-Acylierungsaktivität. PAT10 transferiert die Lipide bei der S-Acylierung vom Cystein der DHHC-CRD Domäne auf zwei der drei N-terminalen Cysteine von CBL2. Durch diese Lipidmodifikation wird der Calciumsensor im Tonoplasten verankert.

Acylierung von CBL2 beeinflussen, kann mit Hilfe des BOP Assay oder in Hefezellen untersucht werden. Es könnten Aminosäuresubstitutionen in diesen Bereichen der PATs vorgenommen und die CBL2-Translokationsaktivität in Hefezellen oder *in planta* untersucht werden.

5.4 Mitglieder der gleichen *Arabidopsis* PAT Subgruppe können das gleiche Substrat S-acylieren, unterscheiden sich jedoch in den Mechanismen der S-Acylierung

5.4.1 Pflanzliche PAT-Enzyme können teilweise das gleiche Substrat S-acylieren, zeigen aber Unterschiede in der Substraterkennung

Die sieben PAT-Enzyme der Hefe *S. cerevesiae* sind teilweise funktional überlappend (Hou et al. 2009). Die BOP Assays *in planta* und Koexpressionen von PAT-CBL2 Paaren in Hefezellen haben PAT10, sowie PAT10-verwandte Mitglieder der Subgruppe A als Enzyme mit CBL2-S-Acylierungsaktivität identifiziert. Dies zeigt, dass auch pflanzliche PATs teilweise das gleiche Substrat S-acylieren. Unterschiede in der Translokationsaktivität der PATs zeigten sich jedoch, wenn jeweils eins der drei S-Acylierungsstellen im CBL2 N-Terminus mutiert vorlag (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Verschiedene PATs zeigen Unterschiede in der CBL2-Translokationsaktivität. Hier wird die Aktivität der PATs 02, 04, 05, 06 und 10 gegenüber verschiedener CBL2 Versionen mit jeweils einem mutierten S-Acylierungsmotiv an den Positionen 4, 12 oder 18 (CBL2^{CAC}, CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC}) zusammengefasst. \hookrightarrow : die jeweilige PAT vermittelte eine Bindung von CBL2 an die Vakuolenmembran. **X**: die Koexpression der jeweiligen PAT verursachte keine Tonoplastbindung von CBL2.

	CBL2^{CAC}-S- Acylierungs- aktivität <i>in</i> <i>planta</i>	CBL2^{CCA}-S- Acylierungs- aktivität <i>in</i> <i>planta</i>	CBL2^{ACC}-S- Acylierungs- aktivität <i>in</i> <i>planta</i>
PAT02	X	X	X
PAT04	\hookrightarrow	X	\hookrightarrow
PAT05	\hookrightarrow	X	\hookrightarrow
PAT06	X	X	X
PAT10	\hookrightarrow	\hookrightarrow	\hookrightarrow

Möglicherweise sind die unterschiedlichen Translokationsaktivitäten auf Unterschiede in der Substraterkennung der PATs zurückzuführen. *In planta* erkannten die PATs 02 und 06 den Calciumsensor nur dann, wenn alle drei Cysteine im CBL2 N-Terminus vorhanden waren. Für die CBL2-Translokation durch die PATs 04, 05 und 10 waren zwei Cysteine ausreichend. Dabei musste das dritte Cystein an Position 18 im CBL2 N-Terminus vorhanden sein, damit eine Tonoplastbindung des Proteins durch die PATs 04 und 05 vermittelt werden konnte. Für die Translokation durch die PAT10 spielte es keine Rolle, welche zwei Cysteine in CBL2 vorhanden

waren. Diese Daten sprechen dafür, dass die verschiedenen PATs ihr Substrat anhand verschieden vieler S-Acylierungsstellen erkennen. Darüber hinaus ist auch die Position dieser S-Acylierungsstellen für die Erkennung durch die PATs essentiell. Ob die verschiedenen PATs an unterschiedlich vielen Cysteinen S-acylieren, oder ob mehrere Cysteine für die Erkennung nötig sind, schließlich aber nur ein Cystein lipidmodifiziert wird, ist noch nicht geklärt. Das kann zukünftig durch Kombination des BiBOP Assays mit anschließender massenspektrometrischer Analyse des biotinylierten Substrats untersucht werden (Hemsley et al. 2013). Im BOP Assay wird das Substrat zuerst durch die jeweilige koexprimierte PAT *in planta* an Cysteinen S-acyliert. Im Anschluss werden die S-Acylgruppen der lipidmodifizierten Cysteine durch Anwendung der *Biotin Switch* Methode durch Biotin ausgetauscht. Nach anschließender Durchführung der Massenspektrometrie der biotinylierten Proteine könnten anschließend Aussagen darüber getroffen werden, welche Cysteine durch welche PAT S-acyliert wurden.

5.4.2 PATs zeigen unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit dem gleichen Substrat

PAT10 war im Gegensatz zu PAT02, 04, 05 und 06 in der Lage, die Tonoplastbindung der drei mutierten Proteine CBL2^{CAC}, CBL2^{CCA} und CBL2^{ACC} zu vermitteln. Möglicherweise deuten diese Ergebnisse auf unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und den verschiedenen PATs hin. In dem Fall zeigt PAT10 im Vergleich zu den anderen PATs die stärkste Wechselwirkung mit dem Substrat CBL2. Diese Theorie wird ebenfalls durch die Ergebnisse der PAT-CBL2 Koexpressionen in Tabak Pollenschläuchen unterstützt. Dort zeigte CBL2 unterschiedliche Lokalisationen, abhängig von der koexprimierten PAT. Ohne koexprimiertes Enzym war CBL2 teilweise am Tonoplasten, an der Plasmamembran der Pollenschlauchspitze, aber größtenteils im Cytoplasma lokalisiert. Wurde die PAT02 koexprimiert, assoziierte CBL2 verstärkt mit der Plasmamembran und den tubulären Strukturen des Tonoplasten. Die cytoplasmatische Verteilung des Calciumsensors wurde hier vermutlich aufgrund der verstärkten Lipidmodifikation durch die PAT-Überexpression nicht mehr beobachtet. Bei Koexpression von PAT10 lokalisierte CBL2 hingegen ausschließlich an der Plasmamembran der Pollenschläuche. Ungeachtet der Fehllokalisierung von PAT10 an der Plasmamembran der Tabak Pollenschläuche, wurde der Calciumsensor vollständig an die Membran des Enzyms rekrutiert. Die möglicherweise schwächere PAT02-CBL2 Wechselwirkung kann dazu geführt haben, dass der Calciumsensor nach S-Acylierung an der Plasmamembran zusätzlich in anderen Membranen im Pollenschlauch verankert wurde. Ob die unterschiedlich starken Substrataffinitäten der PATs dadurch entstehen, dass CBL2 in der Pflanze spezifisch durch PAT10 S-acyliert wird und die S-Acylierung durch PAT02 nur unspezifisch bei Überexpression auftritt, ist nicht bekannt. Wird CBL2 jedoch tatsächlich durch PAT02 und PAT10 in *A. thaliana* S-acyliert, können durch die verschiedenen Substrataffinitäten verschiedene Substrat-Targetingmechanismen entstehen. So können einige Substrate aufgrund starker Wechselwirkungen mit der jeweiligen PAT aus dem Cytosol an die Zielmembran des Enzyms rekrutiert werden. Oder sie werden alternativ durch PAT-Enzyme an

deren Membranen S-acyliert, können anschließend aber über ihren Lipidanker mit verschiedenen Zielmembranen in der Zelle assoziiert werden.

Wie bereits beschrieben kann PAT02 den Calciumsensor nur dann translozieren, wenn alle drei Cysteine im N-Terminus vorhanden sind. Die Bindungen an unterschiedliche Membranen in den Pollenschläuchen kann also auch dadurch erklärt werden, dass die PATs unterschiedlich viele Cysteine S-acylieren. Mögliche strukturelle Unterschiede aufgrund der S-Acylierung an zwei oder drei Cysteinresten, könnten eine Bindung an unterschiedliche Membranen oder Membransubdomänen verursachen.

Es können also mehrere pflanzliche PATs das gleiche Substrat S-acylieren, zeigen dabei jedoch Unterschiede in der Substraterkennung und in der Stärke der Substratwechselwirkung. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die PATs nicht vollständig funktional überlappend sind und unter ihnen Spezifität entstanden ist. Durch diese Spezifität kann verhindert werden, dass Substratproteine nicht-selektiv durch verschiedene PATs S-acyliert werden, die in Fehllokalisationen der Substrate resultieren würden.

5.5 Der S-Acyltransfer auf ein Cystein kann durch angrenzende aromatische oder basische Aminosäuren und durch hydrophobe Motive beeinflusst werden

Die beiden Calciumsensoren CBL2 und CBL3 besitzen drei identisch positionierte S-Acylierungsstellen in ihren N-Termini. Darüber hinaus wurden CBL2 und CBL3 durch PAT10, sowie durch Mitglieder der PAT Subgruppe A dieser Enzymfamilie transloziert. Im BOP Assay *in planta* wurde CBL3 allerdings durch die Koexpression von zehn der 24 PATs in Membranen verankert, während CBL2 durch acht PATs transloziert wurde. Außerdem wurde CBL3 im Vergleich zu CBL2 in einer größeren Anzahl an Hefezellen in Membranen verankert. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf verschiedene Aminosäuren zurückzuführen, die nahe der S-acylierbaren Cysteinreste in den CBL2/3 N-Termini positioniert sind. Wie bereits beschrieben, senken benachbarte basische oder aromatische Aminosäuren intramolekular die Säurekonstante der Thiolgruppe eines Cysteins. Dadurch erhöht sich das Potential einer Thiolatbildung und damit auch die Wahrscheinlichkeit einer S-Acylierung an diesem Cystein (Bizzozero et al. 2001; Dietrich und Ungermann 2004). Laut dieser Theorie ist das Potential einer Thiolatbildung des Cys18 in CBL2 und CBL3 höher als das der zwei anderen Cysteine, da an das Cys18 stromabwärts ein aromatisches Phenylalanin angrenzt. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass CBL2 nicht mehr mit dem Tonoplasten assoziiert, wenn dieses Phe19 mutiert war (Abb. 41). Stromaufwärts angrenzend an das Cys18 in CBL3 liegen die stark basische Aminosäure Arginin und zwei aromatische Phenylalaninreste (Phe₁₅-Phe₁₆-Arg₁₇-Cys₁₈). In CBL2 liegen an diesen Positionen die neutralen und nicht-aromatischen Aminosäuren Glycin, Leucin und Valin (Val₁₅-Leu₁₆-Gly₁₇-Cys₁₈). Durch die basischen und aromatischen Aminosäuren ist das Potential einer Thiolatbildung des Cys18 in CBL3 im Vergleich zum Cys18 in CBL2 möglicherweise höher. Dadurch ist wiederum die Wahrscheinlichkeit des Fettsäuretransfers auf das Cys18 in CBL3 höher als beim

Cys18 in CBL2. Möglicherweise korrelieren diese Unterschiede mit den Funktionen der beiden Calciumsensoren. Auch wenn CBL2 und CBL3 teilweise funktional redundant sind, weisen beide Proteine dennoch unter bestimmten Bedingungen spezifische Funktionen auf (Batistič et al. 2012; Tang et al. 2012; Eckert et al. 2014; Tang et al. 2015). Für diese spezifischen Funktionen könnte es im Fall von CBL2 bedeutend sein, dass der Calciumsensor aufgrund des, im Vergleich zu CBL3 niedrigeren Potentials einer Thiolatbildung an Cys18, nach der Translation länger im Cytoplasma verbleibt als CBL3. Für die korrekte Funktion von CBL3 könnte es hingegen essentiell sein, dass das Protein nach der Translation schneller im Tonoplasten verankert wird. CBLs bilden zusammen mit den CIPKs Interaktionskomplexe, die an der Wahrnehmung und Weiterleitung von Calciumsignalen beteiligt sind (Kudla et al. 1999; Kolukisaoglu et al. 2004; Batistič und Kudla 2009; Batistič et al. 2010). Durch den hier postulierten längeren cytoplasmatischen Aufenthalt von CBL2, könnte eine CBL2-CIPK Interaktion schon im Cytoplasma stattfinden und eine anschließende, durch S-Acylierung vermittelte Translokation des Interaktionskomplexes zum Tonoplasten ermöglicht werden. Da CBL3 schneller mit der Vakuolenmembran assoziiert wird, werden die spezifisch interagierenden CIPKs möglicherweise durch den Calciumsensor aus dem Cytoplasma direkt an den Tonoplasten rekrutiert. Durch Interaktion mit denselben CIPKs und durch Regulation identischer Zielproteine durch diese CBL2/3-Interaktionskomplexe, wären die funktionalen Redundanzen der beiden Calciumsensoren zu erklären. Die spezifischen Funktionen von CBL2 und CBL3 können dadurch zustande kommen, dass die Proteine spezifisch mit unterschiedlichen CIPKs Interaktionskomplexe bilden und dadurch unterschiedliche Zielproteine an der Vakuolenmembran regulieren. Eine weitere Erklärung für die spezifischen Funktionen von CBL2 und CBL3 kann eine Verankerung in verschiedenen Subdomänen des Tonoplasten sein, die durch strukturelle Unterschiede in den N-

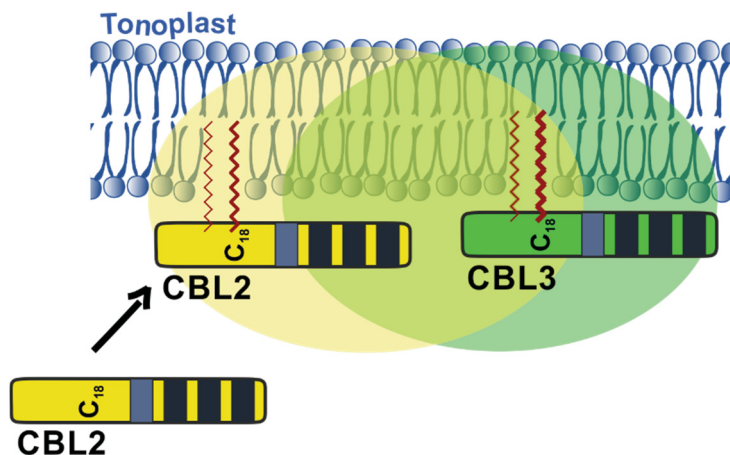


Abbildung 51: Modell einer möglichen Korrelation zwischen unterschiedlich hohem Potential einer S-Acylierung an Cys18 und der spezifischen Funktionen von CBL2 und CBL3. Die beiden Tonoplast-lokalisierten Calciumsensoren CBL2 und CBL3 sind teilweise funktional redundant, weisen jedoch auch spezifische Funktionen auf (dargestellt durch gelben und grünen Hintergrund). Das für die Tonoplastbindung essentielle Cys18 (C₁₈) weist in CBL2 im Vergleich zum Cys18 in CBL3 ein niedrigeres Potential einer Thiolatbildung auf. Das führt dazu, dass CBL2 an Cys18 im Vergleich zu CBL3 weniger wahrscheinlich S-acyliert wird. Dadurch hält sich CBL2 im Vergleich zu CBL3 nach der Translation möglicherweise länger im Cytoplasma auf (dargestellt durch nicht-acyliertes CBL2 im Cytoplasma).

Termini der beiden Calciumsensoren verursacht werden könnten. Dies hätte eine Regulation von Subdomänen-spezifischen Zielproteinen zur Folge.

Um die Korrelation zwischen unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit eines Lipidtransfers auf Cys18 und der Funktion von CBL2 und CBL3 zu untersuchen, können die Aminosäuren Phe₁₅-Phe₁₆-Arg₁₇-Cys₁₈ aus CBL3 durch die jeweiligen Aminosäuren in CBL2 substituiert und das Konstrukt in die *cb13* Einzelmutante transformiert werden. Kann das daraus entstehende Protein die Funktion von CBL3 übernehmen, sollte der K⁺-Mangel tolerante Phänotyp der *cb13* Einzelmutante durch das mutierte CBL2 Protein komplementiert werden und die Pflanzen wie Wildtyp-Pflanzen bei K⁺-Mangel chlorotische Blätter aufweisen (Liu et al. 2013).

5.5.1 CBL6 kann nicht-selektiv durch PATs aus allen phylogenetischen Subgruppen dieser Enzymfamilie transloziert werden

Der Calciumsensor CBL6 besitzt wie CBL2 und -3 drei Cysteinreste im N-Terminus und wird durch PAT10 in der Vakuolenmembran verankert (Batistič et al. 2012; Zhou et al. 2013). Über den Mechanismus der S-Acylierung von CBL6 war bisher noch nicht viel bekannt und wurde daher in dieser Arbeit untersucht. Anders als CBL2 und CBL3 assoziierte CBL6 auch bei Zugabe hoher Konzentrationen des S-Acylierungsinhibitors 2-Br stabil im Tonoplasten (Abb. 38). Zudem wurde CBL6 im Gegensatz zu CBL2 und CBL3 durch endogene Hefe PATs erkannt und S-acyliert, sowie durch insgesamt 18 der 24 AtPATs an Hefezellmembranen transloziert. CBL2 wurde im Vergleich dazu durch Koexpression von nur zehn PATs mit Hefezellmembranen assoziiert. Je nach Substrat S-acylieren die PAT-Enzyme somit möglicherweise unterschiedlich selektiv. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur die ersten 23 Aminosäuren von CBL6 mit dem yeGFP fusioniert und in Hefezellen zusammen mit den AtPATs koexprimiert wurden. Es ist jedoch möglich, dass der N-Terminus im Vergleich zum vollständigen CBL6 Protein, weniger selektiv durch eine größere Anzahl an PATs S-acyliert wird. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist die sogenannte SH4 Domäne (*Src [Sarcoma] homology 4*) des vakuolären Hefe Proteins Vac8p. Diese Domäne wird durch fünf der sieben Hefe PAT-Enzyme S-acyliert. Das vollständige Protein wird jedoch am stärksten durch die Hefe PAT Pfa3p lipidmodifiziert und die Bindung von Vac8p an die Vakuolenmembran ist reduziert, wenn *Pfa3* deletiert wurde (Hou et al. 2009; Nadolski und Linder 2009). Es ist also denkbar, dass eine selektive PAT-Erkennung durch andere Motive außerhalb des CBL6 N-Terminus' determiniert wird und das vollständige CBL6 Protein durch eine geringere Anzahl an PATs transloziert werden kann. Aus diesem Grund wäre eine Koexpression des vollständigen CBL6 Proteins zusammen mit den 24 *Arabidopsis* PATs in der Hefe *pat* Sechsfachmutante interessant.

Die 18 CBL6-S-acylierungsfähigen PATs stammen aus allen Subgruppen der *A. thaliana* PAT-Enzymfamilie. Darüber hinaus waren auch eine oder mehrere PATs aus *S. cerevisiae* fähig, CBL6 zu erkennen und eine Membranbindung des Proteins zu vermitteln. Die funktionale Redundanz ist somit nicht unbedingt auf eine phylogenetische Untergruppe begrenzt, sondern umfasst die

vollständige *A. thaliana* PAT-Enzymfamilie und teilweise die PAT-Enzymfamilie aus *S. cerevisiae*. Das stellt eine Herausforderung für die Identifikation von physiologisch relevanten funktionalen PAT-CBL6 Kombinationen dar. Ob CBL6 in *A. thaliana* tatsächlich durch verschiedene PATs S-acyliert werden kann, bleibt unbeantwortet. Ähnlich wie bei CBL2 wäre eine S-Acylierung durch verschiedene PATs unter bestimmten Stressbedingungen oder in anderen Zell- oder Gewebetypen möglich. Darüber hinaus könnte CBL6 durch S-Acylierung verschiedener PATs mit unterschiedlichen Subdomänen des Tonoplasten assoziiert werden und dort verschiedene Funktionen übernehmen.

5.5.2 CBL6 weist im Vergleich zu CBL2 und CBL3 ein hydrophobes Motiv im N-Terminus auf, welches die PAT-vermittelte Tonoplastbindung beeinflussen kann

CBL6 kann durch ein breiteres Spektrum von PAT-Enzymen transloziert werden als die beiden Calciumsensoren CBL2 und CBL3. Darüber hinaus sind die S-Acylierungsstellen in CBL6 anders positioniert als in CBL2 und CBL3. Aufgrund dieser Unterschiede wurde der Einfluss der Cysteinpositionen auf die Anzahl translozierender PATs untersucht. Das CBL2 Protein mit den CBL6-positionierten Cysteinen wurde *in planta* jedoch nicht an den Tonoplasten gebunden. In diesem Protein war das Phe19 mutiert, welches wie bereits erwähnt essentiell für die S-Acylierung des Cys18 ist (Abb. 41). Umgekehrt wurde das CBL6 Protein mit CBL2-angeordneten Cysteinen stabil und 2-Br-insensitiv im Tonoplasten verankert. Die Position der Cysteine hatte somit unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen sichtbaren Einfluss auf die Stabilität der Membranbindung der Proteine. Somit werden die starke Tonoplastbindung von CBL6 und das breite Spektrum an CBL6-S-acylierungsfähigen PATs wahrscheinlich durch andere Motive und nicht direkt durch die Position der Cysteine determiniert.

CBL6 kann auch dann im Tonoplasten verankert werden, wenn zwei der drei Cysteine mutiert sind (CBL6^{CAA} und CBL6^{AAC} [C. Zhang, persönliche Mitteilung]). Im Gegensatz dazu müssen in CBL2 mindestens zwei Cysteinreste vorhanden sein, damit der Calciumsensor an die Vakuolenmembran gebunden werden kann. Die Tonoplastbindung von CBL2 wird also möglicherweise durch eine S-Acylierung an zwei Cysteinen vermittelt. Diesbezüglich besteht die Möglichkeit, dass einige PATs nur ein Cystein lipidmodifizieren, andere jedoch zwei oder mehr Cysteinreste eines Substrats S-acylieren. In diesem Fall könnte CBL2 zwar durch die gleichen PATs erkannt werden wie CBL6, es käme jedoch nicht in jedem Fall zu einer Membranbindung des Calciumsensors.

Es stellte sich die Frage, warum die S-Acylierung an einem Cystein für eine Tonoplastbindung von CBL6 ausreichend ist, bei CBL2 jedoch nicht. Eine Besonderheit im CBL6 N-Terminus ist hydrophobes Motiv aus den sechs Aminosäuren Leu-Ala-Leu-Iso-Leu-Leu (LALILL) an den Positionen 12 – 17 (Abb. 37). Eine S-Acylierung tritt häufig nahe hydrophober Bereiche auf (Bijlmakers und Marsh 2003). Zusätzlich könnten hydrophobe Aminosäuren mit dem hydrophoben Bereich der Lipiddoppelschicht wechselwirken und so eine Membranbindung des

Proteins verstärken. Das hydrophobe Motiv im CBL6 N-Terminus kann also zwei Funktionen übernehmen, indem es erstens den Lipidtransfer auf die Cysteine im CBL6 N-Terminus positiv beeinflusst. Zweitens kann es in Kombination mit einem S-acylierten Cystein die starke Membranbindung des Calciumsensors vermitteln. Interessant wäre diesbezüglich die Untersuchung eines CBL6 Proteins, bei dem die sechs hydrophoben Aminosäuren durch die Aminosäuren der entsprechenden Positionen aus CBL2 substituiert werden, und umgekehrt. Möglicherweise wird das mutierte CBL6 Protein dadurch weniger stabil im Tonoplasten verankert oder auch nicht mehr durch ein so breites Spektrum an PATs lipidmodifiziert. Ein Komplementationsversuch möglicher Phänotypen einer *A. thaliana cbl6* Mutante mit einer solchen mutierten CBL6 Variante, könnte Hinweise darauf liefern, ob die stabile Tonoplastbindung für die korrekte Funktion von CBL6 notwendig ist.

Die beobachteten Unterschiede zwischen CBL2 und CBL6 beruhen zusammenfassend nicht einfach auf der Anordnung der Cysteine in den N-Termini, sondern es sind vielmehr die umgebenden Aminosäuren, die eine S-Acylierung an den Cysteinen begünstigen oder möglicherweise auch die Erkennung durch die PAT-Enzyme vermitteln.

5.6 Der CBL2 N-Terminus bildet eine amphipathische Helix, die eine S-Acylierung begünstigt und dadurch die Tonoplastbindung beeinflusst

Der Calciumsensor CBL2 stellt ein ungewöhnliches S-Acylierungssubstrat dar, da das Protein keine Transmembrandomäne besitzt und auch keine anderen zusätzlichen Lipidmodifikationsmotive aufweist. Die drei S-Acylierungsstellen liegen allerdings auf der hydrophoben Seite einer potentiellen amphipathischen Helix (AH [O. Batistič, unveröffentlichte Daten]). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass diese amphipathische Struktur eine S-Acylierung begünstigt. Tatsächlich assoziierte CBL2 nicht mehr mit dem Tonoplasten, wenn die AH durch Einfügen der helixbrechenden Aminosäure Prolin zerstört wurde. Die Ergebnisse eines *Biotin Switch Assay* zeigten jedoch überraschenderweise, dass CBL2^{T13P} trotz zerstörter AH S-acyliert vorlag (Abb. 35). Eine Protein-S-Acylierung in einer AH wurde bisher nicht beschrieben und die hier erstmalig gezeigte S-Acylierung in der AH im CBL2 N-Terminus stellt somit eine Besonderheit dar.

Die Daten mit dem CBL2^{T13P} Protein zeigen, dass eine Kombination aus S-Acylierung und dem Vorhandensein einer AH für eine durch endogene Tabak PATs-vermittelte Membranassoziation von CBL2 notwendig ist. Möglicherweise wird CBL2^{T13P} bei Expression in *N. benthamiana* durch endogene Enzyme an nur einem Cystein S-acyliert und kann somit nicht mehr in der Vakuolenmembran verankert werden. In dem Fall wäre das Cys18 S-acyliert, da dieses Cystein, wie bereits beschrieben, das größte Potential einer Thiolatbildung aufweist und damit im Vergleich zu Cys4 und Cys12 am wahrscheinlichsten eine Thioesterbindung mit der S-Acylgruppe eingehen kann. Die Koexpression der CBL2-S-acylierungsfähigen PATs 02, 04, 05, 06 und 10 führte jedoch trotz zerstörter amphipathischer Struktur zu einer Tonoplastbindung von

CBL2^{T13P}. Durch die erhöhte Konzentration eines CBL2-funktionalen PAT-Enzyms kann somit die Wahrscheinlichkeit einer S-Acylierung am Cys4 in CBL2^{T13P} wieder erhöht und eine Tonoplastbindung des Proteins vermittelt werden (Abb. 36). Wurde der S-Acylierungsinhibitor 2-Br appliziert und dadurch die Konzentration an katalytisch aktivem PAT10 Protein in der Zelle gesenkt, assoziierte CBL2^{T13P} nicht mehr mit der Vakuolenmembran. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die S-Acylierung eines Proteins durch das Vorhandensein einer AH begünstigt werden kann.

Zusätzlich bestimmt die Kombination aus AH und S-Acylierung möglicherweise die spezifische Bindung des CBL2 Proteins an den Tonoplasten. AHs können die Bindung von Proteinen an bestimmte Membranen vermitteln. So bindet das Golgi-assoziierte Protein ArfGAP1 (*ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1*) über eine AH mit einem sogenannten ALPS Motiv (*amphipathic lipid packing sensor*) vor allem an gekrümmte Membranen (Bigay et al. 2005; Drin et al. 2007; Bigay und Antony 2012). Die besonderen Merkmale der AH im CBL2 N-Terminus sind die neutrale Nettoladung und die Position der S-Acylierungsmotive auf der hydrophoben Seite der Helix. Die hydrophobe Seite einer AH lagert sich in die hydrophoben Acylgruppen der Membranlipide ein, die polare Seite der Helix richtet sich jedoch zu den polaren Kopfgruppen der Membranlipide. So entsteht eine parallel zur Membranfläche orientierte Einlagerung dieser α -Helix (Drin und Antony 2010). Es ist möglich, dass die Bindung der Fettsäure Stearat oder Palmitat bei der S-Acylierung im hydrophoben Bereich durch die langen Acylgruppen eine Strukturänderung der AH von CBL2 auslöst und das Protein somit eher an Membranen mit geringer Krümmung, also an den Tonoplasten bindet. Die S-Acylierung unterschiedlich vieler Cysteine im Substrat könnte zusätzlich eine strukturelle Veränderung der AH verursachen. Bereits beschriebene Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten darauf hin, dass PAT02 im Gegensatz zu PAT10 alle drei Cysteine im CBL2 N-Terminus S-acyliert. Diese mögliche dreifache S-Acylierung könnte eine strukturelle Veränderung der AH auslösen, wodurch der Calciumsensor schließlich mit anderen Membranen oder Membranbereichen assoziiert wird. So bindet CBL2 bei Koexpression von PAT02 in Pollenschläuchen beispielsweise an den tubulären Strukturen des Tonoplasten, die eine starke Krümmung aufweisen. Im Gegensatz dazu wird CBL2 durch PAT10 möglicherweise an nur zwei Cysteinen S-acyliert und kann aufgrund der daraus resultierenden Struktur der AH nur in nicht-gekrümmten Membranen wie der Plasmamembran in den Pollenschläuchen verankert werden.

5.6.1 CBL2 wird durch PATs, die selbst nicht am Tonoplasten lokalisiert sind, S-acyliert und in der Vakuolenmembran verankert

Eine interessante Beobachtung während der durchgeführten BOP Assays war, dass CBL2 auch durch koexprimierte PATs im Tonoplasten verankert wurde, die selbst nicht in der Vakuolenmembran lokalisiert sind. So vermittelten beispielsweise die Plasmamembran-lokalisierten PATs 04, 05 und 06 eine Tonoplastbindung von CBL2. Warum der Calciumsensor

dabei nicht ebenfalls mit der Plasmamembran assoziierte, ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung hierfür können die unterschiedlichen Ladungen in Plasmamembran und Tonoplast sein. Die Ladung von Membranen wird durch die Phospholipide beeinflusst. Diese Lipide bringen negative Ladungen in die jeweiligen Membranbereiche ein und sorgen so dafür, dass positiv geladene Proteine an diese Membranbereiche binden (Yeung und Grinstein 2007; Magalhaes und Glogauer 2010). So können beispielsweise negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) Proteine mit polybasischen Domänen an die Plasmamembran rekrutieren (Heo et al. 2006). Die Plasmamembran und der Tonoplast unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Phospholipide (Yoshida und Uemura 1986). So sind in verschiedenen Membranen von epidermalen *Arabidopsis* Wurzelzellen verschiedene Phospholipid Konzentrationen vorhanden. In der Plasmamembran sind vor allem Phosphatidylinositol 4, 5 Bisphosphat (PI4,5P₂) und Phosphatidylinositol 4 Phosphat (PI4P) hoch konzentriert, während im Tonoplasten Phosphatidylinositol 3 Phosphat (PI3P) in nur geringer Konzentration vorliegt (Simon et al. 2014). Verschiedene Mitglieder der CBL Proteinfamilie zeigen Unterschiede in der Ladung ihrer Lokalisation-vermittelnden N-Termini. Die Tonoplast-lokalisierten CBLs 2, 3 und 6 weisen eine neutrale Nettoladung an ihren N-Termini auf. Die N-terminalen Bereiche der Plasmamembran-lokalisierten CBLs 1, 4, 5 und 9 sind im Gegensatz dazu durch basische Aminosäuren eher positiv geladen. Möglicherweise binden die Plasmamembran-lokalisierten CBLs an negativ geladene Bereiche der Plasmamembran. Der Plasmamembran-lokalisierte Calciumsensor CBL4 kann beispielsweise, vermutlich aufgrund einer N-terminalen polybasischen Domäne (KKKKK) auch noch an die Plasmamembran binden, wenn das N-Myristylierungsmotiv mutiert ist und CBL4 somit nicht lipidmodifiziert wird (Ishitani et al. 2000; Batistič et al. 2008). Die CBLs 2, 3 und 6 binden möglicherweise aufgrund ihrer neutralen Nettoladung bevorzugt am Tonoplasten.

Bei Koexpression einer CBL2-translozierenden Plasmamembran-lokalisierten PAT im BOP Assay wird CBL2 eventuell zuerst an die Plasmamembran rekrutiert und dort S-acyliert. Da CBL2 jedoch nicht mit der Plasmamembran assoziiert, wird das Protein nach der S-Acylierung an der PM an den Tonoplasten transportiert. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das S-acylierte CBL2 im BOP Assay nach der S-Acylierung durch PAT04, 05 oder 06 an der Plasmamembran in Vesikel verpackt und anschließend an den Tonoplasten transportiert wird. Ein Protein, für das ein vergleichbarer Transportweg beschrieben wurde, ist die *Arabidopsis* Rab GTPase Ara6. Ara6 wird durch eine duale Lipidmodifikation zunächst an die Plasmamembran gebunden, assoziiert von dort aus aber zusätzlich mit Endosomen, die schließlich zu späten Endosomen des prävakuolären Kompartiments der Pflanzenzellen fusionieren (Ueda et al. 2001; Ueda et al. 2004). Ein möglicher Vesikeltransportweg von der Plasmamembran zum Tonoplasten ist somit vorhanden. Um den potentiellen Vesikeltransportweg von CBL2 im BOP Assay zu untersuchen, kann die Methode mit einer Plasmamembran-lokalisierten PAT und CBL2 in Kombination mit dem

Inhibitor Wortmannin durchgeführt werden. Wortmannin inhibiert Phosphatidylinositol (PI) Kinasen. Diese Kinasen produzieren Phosphatidylinositol Phosphat (PIP), welches wiederum PIP-bindende Proteine an Membranen rekrutiert und dadurch Membranfusionen und Transportprozesse in der Zelle reguliert. Durch Inhibition der PI-Kinasen werden endozytotische Prozesse und Transportprozesse zwischen trans-Golgi-Netzwerk und Vakuole verhindert (Matsuoka et al. 1995; Emans 2002; Batistič et al. 2012; Takáč et al. 2012). Erreicht CBL2 durch die Koexpression von beispielsweise PAT04 und in Anwesenheit des S-Acylierungsinhibitors und des Inhibitors Wortmannin den Tonoplasten nicht mehr, würde dies auf einen durch Vesikelverkehr vermittelten Transport von der Plasmamembran zum Tonoplasten hindeuten. Zusätzlich könnten diese Analysen auch in einer *Arabidopsis pat10* Mutante durchgeführt werden, um die simultane Verwendung zweier Inhibitoren zu vermeiden und damit cytotoxische Effekte zu verringern.

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich Plasmamembran- und Tonoplast-lokalisierte CBLs in der Nettoladung ihrer N-Termini. Um den Einfluss der neutralen Nettoladung auf die spezifische Tonoplastbindung von CBL2 zu untersuchen, wäre das Einfügen positiv geladener basischer Aminosäuren in den N-Terminus des Calciumsensors interessant. Eventuell wird durch die positive Ladung eine Plasmamembranbindung ermöglicht.

Wichtige Komponenten beim Targeting der CBLs zu ihren Zielmembranen sind also unterschiedlich verteilte Membranladungen innerhalb einer Zelle. So determiniert die neutrale Nettoladung der S-acylierten CBLs 2, 3 und 6 möglicherweise das Targeting der Proteine an den Tonoplasten. Im Fall der CBLs könnte so verhindert werden, dass die Proteine nach der S-Acylierung unspezifisch mit verschiedenen Membranen in der Zelle assoziieren. Wie bereits erläutert wurde ist noch unklar, ob CBL2 in *A. thaliana* tatsächlich durch verschiedene PATs S-acyliert wird. Sollte dies der Fall sein deuten die Daten darauf hin, dass der Ort der S-Acylierung eines Proteins und die Zielmembran dieses S-acylierten Proteins nicht unbedingt übereinstimmen müssen. In Pflanzenzellen könnten somit verschiedene durch S-Acylierung vermittelte Proteintargeting-Mechanismen existieren. Einige Substrate umgehen den Vesikelverkehr und werden durch PATs aus dem Cytosol an eine bestimmte Membran rekrutiert, dort S-acyliert und auch dort mit der Membran assoziiert. Andere Substrate werden durch PATs an deren Membran S-acyliert, werden anschließend aber an eine andere Zielmembran transportiert. Letzterer Targeting-Mechanismus wurde bereits in Säugetierzellen beschrieben. Dort erfolgt die Protein-S-Acylierung größtenteils am Golgi. Periphere Proteine können dort S-acyliert werden, verbleiben aber nicht am Ort der S-Acylierung, sondern gelangen über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran (Rocks et al. 2010).

5.7 HIR Proteine werden mittels Protein-S-Acylierung durch PAT-Enzyme an Membranen gebunden

5.7.1 Die Plasmamembranbindung von HIR1 und HIR2 wird durch verschiedene Lipidmodifikationen vermittelt

Die pflanzliche hypersensitive Reaktion als Antwort auf Pathogenbefall geht mit der Bildung von Nekrosen einher, die die Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze verhindern sollen (Klement und Goodman 1967). Während der hypersensitiven Reaktion in *A. thaliana* wird die Transkription einiger Vertreter der HIR (*hypersensitive induced reaction*) Genfamilie in diesen entstehenden nekrotischen Zellen induziert (Nadimpalli et al. 2000; Qi et al. 2011). Hemsley et al. konnten die S-Acylierung von zwei der vier HIR Proteine (HIR1 und HIR2) bereits nachweisen (Hemsley et al. 2013). HIR1 und HIR2 liegen unter anderem mit dem Resistenzprotein RPS2 (*RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 2*) und dem ebenfalls S-acylierten Protein RIN4 (RPM2 [*resistance to P. syringae* pv. *Maculicola*] interacting protein 4) in einem Proteinkomplex vor (Qi und Katagiri 2009; Hemsley et al. 2013). Die vier HIR Proteine wurden bereits an der Plasmamembran lokalisiert und besitzen zusätzlich zu S-acylierbaren Cysteinen jeweils ein postuliertes N-Myristylierungsmotiv (Qi et al. 2011), jedoch keine Transmembrandomänen, was eine Membranbindung durch eine duale Lipidmodifizierung vermuten lässt. Durch Proteomanalysen an Vakuolen aus *A. thaliana* Zellkultur gibt es außerdem drei Hinweise auf eine Lokalisation der HIRs am Tonoplasten (Shimaoka et al. 2004; Endler et al. 2006; Yoshida et al. 2013). In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von HIR1 an der Plasmamembran von *N. benthamiana* Epidermiszellen bestätigt. Mit mutierter N-Myristylierungsstelle lokalisierte HIR1^{G2A} cytoplasmatisch in *N. benthamiana* Zellen, konnte durch heterolog exprimierte HIR1-funktionale PATs jedoch wieder an die Plasmamembran transloziert werden. Die Plasmamembran-Assoziation des Proteins kann also auch allein durch S-Acylierung vermittelt werden. Die N-Myristylierung beeinflusst die S-Acylierung von HIR1 zwar positiv, ist für die Verankerung in der Plasmamembran *per se* jedoch nicht notwendig. Aufgrund ihrer Irreversibilität kann die N-Myristylierung aber für eine stabile Assoziation von HIR1 in der Plasmamembran essentiell sein.

Als mögliche S-Acylierungsmotive in HIR1 kamen fünf Cysteinreste in Frage. Der erste Cysteinrest befindet sich in der N-terminalen MGQALGC Sequenz. Darüber hinaus haben eigene *in silico* Analysen ergeben, dass zwei Cysteine (Cys32 und Cys34) auf der hydrophoben Seite einer potentiellen AH positioniert sind (Abb. 44). Diese mögliche AH weist ungewöhnlicherweise ein Prolin inmitten der polaren Seite auf, welches eine destabilisierende Wirkung auf die Wasserstoffbrücken der Helix haben sollte (Chakrabarti und Chakrabarti 1998). Es wurden aber noch andere Proteine mit dieser Helix-brechenden Aminosäure in ihrer AH beschrieben. So besitzt das bakterielle Sporulationsprotein SpoVM (*Stage V Sporulation Protein M*) ein Prolin in seiner AH und eine Substitution durch Alanin an dieser Position führt dazu, dass SpoVM nicht

mehr selektiv an bestimmte gekrümmte Membranen binden kann (Ramamurthi et al. 2009; Drin und Antony 2010). Möglicherweise ist das Prolin somit für die Funktion der AH von HIR1 von Bedeutung. Koexpressionen eines HIR1 Proteins mit deletierter N-terminaler MGQALGC Sequenz (HIR1^{ΔN}) und PAT-Enzymen in Hefezellen ergaben, dass HIR1^{ΔN} durch einige PATs an Hefezellmembranen transloziert wurde (Abb. 47). HIR1 wird also außerhalb der N-terminalen sieben Aminosäuren S-acyliert, möglicherweise an den Cysteinen in der AH. Ein Lokalisationsvergleich von HIR1^{G2A} oder HIR1^{ΔN} bei Koexpression einiger PATs in Hefezellen ergab zudem, dass beide Varianten dieses Substrats bei Koexpression mit den gleichen PATs unterschiedlich lokalisierten. Diese unterschiedlichen Lokalisationen führten zu der Annahme, dass die S-Acylierungen an verschiedenen Cysteinen in HIR1 die Bindung an unterschiedliche Membranen oder Membranbereiche vermittelt. Ob HIR1 auch *in planta* durch S-Acylierung an verschiedenen Positionen in unterschiedlichen Membranen oder Membransubdomänen verankert wird, kann mittels Koexpressionen von HIR1^{G2A} und HIR1^{ΔN} und PATs *in planta* untersucht werden.

Welche Funktion die zusätzliche S-Acylierung innerhalb der möglichen AH von HIR1 hat, wurde nicht untersucht. Auffällig war, dass HIR1 und HIR1^{ΔN} in punktartigen Strukturen der Hefezellmembranen lokalisierten. Bei diesen Strukturen handelt es sich möglicherweise um Subdomänen innerhalb der Membran. Das könnte bedeuten, dass die S-Acylierung im Bereich der potentiellen AH die Lokalisation von HIR1 in Subdomänen, wie zum Beispiel Mikrodomänen der Plasmamembran vermitteln kann. Mikrodomänen der Plasmamembran zeichnen sich durch eine differenzierte Zusammensetzung, Struktur und Funktion im Vergleich zu den umgebenden Membranbereichen aus (Malinsky et al. 2013). Möglicherweise kann durch den Einsatz von Chemikalien untersucht werden, ob HIR1 tatsächlich in Subdomänen der Plasmamembran lokalisiert. So wird Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) beispielsweise dafür eingesetzt, Sterole aus Membranen zu entfernen (Zidovetzki und Levitan 2007). Führt die Applikation von MβCD zur homogenen Verteilung von HIR1 in der Plasmamembran von Hefezellen, deutet das auf eine Bindung des Proteins in Sterol-reichen Mikrodomänen hin.

5.7.2 HIR2 bindet aufgrund dualer S-Acylierung an zwei benachbarten Cysteinen an der Plasmamembran und am Tonoplasten

Lokalisationsstudien aus dieser Arbeit zeigten, dass das Protein HIR2 mit der Plasmamembran und zusätzlich schwach mit dem Tonoplasten von *N. bethamiana* Zellen assoziiert ist. Eine Mutation des Glycins an Position 2 hatte keinen Einfluss auf die Membranbindung von HIR2. Entweder wird HIR2 im Gegensatz zu HIR1 nicht N-myristyliert, oder die N-Myristylierung ist für die Plasmamembranbindung nicht essentiell. HIR2 besitzt im N-Terminus zwei benachbarte Cysteinreste an den Positionen 6 und 7 und die Plasmamembran- und Tonoplastbindung von HIR2 wird vermutlich durch S-Acylierung an diesen beiden Cysteinen vermittelt. Die Mechanismen der Membranbindung der zwei Proteine HIR1 und HIR2 unterscheiden sich also.

HIR1 wird über eine duale Lipidmodifikation aus N-Myristylierung und S-Acylierung in der Plasmamembran verankert und assoziiert möglicherweise durch eine zusätzliche S-Acylierung innerhalb einer amphipathischen Struktur mit Subdomänen der Plasmamembran. HIR2 wird im Gegensatz dazu möglicherweise nicht N-myristyliert und wird durch eine duale S-Acylierung mit der Plasmamembran und dem Tonoplasten assoziiert. Ob HIR2 in *A. thaliana* zusätzlich am Tonoplasten lokalisiert oder die Bindung an diese Membran aufgrund der heterologen Expression in *N. benthamiana* zustande kam, ist nicht bekannt. Die Vakuole und der Tonoplast spielen bei der pflanzlichen Abwehr gegen Pathogene und Herbivore eine entscheidende Rolle (Hatsugai und Hara-Nishimura 2010). In Tabakpflanzen wurde während einer hypersensitiven Reaktion ein Zerbrechen der Vakuolenmembran vor dem programmierten Zelltod beobachtet. Dadurch werden hydrolytische Enzyme aus der Vakuole direkt ins Cytosol entlassen, was schließlich zum Zelltod führt und somit die Ausbreitung des Pathogens verhindert (Hatsugai et al. 2004; Hatsugai und Hara-Nishimura 2010). Einige phytopathogene Bakterien dringen beim Befall jedoch nicht in die Pflanzenzellen ein und verbleiben im intrazellulären Raum. Um die Ausbreitung dieser Pathogene zu bekämpfen, kann die Vakuole auch mit der Plasmamembran verschmelzen, wodurch antibakterielle Proteasen und Zelltod-induzierende Komponenten in den intrazellulären Raum geschleust werden (Hatsugai et al. 2009; Hatsugai und Hara-Nishimura 2010). Möglicherweise ist das Protein HIR2 in diesen Prozessen an beiden Membranen involviert, was die duale Lokalisation an Plasmamembran und Tonoplast erklären könnte.

5.7.3 Die Plasmamembran-lokalisierte PAT05 kommt als HIR1-S-acylierendes Enzym in Frage

Die *in planta* BOP Assays mit dem cytoplasmatisch lokalisierten HIR1^{G2A} Protein haben die PATs 04, 05, 06, 08 und 09 als HIR1-translozierende Enzyme identifiziert. Vermutlich ist eine dieser Plasmamembran-lokaliserten Enzyme für die S-Acylierung von HIR1 verantwortlich und dadurch an der hypersensitiven Reaktion in *A. thaliana* beteiligt. Möglicherweise handelt es sich bei der PAT05 um ein Enzym, welches an der Immunantwort von *A. thaliana* beteiligt ist. Für diese These spricht, dass die Expression des *PAT05* Gens bei Zugabe des bakteriellen Elicitors Flg22 (22 Aminosäuren des Flagellins) leicht erhöht ist (Brunner et al. 2007). Zudem wurde bei einer Interaktionsstudie mit einer *Arabidopsis* cDNA Bank PAT05 als ein Protein identifiziert, welches mit dem Resistenzprotein RPS2 interagiert (Quirino et al. 2004). Interessant wäre somit die Untersuchung einer *Arabidopsis pat05* Verlustmutante auf mögliche phänotypische Merkmale wie Blattnekrosen, die mit der pflanzlichen hypersensitiven Antwort in Verbindung stehen. Zusätzlich wäre eine Lokalisationsstudie von HIR1 in der *pat05* Mutante aufschlussreich.

Die unterschiedlichen Lipidmodifikationen von HIR1 und HIR2 gehen möglicherweise mit der Funktion der beiden Proteine einher. HIR1 wird durch eine irreversible N-Myristylierung mit zusätzlicher S-Acylierung stabil in der Plasmamembran verankert und kann durch eine zusätzliche S-Acylierung in einer AH an verschiedene Subdomänen der Plasmamembran binden

(Abb. 52). Es gibt bereits Hinweise dafür, dass das HIR3 Protein aus *Oryza sativa* als Gerüstprotein in Mikrodomänen der Plasmamembran fungiert, und von dort Zelltod-auslösende Prozesse als Stressreaktion von Pflanzen initiiert (Ishikawa et al. 2015). Möglicherweise dient HIR1 als Gerüstprotein für den RPS2 Komplex und ist dort an der Regulation von Prozessen beteiligt, die den pflanzlichen Zelltod bei der hypersensitiven Reaktion auslösen. HIR2 hingegen wird durch reversible S-Acylierung an zwei benachbarten Cysteinen in der Plasmamembran und auch in der Vakuolenmembran verankert. Somit könnte HIR2 während einer hypersensitiven Reaktion Funktionen an der Plasmamembran und am Tonoplast übernehmen.

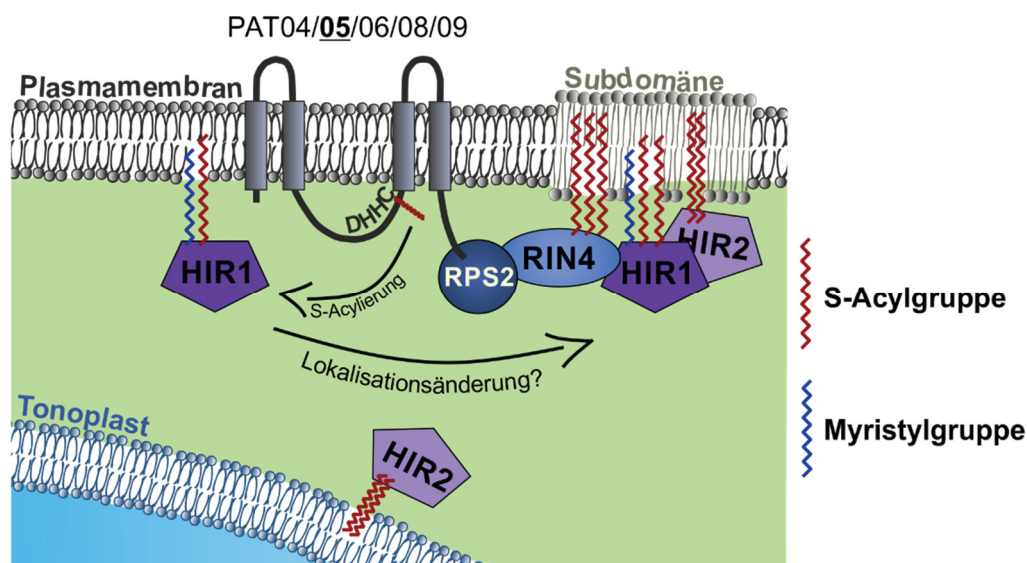


Abbildung 52: Modell der Membranbindung der Proteine der hypersensitiven Antwort HIR1 und HIR2. HIR1 wird über eine N-Myristylierung und S-Acylierung in der Plasmamembran verankert. Die S-Acylierung erfolgt potentiell durch die Plasmamembran-lokalisierten PATs 04, 05, 06, 08 oder 09. PAT05 ist wahrscheinlich an der S-Acylierung der Proteine des RPS2-Komplexes beteiligt, da es Hinweise auf die Interaktion von PAT05 mit dem Resistenzprotein RPS2 gibt. Durch die S-Acylierung kann HIR1 in Subdomänen der Plasmamembran binden. Dort bildet sich der RPS2-Komplex, in dem unter anderem das S-acylierte RIN4 Protein und die beiden Proteine HIR1 und 2 zu finden sind. Das Protein HIR2 wird wahrscheinlich nicht N-myristyliert und wird über eine duale S-Acylierung an die Plasmamembran und an den Tonoplasten gebunden.

6 Synopse

Die Gruppe der PATs in *Arabidopsis thaliana* umfasst insgesamt 24 Enzyme, die teilweise die gleichen Substrate S-acylieren können (Hou et al. 2009; Batistič 2012). In dieser Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, um funktionale PAT-Substrat Paare *in planta* ermitteln zu können. Dazu wurden die *Arabidopsis* PATs zusammen mit dem Tonoplast-lokalisierten Calciumsensor Protein CBL2 in *N. benthamiana* koexprimiert und der S-Acylierungsinhibitor 2-Br appliziert (BOP Assay und induzierbarer BOP Assay). Darüber hinaus kann die Thioveresterung eines S-Acylierungssubstrats durch die jeweilige überexprimierte PAT direkt durch eine Kombination des BOP Assay mit der *Biotin Switch* Methode (BiBOP Assay) biochemisch nachgewiesen werden. Die Durchführung von BOP Assays, sowie Protein-Koexpressionen in Hefezellen ergaben, dass CBL2 und das CBL2-verwandte Protein CBL3 durch verschiedene Mitglieder der

phylogenetischen Untergruppe A der *Arabidopsis* PAT-Enzymfamilie S-acyliert und dadurch im Tonoplasten verankert werden können. Im Vergleich zu CBL2 und 3 kann der ebenfalls Tonoplast-lokalisierte Calciumsensor CBL6 durch die eine größere Anzahl an koexprimierter PAT-Enzyme aus allen drei phylogenetischen Untergruppen mit der Vakuolenmembran assoziiert werden. Das ist jedoch nicht auf die anders angeordneten N-terminalen Cysteine in CBL6 zurückzuführen, sondern resultiert vielmehr aus den umgebenden hydrophoben Aminosäuren, die die Wahrscheinlichkeit einer CBL6-S-Acylierung erhöhen. Durch Anwendung der neu etablierten Methoden wurde hier außerdem die Bedeutung des C-Terminus' der PAT10 für die korrekte Lokalisation und katalytische Aktivität des Enzyms gezeigt. Zusätzliche *in silico* Analysen deuten auf zwei Motive in den PAT C-Termini hin, die für die Enzymfunktion und -spezifität der Untergruppe A relevant sein könnten. Darüber hinaus weisen die PATs der Gruppe A zwar überschneidende CBL2-S-Acylierungsaktivität auf, zeigen dabei jedoch Unterschiede in der Lipidmodifikation des Calciumsensors. So resultiert die Aktivität der PAT02 beispielsweise nur dann in einer Tonoplastbindung von CBL2, wenn das Substrat drei N-terminale Cysteinreste aufweist. Im Gegensatz dazu führt die Aktivität der PAT10 auch dann zu einer CBL2 Tonoplastassoziation, wenn der Calciumsensor jeweils nur zwei der eigentlich drei N-terminalen Cysteine besitzt. Das deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Substraterkennung und unterschiedlich starke Substrataffinitäten dieser Enzyme trotz überlappender Substrat-S-Acylierung hin. Der Tonoplast-lokalisierte Calciumsensor CBL2 bildet darüber hinaus im N-Terminus eine potentielle amphipathische Helix, welche eine S-Acylierung begünstigt und dadurch die Membranbindung des Proteins beeinflusst.

Während dieser Arbeit wurden zusätzlich HIR1 und HIR2 als S-Acylierungssubstrate identifiziert. Es wird angenommen, dass diese Proteine Funktionen in der pflanzlichen Immunantwort übernehmen. HIR1 und HIR2 werden auf verschiedene Weise lipidmodifiziert und dadurch mit der pflanzlichen Plasmamembran assoziiert. HIR1 weist ein unkonventionelles duales Lipidmodifikationsmotiv für eine N-Myristylierung und eine S-Acylierung auf und wird zusätzlich im Bereich einer möglichen amphipathischen Helix S-acyliert. Die HIR1-Translokation kann durch verschiedene Plasmamembran-lokalisierte PAT-Enzyme vermittelt werden. Zusammen mit der bereits veröffentlichten Interaktionen von PAT05 mit dem Resistenzprotein RPS2, lieferten die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf die PAT05 als mögliches HIR1-S-acylierendes Enzym. Im Gegensatz zu HIR1 wird HIR2 wahrscheinlich nicht N-myristyliert und erreicht die Plasmamembran aufgrund der S-Acylierung an zwei benachbarten N-terminalen Cysteinen. In dieser Arbeit wurden somit neue Methoden konstituiert, mit denen die S-Acylierung verschiedener Substratproteine auf die spezifische Aktivität bestimmter PAT-Enzyme eingegrenzt werden kann. Diese Methoden sind auf jedes biologische Expressionssystem übertragbar. Somit bieten der BOP Assay und die PAT-Substrat Koexpressionen in Hefezellen einen neuen Ansatz zur Untersuchung der Protein-S-Acylierung, sowie deren Mechanismen und Funktionen.

7 Literaturverzeichnis

- Adjobo-Hermans, M.J.W., Goedhart, J. und Gadella, T.W.J.** (2006). Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of Galpha and Ggamma and do not dissociate upon activation. *Journal of Cell Science*, **119** (24), 5087–5097.
- Arango-Lievano, M., Sensoy, O., Borie, A. und Corbani, M.** (2016). A GIPC1-palmitate switch modulates dopamine Drd3 receptor trafficking and signaling. *Molecular and Cell Biology*, **36** (6), 1019 - 1031.
- Babu, P., Deschenes, R.J. und Robinson, L.C.** (2004). Akr1p-dependent palmitoylation of Yck2p yeast casein kinase 1 is necessary and sufficient for plasma membrane targeting. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 27138–27147.
- Bannan, B.A., Van Etten, J., Kohler, J.A., Tsoi, Y., Hansen, N.M., Sigmon, S., Fowler, E., Buff, H., Williams, T.S., Ault, J.G., Glaser, R.L. und Korey, C.A.** (2008). The Drosophila protein palmitoylome: Characterizing palmitoyl-thioesterases and DHHC palmitoyl-transferases. *Fly*. **2**, 198–214.
- Batistič, O. und Kudla, J.** (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta*. **219**, 915–924.
- Batistič, O., Sorek, N., Schültke, S., Yalovsky, S. und Kudla, J.** (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **20**, 1346–1362.
- Batistič, O. und Kudla, J.** (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1793**, 985–992.
- Batistič, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K. und Kudla, J.** (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant Journal*. **61**, 211–222.
- Batistič, O., Rehers, M., Akerman, A., Schlücking, K., Steinhorst, L., Yalovsky, S. und Kudla, J.** (2012). S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Research*. **22**, 1155–1168.
- Batistič, O.** (2012). Genomics and Localization of the Arabidopsis DHHC-Cysteine-Rich Domain S-Acyltransferase Protein Family. *Plant Physiology*. **160**, 1597–1612.
- Beckmann, L. und Batistič, O.**, in Vorbereitung. A novel assay identifies several protein S-acyltransferases modifying *Arabidopsis thaliana* Calcineurin B-like protein 2.
- Bhawal, R.P., Sadananda, S.C., Bugarin, A., Laposa, B. und Chowdhury, S.M.** (2015). Mass spectrometry cleavable strategy for identification and differentiation of prenylated peptides. *Analytical Chemistry*. **87**, 2178–2186.
- Bigay, J., Casella, J.-F., Drin, G., Mesmin, B. und Antonny, B.** (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *The EMBO Journal*. **24**, 2244–2253.
- Bigay, J. und Antonny, B.** (2012). Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Developmental Cell*. **23**, 886–895.
- Bijlmakers, M.-J. und Marsh, M.** (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends in Cell Biology*. **13**, 32–42.
- Bizzozero, O.A., Bixler, H.A. und Pastuszyn, A.** (2001). Structural determinants influencing the reaction of cysteine-containing peptides with palmitoyl-coenzyme A and other thioesters. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1545**, 278–288.

- Böhm, S., Frishman, D. und Mewes, H.W.** (1997). Variations of the C₂H₂ zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Research*. **25**, 2464–2469.
- Boisson B, Giglione C, Meinell T.** 2003. Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 43418–43429.
- Bull, V.H. und Thiede, B.** (2012). Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. *Electrophoresis*. **33**, 1814–1823.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase activity. *Biotechniques*. **5**: 376–378.
- Brunner, F., Nürnberger, T., Townsend, H., Emmerson, Z., Schildknecht, B.** (2007). AtGenExpress: Response to bacterial-(LPS, HrpZ, Flg22) and oomycete-(NPP1) derived elicitors. <https://www.arabidopsis.org/>
- Caballero, M.C., Alonso, A.M., Deng, B., Attias, M., Souza, W. D und Corvi, M.M.** (2016). Identification of new palmitoylated proteins in *Toxoplasma gondii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1864**, 400–408.
- Casey, P.J.** (1992). Biochemistry of protein prenylation. *Journal of Lipid Research*. **33**, 1731–1740.
- Chakrabarti, P. und Chakrabarti, S.** (1998). C–H...O hydrogen bond involving proline residues in alpha-helices. *Journal of Molecular Biology*. **284**, 867–873.
- Chamberlain, L.H. und Shipston, M.J.** (2015). The Physiology of Protein S-acylation. *Physiological Reviews*. **95**, 341–376.
- Charron, G., Zhang, M.M., Yount, J.S., Wilson, J., Raghavan, A.S., Shamir, E. und Hang, H.C.** (2009). Robust fluorescent detection of protein fatty-acylation with chemical reporters. *Journal of the American Chemical Society*. **131**, 4967–4975.
- Clough SJ und Bent A** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **16**, 735–743.
- Coleman, R.A., Rao, P., Fogelsohn, R.J. und Bardes, E.S.** (1992). 2-Bromopalmitoyl-CoA and 2-bromopalmitate: promiscuous inhibitors of membrane-bound enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1125**, 203–209.
- Conibear, E. und Davis, N.G.** (2010). Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. *Journal of Cell Science*. **123**, 4007–4010.
- Cornell, R.B. und Northwood, I.C.** (2000). Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization. *TIBS*. **25**, 441–447.
- Cornell, R.B.** (2016). Membrane lipid compositional sensing by the inducible amphipathic helix of CCT. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1861**, 847–861.
- Crosti, P., Malerba, M. und Bianchetti, R.** (2001). Tunicamycin and Brefeldin A induce in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. *Protoplasma*. **216**, 31–38.
- Dathe, M. und Wieprecht, T.** (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1462**, 71–87.
- Davda, D., El Azzouny, M.A., Tom, C.T.M.B., Hernandez, J.L., Majmudar, J.D., Kennedy, R.T. und Martin, B.R.** (2013). Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate. *ACS Chemical Biology*. **8**, 1912–1917.

- DeJesus, G. und Bizzozero, O. A.** (2002). Effect of 2-fluoropalmitate, cerulenin and tunicamycin on the palmitoylation and intracellular translocation of myelin proteolipid protein. *Neurochemical Research*. **27**, 1669–1675.
- Dietrich, L.E.P. und Ungermann, C.** (2004). On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO Reports*. **5**, 1053–1057.
- Doherty, J.P., Lindeman, R., Trent, R.J., Graham, M.W. und Woodcock, D.M.** (1993). *Escherichia coli* host strains SURETM and SRB fail to preserve a palindrome cloned in lambda phage: improved alternate host strains. *Gene*. **124**, 29–35.
- Draper, J.M. und Smith, C.D.** (2009). Palmitoyl acyltransferase assays and inhibitors. *Molecular Membrane Biology*. **26**, 5–13.
- Drin, G., Casella, J.-F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T.U. und Antonny, B.** (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nature Structural & Molecular Biology*. **14**, 138–146.
- Drin, G. und Antonny, B.** (2010). Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Letters*. **584**, 1840–1847.
- Drisdel, R.C. und Green, W.N.** (2004). Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *BioTechniques*. **36** (2), 276–285.
- Ducker, C.E., Griffel, L.K., Smith, R. A, Keller, S.N., Zhuang, Y., Xia, Z., Diller, J.D. und Smith, C.D.** (2006). Discovery and characterization of inhibitors of human palmitoyl acyltransferases. *Molecular Cancer Therapeutics*. **5**, 1647–1659.
- Duncan, J.A und Gilman, A.G.** (1998). A Cytoplasmic Acyl-Protein Thioesterase that removes Palmitate from G Protein alpha Subunits and p21^{RAS}. *Cell Biology and Metabolism*. **273**, 15830–15837.
- Dunkel, M., Latz, A., Schumacher, K., Müller, T., Becker, D. und Hedrich, R.** (2008). Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family. *Molecular Plant*. **1**, 938–949.
- Eckert, C., Offenborn, J.N., Heinz, T., Armarego-Marriott, T., Schültke, S., Zhang, C., Hillmer, S., Heilmann, M., Schumacher, K., Bock, R., Heilmann, I. und Kudla, J.** (2014). The vacuolar calcium sensors CBL2 and CBL3 affect seed size and embryonic development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **78**, 146–156.
- Emans, N.** (2002). Uptake of a Fluorescent Marker in Plant Cells is sensitive to Brefeldin A and Wortmannin. *The Plant Cell*. **14**, 71–86.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E. und Schmidt, U.G.** (2006). Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and *Arabidopsis* Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach. *Plant Physiology*. **141**, 196–207.
- Falsetti, S.C., Wang, D., Peng, H., Carrico, D., Cox, A.D., Der, C.J. und Hamilton, A.D.** (2007). Geranylgeranyltransferase I Inhibitors Target Ra1B To Inhibit Anchorage-Dependent Growth and Induce Apoptosis and Ra1A To Inhibit Anchorage-Independent Growth. *Molecular and Cell Biology*. **27**, 8003–8014.
- Farazi, T. A, Waksman, G. und Gordon, J.I.** (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**, 39501–39504.
- Finnigan, G.C., Ryan, M. und Stevens, T.H.** (2011). A genome-wide enhancer screen implicates sphingolipid composition in vacuolar ATPase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **187**, 771–783.
- Forgac, M.** (1989). Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiological Reviews*. **69**, 765–796.

- Fortwendel, J.R., Juvvadi, P.R., Rogg, L.E., Asfaw, Y.G., Burns, K.A. und Randell, S.H. (2012). Plasma Membrane Localization Is Required for RasA-Mediated Polarized Morphogenesis and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eucaryotic Cell*. **11** (8), 966–977.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G. und Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*. **581**, 2204–2214.
- Gentry, L.R., Nishimura, A., Cox, A.D., Martin, T.D., Tsygankov, D., Nishida, M., Elston, T.C. und Der, C.J. (2015). Divergent Roles of CAAX Motif-signalized Posttranslational Modifications in the Regulation and Subcellular Localization of Ral GTPases. *Journal of Biological Chemistry*. **290**, 22851–22861.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Yamauchi, Y., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takahashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinozaki, K., Saito, K., Yoshida, S. und Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: Experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal*. **55**, 526–542.
- González Montoro, A., Quiroga, R., Maccioni, H.J.F. und Valdez Taubas, J. (2009). A novel motif at the C-terminus of palmitoyltransferases is essential for Swf1 and Pfa3 function *in vivo*. *The Biochemical Journal*. **419**, 301–308.
- González Montoro, A., Ramirez, S.C., Quiroga, R. und Valdez Taubas, J. (2011). Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast. *PLoS ONE*. **6** (2), e16969.
- González Montoro, A., Quiroga, R. und Valdez Taubas, J. (2013). Zinc co-ordination by the DHHC cysteine-rich domain of the palmitoyltransferase Swf1. *Biochemical Journal*. **454**, 427–435.
- González Montoro, A., Chumpen Ramirez, S. und Valdez Taubas, J. (2015). The Canonical DHHC Motif Is Not Absolutely Required for the Activity of the Yeast S -acyltransferases Swf1 and Pfa4. *Journal of Biological Chemistry*. **290**, 22448–22459.
- Gottlieb, C.D., Zhang, S. und Linder, M.E. (2015). The Cysteine-rich Domain of the DHHC3 Palmitoyltransferase is Palmitoylated and Contains Tightly Bound Zinc. *Journal of Biological Chemistry*. **290** (49), 29259–29269.
- Greaves, J. und Chamberlain, L.H. (2007). Palmitoylation-dependent protein sorting. *Journal of Cell Biology*. **176**, 249–254.
- Greaves, J. und Chamberlain, L.H. (2011). DHHC palmitoyl transferases: Substrate interactions and (patho)physiology. *Trends in Biochemical Sciences*. **36** (5), 245–253.
- Gubitosi-Klug, R.A., Mancuso, D.J. und Gross, R.W. (2005). The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 5964–5968.
- Hang, H.C., Geutjes, E., Grotenbreg, G., Pollington, M., Bijlmakers, M.J., Ploegh, H.L., Cells, M. und Pollington, A.M. (2007). Chemical Probes for the Rapid Detection of Fatty-Acylated Proteins in Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society*. **129**, 2744–2745.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. und Hara-Nishimura, I. (2004). A Plant Vacuolar Protease, VPE, Mediates Virus-Induced Hypersensitive Cell Death. *Science*. **305**, 855–858.
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M. und Hara-Nishimura, I. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development*. **23**, 2496–2506.

- Hatsugai, N. und Hara-Nishimura, I.** (2010). Two vacuole-mediated defense strategies in plants. *Plant Signaling & Behavior*. **5** (12), 1568-1570.
- Hemsley, P.A., Kemp, A.C. und Grierson, C.S.** (2005). The TIP GROWTH DEFECTIVE1 S-acyl transferase regulates plant cell growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **17**, 2554–2563.
- Hemsley, P.A., Taylor, L. und Grierson, C.** (2008). Assaying protein palmitoylation in plants. *Plant Methods*. **4**, (2).
- Hemsley, P.A. und Grierson, C.S.** (2008). Multiple roles for protein palmitoylation in plants. *Trends in Plant Science*. **13**, 295–302.
- Hemsley, P.A.** (2009). Protein S-acylation in plants. *Molecular Membrane Biology*. **26**, 114–125.
- Hemsley, P. A., Weimar, T., Lilley, K.S., Dupree, P. und Grierson, C.S.** (2013). A proteomic approach identifies many novel palmitoylated proteins in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. **197**, 805–814.
- Hemsley, P.A.** (2015). The importance of lipid modified proteins in plants. *New Phytologist*. **205**, 476–489.
- Heo, W. Do, Inoue, T., Park, W.S., Kim, M.L., Park, B.O., Wandless, T.J. und Meyer, T.** (2006). PI(3,4,5)P₃ and PI(4,5)P₂ lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*. **314**, 1458–1461.
- Hicks, G.R., Rojo, E., Hong, S., Carter, D.G. und Raikhel, N. V** (2004). Geminating pollen has tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires VACUOLESS1 for proper function. *Plant Physiology*. **134**, 1227–1239.
- Hou, H., John Peter, A.T., Meiringer, C., Subramanian, K. und Ungermann, C.** (2009). Analysis of DHHC acyltransferases implies overlapping substrate specificity and a two-step reaction mechanism. *Traffic*. **10**, 1061–1073.
- Hurst, C.H. und Hemsley, P. A.** (2015). Current perspective on protein S-acylation in plants: more than just a fatty anchor? *Journal of Experimental Botany*. **66**, 1599–1606.
- Ishikawa, T., Aki, T., Yanagisawa, S., Uchimiya, H. und Kawai-Yamada, M.** (2015). Overexpression of BAX INHIBITOR-1 Links Plasma Membrane Microdomain Proteins to Stress. *Plant Physiology*. **169**, 1333–1343.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W. und Zhu, J.K.** (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell*. **12**, 1667–1678.
- Jennings, B.C., Nadolski, M.J., Ling, Y., Baker, M.B., Harrison, M.L., Deschenes, R.J. und Linder, M.E.** (2009). 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation *in vitro*. *Journal of Lipid Research*. **50**, 233-242.
- Jennings, B.C. und Linder, M.E.** (2012). DHHC protein S-acyltransferases use similar ping-pong kinetic mechanisms but display different Acyl-CoA specificities. *Journal of Biological Chemistry*. **287**, 7236–7245.
- Johnson, J.E. und Cornell, R.B.** (1999). Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions. *Molecular Membrane Biology*. **16**, 217–235.
- Kang, R., Wan, J., Arstikaitis, P., Takahashi, H., Huang, K., Bailey, A.O., Thompson, J.X., Roth, A.F., Drisdell, R.C., Mastro, R., Green, W.N., Yates, J.R. III, Davis, N.G. und El-Husseini, A.** (2008). Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature*. **456**, 904–909.
- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J. und Dangl, J.L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 6496–6501.

- Kinsella, B.T., Erdman, R.A. und Maltese, W.A.** (1991). Carboxyl-terminal Isoprenylation of ras-related GTP-binding Proteins Encoded by *rac1*, *rac2* and *ralA*. *The Journal of Biological Chemistry*. **15**, 9786–9794.
- Kitten, G.T. und Nigg, E. A.** (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *Journal of Cell Biology*. **113**, 13–23.
- Klement, Z. und Goodman, R.N.** (1967). The Hypersensitive Reaction To Infection By Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. **5**, 17–44.
- Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistič, O. und Kudla, J.** (2004). Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases : Genomics of the *Arabidopsis* and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. *Plant Physiology*. **134**, 43–58.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics*. **204**, 383–396.
- Korycka, J., Łach, A., Heger, E., Bogusławska, D.M., Wolny, M., Toporkiewicz, M., Augoff, K., Korzeniewski, J. und Sikorski, A.F.** (2012). Human DHHC proteins: A spotlight on the hidden player of palmitoylation. *European Journal of Cell Biology*. **91**, 107-117.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W. und Luan, S.** (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**, 4718–4723.
- Kudla, J. und Bock, R.** (2016). Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analyses. *The Plant Cell*. **28**, 1002–100.
- Kushnirov, V. V.** (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*. **16**, 857–860.
- Lai, J. und Linder, M.E.** (2013). Oligomerization of DHHC protein S-acyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**, 22862–22870.
- Lai, J., Yu, B., Cao, Z., Chen, Y., Wu, Q., Huang, J. und Yang, C.** (2015). Two homologous protein S-acyltransferases, PAT13 and PAT14, cooperatively regulate leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. **66**, 6345–6353.
- Lam, K.K.Y., Davey, M., Sun, B., Roth, A.F., Davis, N.G. und Conibear, E.** (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *Journal of Cell Biology*. **174**, 19–25.
- Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H. und Yalovsky, S.** (2002). A cell-specific, prenylation-independent mechanism regulates targeting of type II RACs. *The Plant Cell*. **14**, 2431–2450.
- Lawrence, D.S., Zilfou, J.T. und Smith, C.D.** (1999). Structure-activity studies of cerulenin analogues as protein palmitoylation inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **42**, 4932–4941.
- Lee, M.C.S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M. und Schekman, R.** (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*. **122**, 605–617.
- Lemonidis, K., Werno, M.W., Greaves, J., Diez-Ardanuy, C., Sanchez-Perez, M.C., Salaun, C., Thomson, D.M. und Chamberlain, L.H.** (2015). The zDHHC family of S-acyltransferases. *Biochemical Society Transactions*. **43**, 217–221.
- Linder, M.E. und Deschenes, R.J.** (2003). New Insights into the Mechanisms of Protein Palmitoylation. *Biochemistry*. **42** (15), 4311-4320.
- Linder, M.E. und Deschenes, R.J.** (2004). Model organisms lead the way to protein palmitoyltransferases. *Journal of Cell Science*. **117** (4), 521-526.

- Liu, L.-L., Ren, H.-M., Chen, L.-Q., Wang, Y. und Wu, W.-H.** (2013). A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein Kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like Protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **161**, 266–277.
- Lobo, S., Greentree, W.K., Linder, M.E. und Deschenes, R.J.** (2002). Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*. **277**, 41268–41273.
- Lobo Planey, S.** (2013). Discovery of Selective and Potent Inhibitors of Palmitoylation. *Drug Discovery*. 251-288.
- Maeshima, M.** (2001). Tonoplast Transporters: Organization and Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **52**, 469–97.
- Magalhaes, M.A.O. und Glogauer, M.** (2010). Pivotal Advance: Phospholipids determine net membrane surface charge resulting in differential localization of active Rac1 and Rac2. *Journal of Leukocyte Biology*. **87**, 545–555.
- Magee, T. und Seabra, M.C.** (2005). Fatty acylation and prenylation of proteins: What's hot in fat. *Current Opinion in Cell Biology*. **17**, 190–196.
- Mähs, A., Steinhorst, L., Han, J.P., Shen, L.K., Wang, Y. und Kudla, J.** (2013). The calcineurin B-like Ca²⁺ sensors CBL1 and CBL9 function in pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. **6**, 1149–1162.
- Malinsky, J., Opekarová, M., Grossmann, G. und Tanner, W.** (2013). Membrane Microdomains, Rafts, and Detergent-Resistant Membranes in Plants and Fungi. *Annual Review of Plant Biology*. **64**, 501–529.
- Manna, D., Albanese, A., Wei, S.P. und Cho, W.** (2007). Mechanistic basis of differential cellular responses of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate- and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding pleckstrin homology domains. *Journal of Biological Chemistry*. **282**, 32093–32105.
- Martin, B.R. und Cravatt, B.F.** (2009). Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nature Methods*. **6**, 135–138.
- Marty, F.** (1999). Plant vacuoles. *The Plant Cell*. **11**, 587–599.
- Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N. V. und Nakamura, K.** (1995). Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *Journal of Cell Biology*. **130**, 1307–1318.
- Mitchell, D.A., Vasudevan, A., Linder, M.E. und Deschenes, R.J.** (2006). Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *The Journal of Lipid Research*. **47**, 1118–1127.
- Mitchell, D.A., Mitchell, G., Ling, Y., Budde, C. und Deschenes, R.J.** (2010). Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Erf2 reveals a two-step reaction mechanism for protein palmitoylation by DHHC enzymes. *The Journal of biological chemistry*. **285** (49), 38104–38114.
- Müntz, K.** (2007). Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany*. **58**, 2391–2407.
- Nadimpalli, R., Yalpani, N., Gurmukh, S.J., und Simmons, C.R.** (2000). Prohibitins, Stomatins, and Plant Disease Response Genes Comprise a Protein Superfamily that Controls Cell Proliferation, Ion Channel Regulation, and Death. *Journal of Biological Chemistry*. **275** (38), 29579-86.
- Nadolski, M.J. und Linder, M.E.** (2007). Protein lipidation. *FEBS Journal*. **274**, 5202–5210.

- Nadolski, M.J. und Linder, M.E.** (2009). Molecular Recognition of the Palmitoylation Substrate Vac8 by Its Palmitoyltransferase Pfa3. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 17720–17730.
- Nomura, S., Horiuchi, T., Hata, T. und Omura, S.** (1972). Inhibition of Sterol and Fatty Acid Biosynthesis by Cerulenin in Cell-free Systems of Yeast. *Journal of Antibiotics*. **15** (6), 365-368.
- Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T. und Igarashi, Y.** (2006). Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1761**, 474–483.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K. und Robinson, L.C.** (1997). Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *The EMBO Journal*. **16**, 4194–4204.
- Patterson, S.I. und Skene, J.H.P.** (1994). Novel inhibitory action of tunicamycin homologues suggests a role for dynamic protein fatty acylation in growth cone-mediated neurite extension. *The Journal of cell biology*. **124**, 521–536.
- Pedrazzini, E., Komarova, N.Y., Rentsch, D. und Vitale, A.** (2013). Traffic Routes and Signals for the Tonoplast. *Traffic*. **14**, 622–628.
- Peiter, E.** (2011). The plant vacuole : Emitter and receiver of calcium signals. *Cell Calcium*. **50**, 120–128.
- Pierre, M., Traverso, J. a, Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C. und Meinel, T.** (2007). N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **19**, 2804–2821.
- Podell, S. und Gribskov, M.** (2004). Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC Genomics*. **5** (37).
- Qi, B., Doughty, J. und Hooley, R.** (2013). A Golgi and tonoplast localized S-acyl transferase is involved in cell expansion, cell division, vascular patterning and fertility in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. **200**, 444–456.
- Qi, Q., Rajala, R.V.S., Anderson, W., Jiang, C., Rozwadowski, K., Selvaraj, G., Sharma, R. und Datla, R.** (2000). Molecular Cloning, Genomic Organization, and Biochemical Characterization of Myristoyl-CoA : Protein N- Myristoyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. **275**, 9673–9683.
- Qi, Y., und Katagiri, F.** (2009). Purification of low-abundance *Arabidopsis* plasma-membrane protein complexes and identification of candidate components. *The Plant Journal*. **57**, 932–944.
- Qi, Y., Tsuda, K., Nguyen, L. V., Wang, X., Lin, J., Murphy, A.S., Glazebrook, J., Thordal-Christensen, H., und Katagiri, F.** (2011). Physical association of *Arabidopsis* Hypersensitive Induced Reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *Journal of Biological Chemistry*. **286** (36), 31297-31307
- Quirino, B.F., Genger, R., Ham, J.H., Zabala, G. und Bent, A.F.** (2004). Identification and functional analysis of *Arabidopsis* proteins that interact with resistance gene product RPS2 in yeast. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **65**, 257–267.
- Ramamurthi, K.S., Lecuyer, S., Stone, H.A und Losick, R.** (2009). Geometric cue for protein localization in a bacterium. *Science*. **323**, 1354–1357.
- Rea, P.A. und Sanders., D.** (1987). Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum*. **71**, 131–141.

- Reis, P.A.A., Rosado, G.L., Silva, L.A.C., Oliveira, L.C., Oliveira, L.B., Costa, M.D.L., Alvim, F.C. und Fontes, E.P.B.** (2011). The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. *Plant Physiology*. **157**, 1853–1865.
- Resh, M.D.** (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cellular Signalling*. **8**, 403–412.
- Resh, M.D.** (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1451**, 1–16.
- Resh, M.D.** (2006). Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods*. **40**, 191–197.
- Rocks, O. Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J. Waldmann, H., Wittinghofer, A., Bastiaens, P.I.H.** (2005). An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms. *Science*. **307**, 1746–1752.
- Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., Koch, S., Huang, Z.-P., Pechlivanis, M., Kuhlmann, J., Brunsveld, L., Chandra, A., Ellinger, B., Waldmann, H., und Bastiaens, P.I.H.** (2010). The Palmitoylation Machinery Is a Spatially Organizing System for Peripheral Membrane Proteins. *Cell*. **141**, 458–471.
- Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L. und Davis, N.G.** (2002). The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *The Journal of Cell Biology*. **159**, 23–28.
- Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., Phinney, B.S., Yates, J.R. und Davis, N.G.** (2006). Global Analysis of Protein Palmitoylation in Yeast. *Cell*. **125**, 1003–1013.
- Running, M.P., Lavy, M., Sternberg, H., Galichet, A., Gruissem, W., Hake, S., Ori, N. und Yalovsky, S.** (2004). Enlarged meristems and delayed growth in *plp* mutants result from lack of CaaX prenyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 7815–7820.
- Ryan, E., Grierson, C.S., Cavell, A., Steer, M. und Dolan, L.** (1998). TIP1 is required for both tip growth and non-tip growth in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. **138**, 49–58.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. und Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*. **14**, S401–S417.
- Schafer, W.R. und Rine, J.** (1992). Protein Prenylation: Genes, Enzymes, Targets and ^ Functions. *Annual Reviews of Genetics*. **30**, 209–237.
- Schiefelbein, J., Calway, M., Masucci, J. und Ford, S.** (1993). Pollen Tube and Root-Hair Tip Growth is Disrupted in a Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. **103**, 979–985.
- Schiestl, R.H. und Gietz, R.D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*. **16**, 339–346.
- Schlücking, K., Edel, K.H., Drerup, M.M., Köster, P., Eckert, C., Leonie, S., Waadt, R., Batistič, O. und Kudla, J.** (2013). A new β -estradiol-inducible vector set that facilitates easy construction and efficient expression of transgenes reveals CBL3-Dependent cytoplasm to tonoplast translocation of CIPK5. *Molecular Plant*. **6**, 1814–1829.
- Schumacher, K.** (2014). pH in the plant endomembrane system-an import and export business. *Current Opinion in Plant Biology*. **22C**, 71–76.
- Scott, S. V., Nice, D.C., Nau, J.J., Weisman, L.S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. und Klionsky, D.J.** (2000). Apg13p and Vac8p are Part of a Complex of Phosphoproteins that are required for Cytoplasm to Vacuole Targeting. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 25840–25849.
- Shahinian, S. und Silvius, J.R.** (1995). Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry*. **34**, 3813–3822.

- Shi, J., Kim, K.N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S. und Kudla, J. (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **11**, 2393–2405.
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K.I., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K.I. und Mimura, T. (2004). Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. **45**, 672–683.
- Simon, M.L.A., Platre, M.P., Assil, S., Van Wijk, R., Chen, W.Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T. und Jaillais, Y. (2014). A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **77**, 322–337.
- Smotrys, J.E., Schoenfish, M.J., Stutz, M.A. und Linder, M.E. (2005). The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p. *Journal of Cell Biology*. **170**, 1091–1099.
- Sorek, N., Poraty, L., Sternberg, H., Bar, E., Lewinsohn, E. und Yalovsky, S. (2007). Activation Status-Coupled Transient S Acylation Determines Membrane Partitioning of a Plant Rho-Related GTPase. *Molecular and Cellular Biology*. **27**, 2144–2154.
- Sorek, N., Bloch, D. und Yalovsky, S. (2009). Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Current Opinion in Plant Biology*. **12**, 714–720.
- Stahelin, R. V. (2009). Lipid binding domains: more than simple lipid effectors. *Journal of Lipid Research*. **50**, S299–S304.
- Steinhorst, L. und Kudla, J. (2013). Calcium and Reactive Oxygen Species Rule the Waves of Signaling. *Plant Physiology*. **163**, 471–485.
- Steinhorst, L., Mähs, A., Ischebeck, T., Zhang, C., Zhang, X., Arendt, S., Schültke, S., Heilmann, I. und Kudla, J. (2015). Vacuolar CBL-CIPK12 Ca²⁺-Sensor-Kinase Complexes Are Required for Polarized Pollen Tube Growth. *Current Biology*. **25**, 1475–1482.
- Surpin, M. und Raikhel, N. (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **5**, 100–109.
- Taiz, L. (1992). The Plant Vacuole. *The Journal of Experimental Biology*. **172**, 113–122.
- Takáč, T., Pechan, T., Šamajová, O., Ovečka, M., Richter, H., Eck, C., Niehaus, K. und Šamaj, J. (2012). Wortmannin treatment induces changes in *Arabidopsis* root proteome and Post-Golgi compartments. *Journal of Proteome Research*. **11**, 3127–3142.
- Tan, S., Tan, H.T. und Chung, M.C.M. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*. **8**, 3924–3932.
- Tang, R.-J., Zhao, F.-G., Garcia, V.J., Kleist, T.J., Yang, L., Zhang, H.-X. und Luan, S. (2015). Tonoplast CBL–CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **112**, 3134–3139.
- Tang, R.-J., Liu, H., Yang, Y., Yang, L., Gao, X.-S.S., Garcia, V.J., Luan, S. und Zhang, H.-X. (2012). Tonoplast calcium sensors CBL2 and CBL3 control plant growth and ion homeostasis through regulating V-ATPase activity in *Arabidopsis*. *Cell Research*. **22**, 1650–1665.
- Tavernier, E., Lê Quốc, D. und Lê Quốc, K. (1993). Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1167**, 242–247.
- Tkacz, J.S. und Lampen, J.O. (1975). Tunicamycin inhibition of Polyisoprenyl N-Acetylglucosaminyl Pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Communications*. **62**, 191–198.

- Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R.A., Ushiba, J. und McCormick, S.** (1991). Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes and Development*. **5**, 496–507.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H. und Nakano, A.** (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*. **20**, 4730–4741.
- Ueda, T., Uemura, T., Sato, M.H. und Nakano, A.** (2004). Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *The Plant Journal*. **40**, 783–789.
- Valdez-Taubas, J. und Pelham, H.** (2005). Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *The EMBO Journal*. **24**, 2524–2532.
- Veit, M.** (2000). Palmitoylation of the 25-kDa synaptosomal protein (SNAP-25) *in vitro* occurs in the absence of an enzyme, but is stimulated by binding to syntaxin. *The Biochemical Journal* **345** Pt 1, 145–151.
- Viotti, C., Kruger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boute, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M. und Schumacher, K.** (2013). The Endoplasmic Reticulum Is the Main Membrane Source for Biogenesis of the Lytic Vacuole in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **25**, 3434–3449.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. und Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* **33**, 949–956. **RETRACTED**
- Wilcox, C., Hu, J.S. und Olson, E.N.** (1987). Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science*. **238**, 1275–1278.
- Yalovsky, S., Rodríguez-Concepción, M. und Grisse, W.** (1999). Lipid modifications of proteins - Slipping in and out of membranes. *Trends in Plant Science*. **4** (11), 1360-1385.
- Yang, W., Vizio, D. Di, Kirchner, M., Steen, H. und Freeman, M.R.** (2010). Proteome Scale Characterization of Human S -Acylated Proteins in Lipid Raft-enriched and Non-raft Membranes. *Molecular and Cellular Proteomics*. **9**, 54–70.
- Yeung, T. und Grinstein, S.** (2007). Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunological Reviews*. **219**, 17–36.
- Yoshida, S. und Uemura, M.** (1986). Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts. *Plant Physiology*. **82**, 807–812.
- Yoshida, K., Ohnishi, M., Fukao, Y., Okazaki, Y., Fujiwara, M., Song, C., Nakanishi, Y., Saito, K., Shimmen, T., Suzaki, T., Hayashi, F., Fukaki, H., Maeshima, M. und Mimura, T.** (2013). Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from *Arabidopsis* suspension-cultured cells: Local distribution of vacuolar membrane proteins. *Plant and Cell Physiology*. **54**, 1571–1584.
- Zeng, Q., Wang, X. und Running, M.P.** (2007). Dual Lipid Modification of *Arabidopsis* Gy-Subunits Is Required for Efficient Plasma Membrane Targeting. *Plant Physiology*. **143**, 1119–1131.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C. und Korsmeyer, S.J.** (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*. **290**, 1761–1765.
- Zhang, C., Hicks, G. und Raikhel, N.** (2015). Molecular Composition of Plant Vacuoles: Important but Less Understood Regulations and Roles of Tonoplast Lipids. *Plants*. **4**, 320–333.

- Zhou, L.-Z., Li, S., Feng, Q.-N., Zhang, Y.-L., Zhao, X., Zeng, Y., Wang, H., Jiang, L. und Zhang, Y.** (2013). Protein S-ACYL TRANSFERASE10 is critical for development and salt tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **25**, 1093–1107.
- Zidovetzki, R. und Levitan, I.** (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1768**, 1311–1324.
- Zimmermann, P. und Zentgraf, U.** (2005). The correlation between oxidative stress and senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*. **10**, 515–534.

8 Abkürzungsverzeichnis

2-Br	2-Brompalmitat	CAX	<i>Cation/H⁺ exchanger</i>
2-FI	2-Fluorpalmitat	CBL	<i>Calcineurin B-like</i>
6xHis	6-faches Histidin-Peptid (HHHHHH)	CCT	Phosphocholin Cytidylyltransferase
A	Ala, Alanin	CDS	Codierende Sequenz
a	Aliphatische Aminosäure	CER	Cerulenin
ABA	<i>Abscisic acid</i> , Abszisinsäure	Chs	Chitin Synthase
ABE	<i>Acyl Biotin Exchange</i>	CIPK	CBL interagierende Proteinkinase
AH	Amphipathische Helix	CoA	Coenzym A
Akrp	<i>Ankyrin repeat-containing protein</i>	Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp <i>Columbia</i>
ALPS	<i>Amphipathic lipid packing sensor</i>	COPII	<i>Coat protein complex II</i>
APT	Acyl-Protein-Thioesterase	CRD	Cystein-reiche Domäne
Ara6	<i>Arabidopsis</i> Rab Guanosintriphosphatase 6	CTP	Cytidin 5'-Triphosphat
ArfGAP1	<i>ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1</i>	D	Asp, Aspartat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
BG Domäne	Domäne aus basischen Aminosäuren und Glycinresten	DRM	Detergenz-resistente Membran
BiBOP Assay	<i>Biotin Switch Assay</i> in Kombination mit 2- <i>Bromopalmitate</i> and <i>Overexpression of Protein-S- Acyltransferases</i> (BOP Assay)	E	Glu, Glutamat
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylenediamintetraessigsäure
BOP Assay	2-Bromopalmitate and <i>Overexpression of Protein-S- Acyltransferases</i>	ER	Endoplasmatisches Retikulum
C	Cys, Cystein	Erfp	<i>Effect on Ras function protein</i>
Ca²⁺	Calcium-Ion	EtOH	Ethanol
		F	Phe, Phenylalanin
		Flg22	22 Aminosäuren des Flagellins
		G	Gly, Glycin
		GFP	Grün fluoreszierendes Protein
		G-Protein	Guanosintriphosphat- bindendes Protein
		H	His, Histidin

HA	Hämagglutinin Peptid (YPYDVDPDYA)	PC	Phosphatidylcholin
HEK-293 Zellen	<i>Human embryonic kidney</i> Zellen (Zelllinie 293)	Pfap	<i>Protein fatty acyltransferase protein</i>
HIR	<i>Hypersensitive induced reaction protein</i>	PFT	Farnesyl Transferase
HPDP-Biotin	N-[6-(<i>Biotinamido</i>)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid	PGGT-I	Geranylgeranyl Transferase-I
I	Iso, Isoleucin	PH Domäne	Pleckstrin-Homologie Domäne
iBOP Assay	induzierbarer BOP Assay	PI	Phosphatidylinositol
K	Lys, Lysin	PI3P	Phosphatidylinositol 3 Phosphat
K⁺	Kalium-Ion	PI(3,4,5)P₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
K_v1.1	<i>K⁺ voltage-gated channel subfamily A member 1</i>	PI4P	Phosphatidylinositol 4 Phosphat
L	Leu, Leucin	PI4,5P₂	Phosphatidylinositol 4, 5 Bisphosphat
LB	<i>Lysogeny Broth</i>	PI(4,5)P₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
LiCl	Lithiumchlorid	PIP	Phosphatidylinositol Phosphat
M	Met, Methionin	pK_s	Säurekonstante
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin	PM	Plasmamembran
mCherry	monomeres Cherry Fluorophor (rot fluoreszierend)	Q	Gln, Glutamin
MeOH	Methanol	R	Arg, Arginin
N	Asn, Asparagin	Rab-GGT	Rab Geranylgeranyl Transferase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid phosphat	RIN4	<i>RPM2 (resistance to P. syringae pv. Maculicola) interacting protein 4</i>
NEM	N-Ethylmaleimid	ROP	<i>Rho of plants</i>
NMT	N-Myristyltransferase	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
P	Pro, Prolin	RPS2	<i>Resistance to Pseudomonas syringae 2</i>
p	Promotor	S	Ser, Serin
p21	21 kDa Proteine der <i>Ras (Rat sarcoma)</i> Gene	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PaCCT	<i>Palmitoyltransferase conserved C-terminus</i>	SD	<i>Synthetic Defined</i>
PAT	Protein-S-Acyltransferase		

SH4 Domäne	<i>Sarcoma homology 4</i>	YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
SNAP-25	<i>Syntaxin and 25-kDa synaptosomal protein</i>	YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
SNARE	<i>Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive-factor attachment Receptor</i>		
SpoVM	<i>Stage V Sporulation Protein M</i>		
Swfp	<i>Spore wall formation protein</i>		
sXVE	Synthetischer chimärer Transkriptionsfaktor aus dem bakteriellen Repressor LexA (X), der azidischen Transaktivierungsdomäne des viralen Proteins VP16 (V) und der regulatorischen Domäne des humanen Östrogenrezeptors (ER [E])		
T	Thr, Threonin		
T-DNA	<i>Transfer-Deoxyribonucleic acid</i> , Transfer-Desoxyribonukleinsäure		
TIP1	<i>Tip growth defective 1</i> (hier PAT24)		
TM	Tunicamycin		
TMD	Transmembrandomäne		
V	Val, Valin		
Vac8p	<i>Vacuolar related protein 8</i>		
V-ATPase	Vakuoläre H ⁺ -Adenosintri-phosphatase		
V-PPase	Vakuoläre H ⁺ -Pyrophosphatase		
W	Trp, Tryptophan		
X	Beliebige Aminosäure		
Y	Tyr, Tyrosin		
YEB	<i>Yeast Extract Broth</i>		
yeGFP	<i>yeast enhanced GFP</i>		
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>		

9 Anhang

Tabelle A1: Liste der hier verwendeten Oligonukleotide. Angegeben sind der jeweilige Name, die Nukleotidsequenz, der Verwendungszweck und die Labor-interne Nummer. Restriktionsschnittstellen sind durch Großbuchstaben markiert. 3 – 4 5'-N-Überhänge dienen der Erhöhung der Restriktionseffizienz.

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Nummer
CBL2_XbaI_for	tttTCTAGAAAAatgtcgcagtg cggtgacg	CBL2 Amplifikation	3887
CBL2GFP_rev	tttCCCGGGggtatcttcaacctg agaatgg	CBL2 Amplifikation	1119
CBL2CACfor	aaaTCTAGAtgaaaaatgtcgc agtgcgttgacggatcaagcattta gctacctgttttaggggttttgatc	Erstellung eines CBL2 ^{CAC} Proteins	/
CBL2CCAfor	aaaTCTAGAtgaaaaatgtcgc agtgcgttgacggatcaagcatttat gcacctgttttaggggttttgatctt gattgtataaacaatctg	Erstellung eines CBL2 ^{CCA} Proteins	/
CBL2ACCfor	aaaTCTAGAtgaaaaatgtcgc aggctgttgacggatcaagcatttat gcacctgttttaggggttttgatc	Erstellung eines CBL2 ^{ACC} Proteins	/
CBL2CxxxAfor	aatgaTCTAGAAAAatgtcgc aggctgttgacggatcaagcattta gctacctgttttaggggttttgatct tgattgtataaacaatctg	Erstellung eines CBL2 ^{AAA} Proteins	/
CBL2nT13Pfor	tttGGATCCtgaaaaatgtcgc gtgcgttgacggatcaagcatttatg ccctctgttttaggggttttgatcttg	Erstellung eines CBL2 ^{T13P} Proteins	/
CBL2 C12A F19C_XbaI_for	tttTCTAGAAAAatgtcgcagtg cggtgacggatcaagcatttagcca cctctgttttaggggttttgatctgatt t	Erstellung des CBL2 ^{C12A,F19C} Proteins	/
CBL2_XmaI_6xHis+Stop_ SacI_rev	aaaaGAGCTCtcaatgatgatg atgatgatgCCCGGGggtatctt caacctgagaatgg	Fusion von CBL2 mit C- terminalem sechsfachen Histidin-Peptid (6xHis)	/
CBL3_Bam_for	tttGGATCCatgtcgcagtgcata gac	CBL3 Amplifikation	671
CBL3_Xba_for	tttTCTAGAAAAatgtcgcagtg atagac	CBL3 Amplifikation	1623
CBL3RII	tttCCCGGGggtatcttccacctg cg	CBL3 Amplifikation	495
yeGFPCBL3ntermXba	tttTCTAGAAagatgtcgcagtg atagacggttcaagcatgatgctc ctctttttccgggttttgatcgattct aaaggtgaagaattattcactgg	Erstellung des CBL3n:yeGFP Fusionsproteins	
CBL6F2	tttGGATCCcatgatgatgcaatg tttaga	CBL6 Amplifikation	482
yeGFPCBL6ntermXba	tttTCTAGAAagatgatgatgcaa tgtttagatggattaaagcacttagcc ttaattctgtgactgtgtgatgctct aaaggtgaagaattattcactgg	Erstellung des CBL6n:yeGFP Fusionsproteins	

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Nummer
CBL6_GFP_rev	tttCCCGGGTccatccagctcact aggagt	CBL6 Amplifikation	485
CBL6 A13C C20F_BamHI_for	ttttGGATCCaaaatgatgatgca atgtagatggattaaagcacttatg cttaattctgtgactgtttgatgctga tctc	Erstellung des CBL6 ^{A13C,C20F} Proteins	/
PAT01for	aaaaTCTAGAaaaatgtctctc agaatctgaacg	PAT01 Amplifikation	1456
PAT01rev	ttttCTCGAGccgttcttagcttcg gaatc	PAT01 Amplifikation	1457
PAT02for	ttttTCTAGAaaaatggggagga agaaaagctg	PAT02 Amplifikation	1411
PAT02_Sall_for	ttttGTCGACaaaatggggagga agaaaagctg	PAT02 Amplifikation	3661
PAT02rev	aaaaGGTACCcctcgatctcac atcaatgc	PAT02 Amplifikation	1412
PAT03forXba	tttTCTAGAtgaaaaatgcagag ggagagaatgagc	PAT03 Amplifikation	1553
PAT03revXma	aaaaCCCGGGcctgggcaagt ctagttgagatg	PAT03 Amplifikation	1554
AtPAT4for	aaaaTCTAGAaaaatggcttg aatgagaccaaac	PAT04 Amplifikation	1289
PAT04_BamHI_for	ttttGGATCCaaaatggcttgaa tgagaccaaac	PAT04 Amplifikation	3662
AtPAT4rev	aaaaCTCGAGtttacgaagcatt ggtgaagtgg	PAT04 Amplifikation	1290
AtPAT5for	ttttTCTAGAaaaatgtagattgc agccgtcag	PAT05 Amplifikation	1256
AtPAT5rev	ttttCCCGGGtaaccgccctatac cagttcc	PAT05 Amplifikation	1257
PAT06forSpe	ttttactagttgaaaaatgtatgtggtg acgcctcc	PAT06 Amplifikation	1555
PAT06revXho	aaaaCTCGAGagctcttctgct gataaggc	PAT06 Amplifikation	1556
PAT7for	ttttTCTAGAaaaatgtatgtagt ctccgcc	PAT07 Amplifikation	1413
PAT7rev	aaaaCCCGGGgttaggccggtt ctccgtc	PAT07 Amplifikation	1414
AtPAT8for	ttttGGATCCaaaatgacacaac gggtattccaag	PAT08 Amplifikation	1291
AtPAT8rev	aaaaCCCGGGtcccctccatc ctttgctg	PAT08 Amplifikation	1292
PAT09forSpe	ttttACTAGTgaaaaatggctgg acgggtcttcg	PAT09 Amplifikation	1557
PAT09revXho	aaaaCTCGAGccgtccctcctct gcag	PAT09 Amplifikation	1558
PAT10for	tttGGATCCaaaatggcggttgg gcccttc	PAT10 Amplifikation	1258

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Nummer
PAT10rev	aaaaCCCGGGgcagcagcga cattcaac	PAT10 Amplifikation	1259
pat10.1_rev	aaaaCCCGGGgtgaaaaatca atagaagcagcac	Amplifikation des PAT10.1 Transkripts aus der <i>pat10</i> T-DNA Insertionslinie SALK_024964	4394
pat10.2_rev (pat10.3)	aaaaCCCGGGaatatgacaag cagcagtatgata	Amplifikation des PAT10.3 Transkripts aus der <i>pat10</i> T-DNA Insertionslinie SALK_018436	4395
N-PAT10.PAT11-C	cttgatTTTTgtgctgcttattgcaac agcttagctatatctatgaag	Erstellung des chimären PAT10 ^{11C} Proteins	/
PAT10_11DHHC	caacgcttctgcagtatTTTgtagctTTT aatgtgccgggaag	Erstellung des chimären PAT10 ^{11DHHC} Proteins	/
11DHHC_PAT10	gttggtgcgggtaatcacaattctg gtggtacatctgtgaag	Erstellung der chimären Proteine PAT10 ^{11DHHC} und PAT10 ^{11DHHC+C}	/
N-PAT10.PAT11-C93bp	cgtttagcagaggaattcgggtgccg gaatctTTTgactTTTTc	Erstellung des chimären PAT10 ^{11C.31AS} Proteins	/
PAT11for	tttTCTAGAAAAatggaagattctt cccagggg	PAT11 Amplifikation	1260
PAT11_forBamHI	tttGGATCCaaaatggaagattc ttcccaggg	PAT11 Amplifikation	/
PAT11rev	aaaaCCCGGGgtgcttatgtctct tcctcaag	PAT11 Amplifikation	1261
N-PAT11.PAT10-C	ggctaagtTTTgtgctggattTTTcac agctacctaatttgac	Erstellung des chimären PAT11 ^{10C} Proteins	/
PAT11_10DHHC	cgctctcaacattattctcgttactct ggctctcacctgg	Erstellung der chimären Proteine PAT11 ^{10DHHC} und PAT11 ^{10DHHC+C}	/
10DHHC_PAT11	tataggccagaaaaaccatagtaa atactcatagcattccttatctcag	Erstellung des chimären PAT11 ^{10DHHC} Proteins	/
N-PAT11.PAT10-C123bp	cagaagaagatggtgaaaaaagc aggaacctatacaacgtctgtg	Erstellung des chimärenPAT11 ^{10C.41AS} Proteins	/
AtPAT12for	tttTCTAGAAAAatgaacctttc cggttctgc	PAT12 Amplifikation	1293
AtPAT12rev	aaaaCCCGGGagggtgatgt cagaacaag	PAT12 Amplifikation	1294
PAT13for	aaaaTCTAGAAAAatggcgtgg aacgtgttcaag	PAT13 Amplifikation	1458
PAT13rev	tttCCCGGGtagagactgaagc ggctctg	PAT13 Amplifikation	1459
PAT14for	tttTCTAGAAAAatgcatagatct ggtacaacaatg	PAT14 Amplifikation	1502
PAT14rev	aaaaCCCGGGctgggaatcaa agtcgggttc	PAT14 Amplifikation	1503

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Nummer
AtPAT15for	ttttCTAGAAAAatgggttcgtg attacgtcac	PAT15 Amplifikation	1295
AtPAT15rev	aaaaCCCGGGgctgtctctcgat gcagaaaag	PAT15 Amplifikation	1296
PAT16forXba	ttttCTAGAtgaaaaatgaaacg gaaaggagtcgg	PAT16 Amplifikation	1559
PAT16revXma	aaaaCCCGGGatgttttgttcag atgaatcagg	PAT16 Amplifikation	1560
PAT17for	tttCTAGAAAAatggcggtaca gtggctttg	PAT17 Amplifikation	1262
PAT17rev	aaaaCCCGGGtccgatttcggt ttgattgttg	PAT17 Amplifikation	1263
AtPAT18for	ttttCTAGAAAAatgtgtactgct ttgtgcag	PAT18 Amplifikation	1146
AtPAT18rev	aaaaCCCGGGtcttggtgatgct tcactcc	PAT18 Amplifikation	1147
PAT19for	aaaaTCTAGAAAAatggtgag gaaacatggttg	PAT19 Amplifikation	1460
PAT19rev	tttCCCGGGcctgcgggtaccta cagg	PAT19 Amplifikation	1461
PAT20for	tttACTAGTaaaatggtgagga aacacggttg	PAT20 Amplifikation	1415
PAT20rev	aaaaCCCGGGcctgatgtaga accggttg	PAT20 Amplifikation	1416
PAT21for	ttttCTAGAAAAatggcgagaa gacatggatgg	PAT21 Amplifikation	1504
PAT21rev	aaaaCCCGGGatggaatctagt agataaatgtctgtg	PAT21 Amplifikation	1505
PAT22for	tttGGATCCaaaatgaggaaac atggatggcag	PAT22 Amplifikation	1417
PAT22rev	aaaaCCCGGGtcttgattgtgg atgttctag	PAT22 Amplifikation	1418
PAT23forSpe	ttttactagttgaaaaatggactcatc agagatcgaag	PAT23 Amplifikation	1561
PAT23revXho	aaaaCTCGAGgagaattgaag acgggacaac	PAT23 Amplifikation	1562
TIP1PATforXho (PAT24)	tttCTCGAGaaaatgtcatcgga gattgaggtg	PAT24 Amplifikation	734
TIP1PATrevXma (PAT24)	aaaaCCCGGGtgagatacaa caggtcggg	PAT24 Amplifikation	735
HIR1_BamHI_for	tttGGATCCaaaatgggtcaag ctttgggtg	HIR1 Amplifikation	3798
AtHIR1_Sall_rev	aaaaGTTCGACctcagcagcag agttacc	HIR1 Amplifikation	/
HIR1_XmaI_rev	aaaaCCCGGGctcagcagcag agttacc	HIR1 Amplifikation	3799

Name	Sequenz (5´ - 3´)	Verwendung	Nummer
AtHIR1.G2A_BamHI_for	tttGGATCCaaaatggctcaag ctttgggttg	Mutagenese HIR1 ^{G2A}	4221
AtHIR1deIN_BamHI_for	tttGGATCCaaaatgattcaagtt gatcagtcgaatg	Deletion der ersten 7 Aminosäuren von HIR1 (HIR1 ^{ΔN})	/
AtHIR2_BamHI_for	tttGGATCCaaaatggggaatct ttctgtgcg	HIR2 Amplifikation	4017
AtHIR2_XmaI_rev	aaaaCCCGGGggaggcattgtt ggcctg	HIR2 Amplifikation	4018
AtHIR2_SaII_rev	aaaaGTCGACggaggcattgtt ggcctg	HIR2 Amplifikation	4223
AtHIR2.G2A_BamHI_for	tttGGATCCaaaatggcgaatct ttctgtgcg	Mutagenese HIR2 ^{G2A}	4222
HIR2G2A.C7A_BamHI_for	aaaaGGATCCaaaatggcgaa tctttctgtgccgtgcttg	Mutagenese HIR2 ^{G2A,C7A}	4404
HIR2G2A.C6A.C7A_BamHI_for	aaaaGGATCCaaaatggcgaa tctttcgtgccgtgcttg	Mutagenese HIR2 ^{G2A,C6&7A}	4405
ADH-Prom-For	ctgcacaatattcaagc	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGAD.GH Plasmid	Vektor Box
ADH-Term-Rev	ggcgaagaagtccaaagc	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGAD.GH Plasmid	Vektor Box
MAS-For	ccaatacattacactagcatctg	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGPTVII Plasmid	Vektor Box
NosT-Rev	catctcataaataacgctcatgcatta c	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGPTVII Plasmid	Vektor Box
UBI10-For	gtcgaataattactcttcgatttg	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGPTVII Plasmid	Vektor Box
HspT18.2_TerM_rev	gacacaccaaattttcatcttc	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGPTVII Plasmid	2246
GFP-Rev	caacaagaattgggacaactcc	Sequenzieren und Überprüfen von Konstrukten im pGPTVII Plasmid	Vektor Box
LB-SALK_1	gtgatggttcacgtagtg	Genotypisierung von T- DNA Insertionslinien	61
RB-SALK_1	gagactctaattggataccgag	Genotypisierung von T- DNA Insertionslinien	62

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung	Nummer
HA3_rev	aaaGAGCTCtcaggcgtaatca gggacatcgtagcgatgtagt caggcacgataagggaagcat aatctggaacatcgtaggataccc gggagcggtagccc	Erstellung eines Plasmids mit C-terminalem dreifachen HA-Peptid (3xHA)	
MCS.6xHis.SacI_rev	aaaaGAGCTCtcaatgatgatg atgatgatgCCCGGGAGCG GTACCC	Erstellung eines Plasmids mit Polylinker (MCS) und C-terminalem sechsfachen Histidin-Peptid (6xHis)	/

Tabelle A2: Liste der verwendeten Plasmide. Hier werden Plasmidname, eine kurze Beschreibung des Plasmids, die zugehörigen Selektionsmarker, sowie Herstellerangaben und Verwendungszweck zusammengefasst.

Plasmid	Beschreibung	Selektion	Hersteller	Verwendung
pVT-U	pVT102-U Plasmid mit Alkohol Dehydrogenase (ADH) Promotor und Terminator	Ampicillin (<i>E. coli</i>) Uracil (<i>S. cerevisiae</i>)	Vernet et al. 1987	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>
pGAdh:3xHA _c	pGAD.GH Plasmid, bei dem die Aktivierungsdomäne (AD) durch einen Polylinker (<i>multiple cloning site</i> , MCS) mit C-terminalem dreifachen HA-Peptid substituiert wurde, ADH Promotor und Terminator	Ampicillin (<i>E. coli</i>) Leucin (<i>S. cerevisiae</i>)	Bartel und Fields 1997; während dieser Arbeit modifiziert	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>
pGAdh.H:yeGFP _c	pGAD.GH Plasmid, bei dem die AD durch eine MCS mit C-terminalem yeGFP Fluorophor substituiert wurde, ADH Promotor und Terminator	Ampicillin (<i>E. coli</i>) Histidin (<i>S. cerevisiae</i>)	Bartel und Fields 1997; modifiziert von O. Batistič, unpubliziert	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>
pGAdh.H:3xHA _c	pGAD.GH Plasmid, bei dem die AD durch eine MCS mit C-terminalem dreifachen HA-Peptid substituiert wurde, ADH Promotor und Terminator	Ampicillin (<i>E. coli</i>) Histidin (<i>S. cerevisiae</i>)	Bartel und Fields 1997; während dieser Arbeit modifiziert	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>

Plasmid	Beschreibung	Selektion	Hersteller	Verwendung
pVac8.U:yeGFP_c	pGAD.GH Plasmid, bei dem die AD durch eine MCS mit C-terminalem yeGFP Fluorophor substituiert wurde, Vac8 (<i>vacuolar related protein 8</i>) Promotor und ADH Terminator	Ampicillin (<i>E. coli</i>) Uracil (<i>S. cerevisiae</i>)	Bartel und Fields 1997; modifiziert von O. Batistič, unpubliziert	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>
pGAdh.U:yeGFP_c	pGAD.GH Plasmid, bei dem die AD durch eine MCS mit C-terminalem yeGFP Fluorophor substituiert wurde, ADH Promotor und Terminator	Ampicillin (<i>E. coli</i>), Uracil (<i>S. cerevisiae</i>)	Bartel und Fields 1997; modifiziert von O. Batistič, unpubliziert	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>
pGPTV-II-bar/MAS	pGPTVII Plasmid mit Mannopin Synthase (MAS) Promotor, Nopalin Synthase (Nos) Terminator und C-terminalem mCherry oder GFP Fluorophor	Kanamycin (<i>E. coli</i>) Basta (<i>in planta</i>)	Walter et al. 2004; Batistič 2012	Transiente Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i>
UBI10:GFP_c:Hsp18.2T	pGPTVII Plasmid mit Ubiquitin10 Promotor, Hsp (<i>heat shock protein 18.2</i>) Terminator und C-terminalem GFP Fluorophor	Kanamycin (<i>E. coli</i>) Basta (<i>in planta</i>)	Walter et al. 2004; modifiziert von O. Batistič, unpubliziert	Transiente Proteinexpression in <i>A. thaliana</i>
MAS:6xHis_c:Hsp18.2T	pGPTVII Plasmid mit MAS Promotor, Hsp18.2 Terminator und C-terminalem sechsfachen Histidin Peptid (6xHis)	Kanamycin (<i>E. coli</i>), Basta (<i>in planta</i>)	Walter et al. 2004; Batistič 2012; während dieser Arbeit modifiziert	Transiente Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i>
pUC-LAT52	pUC19 Plasmid mit pollenspezifischem LAT52-Promotor und C-terminalem mVenus/mCherry Fluorophor	Ampicillin (<i>E. coli</i>)	Twell et al. 1991; Mähs et al. 2013	Transiente Proteinexpression in <i>N. tabacum</i> Pollenschläuchen
pCBL2:GFP_c:Hsp18.2T	pGPTVII Plasmid mit CBL2 Promotor, Hsp18.2 Terminator und C-terminalem GFP Fluorophor	Kanamycin (<i>E. coli</i>), Basta (<i>in planta</i>)	Walter et al. 2004; modifiziert von O. Batistič, unpubliziert	Stabile Proteinexpression in <i>A. thaliana</i>

Plasmid	Beschreibung	Selektion	Hersteller	Verwendung
SUPERR:sXVE:Bar	β-Estradiol induzierbares pGPTVII Plasmid mit SUPERR Promotor, Nos Terminator und C-terminalem GFP/mCherry Fluorophor	Kanamycin (<i>E. coli</i>) Basta (<i>in planta</i>)	Schlücking et al. 2013	Induzierbare transiente Proteinexpression in <i>N. benthamiana</i>

Tabelle A3: Auflistung der selbst konstruierten rekombinanten DNA. Angegeben ist die CDS der Proteine und die Plasmide, in welche die CDS eingebracht wurden. Zusätzlich sind die Restriktionsschnittstellen der Plasmidinsertion und die eigenen Stocknummern angegeben. Nicht selbst konstruierte rekombinante DNA wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit fertiggestellt und ist hier nicht aufgeführt.

CDS	Plasmid	Restriktionsschnittstellen	Eigene Stocknummer
PAT01	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	XbaI/XhoI	LB133
PAT01:3xHA	pGAdh.H:yeGFP	XbaI/SacI	LB80
PAT02	pGAdh.H:3xHA	XbaI/Agel	LB142
	pUC-LAT52:mVenus _c	Sall/Agel in Sall/XmaI Plasmid	LB116
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	XbaI/KpnI	LB109
PAT03	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB35
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	XbaI/XmaI	LB110
PAT03:3xHA	pGAdh.H:yeGFP	XbaI/SacI	LB125
PAT04	pGAdh.H:3xHA _c	XbaI/XhoI	LB81
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	XbaI/XhoI	LB111
PAT05	pGAdh.H:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB130
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	XbaI/XmaI	LB119
PAT06	pGAdh:3xHA _c	SpeI/XhoI	LB75
	pGAdh.H:3xHA _c	SpeI/XhoI	LB82
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	SpeI/XhoI	LB122
PAT07	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB24
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	XbaI/XmaI	LB120
PAT07:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB78
PAT08	pGAdh:3xHA _c	BamHI/XmaI	LB25
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	BamHI/XmaI	LB121
PAT08:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	AscI/SacI	LB83
PAT09	pGAdh.H:3xHA _c	SpeI/XmaI in XbaI/XmaI Plasmid	LB194
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	SpeI/XhoI	LB132

CDS	Plasmid	Restriktionsschnittstellen	Eigene Stocknummer
PAT10	pGAdh:3xHA _c	BamHI/XmaI	LB26
	pGAdh.H:3xHA _c	AscI/XmaI	LB131
	SUPERR:sXVE:GFP _c :Bar	BamHI/XmaI	LB112
	pUC-LAT52:mVenus _c	BamHI/XmaI	LB118
PAT10^{DHHA}	pGAdh:3xHA _c	BamHI/XmaI	LB165
PAT10.1	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB182
PAT10.3	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB183
	pGAdh:3xHA _c	BamHI/XmaI	LB59
PAT10^{11C}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB77
PAT10^{11DHHC}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB97
PAT10^{11DHHC+C}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB69
PAT10^{11C.31AS}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB91
PAT11:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB79
PAT11^{10C}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB50
PAT11^{10DHHC}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB71
PAT11^{10DHHC+C}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB70
PAT11^{10C.41AS}	pGPTV-II-bar/MAS:GFP _c	BamHI/XmaI	LB92
PAT12	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB33
PAT12:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB143
PAT13	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB20
PAT13:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB144
PAT14	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB28
PAT14:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB145
PAT15	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB15
PAT15:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB146
PAT16	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB18
	pGAdh.H:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB191
PAT17	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB19
PAT17:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB147
PAT18	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB36
PAT18:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB85
PAT19	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB16
PAT19:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB148
PAT20	pGAdh:3xHA _c	SpeI/XmaI	LB37
PAT20:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB151
PAT21	pGAdh:3xHA _c	XbaI/XmaI	LB21
PAT21:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB149
PAT22	pGAdh:3xHA _c	BamHI/XmaI	LB22
PAT22:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB152

CDS	Plasmid	Restriktionsschnittstellen	Eigene Stocknummer
PAT23	pGAdh:3xHA _c	SpeI/XhoI	LB38
	pGAdh.H:3xHA _c	SpeI/XhoI in XbaI/XhoI Plasmid	LB192
PAT24	pGAdh:3xHA _c	XhoI/XmaI	LB34
PAT24:3xHA	pGAdh.H:yeGFP _c	XbaI/SacI	LB153
CBL2	pGAdh.U:yeGFP _c	XbaI/XmaI	LB98
CBL2:6xHis	pGPTV-II-bar/MAS	XbaI/SacI	LB40
CBL2^{CAC}	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	XbaI/XmaI	LB96
CBL2^{CAC}:yeGFP	pVT-U	XbaI/SacI	LB102
CBL2^{CAC}:6xHis	pGPTV-II-bar/MAS	XbaI/SacI	LB41
CBL2^{AAA}	pGPTV-II-bar/MAS	XbaI/XmaI	LB76
CBL2^{AAA}:6xHis	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	XbaI/SacI	LB42
CBL2^{C12A,F19C}	pGPTV-II-bar/MAS	XbaI/XmaI	LB173
	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	XbaI/XmaI	LB198
CBL2^{T13P}	pGAdh.U:yeGFP _c	XbaI/XmaI	LB190
	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c		
CBL3	pGPTVIIbar/MAS:mCherry	XbaI/XmaI	LB94
CBL3n:yeGFP	pVT-U	XbaI/SacI	LB43
CBL6	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/XmaI	LB90
		BamHI/XmaI	LB115
CBL6n	SUPERR:sXVE:mCherry _c :Bar	XbaI/SacI	LB44
CBL6^{A13C,C20F}	pVT-U	BamHI/XmaI	LB193
	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/XmaI	LB196
	pGAdh.U:yeGFP _c		
HIR1	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/XmaI	LB124
		BamHI/SalI	LB140
HIR1^{G2A}	pVac8.U:yeGFP _c	BamHI/XmaI	LB205
	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/SalI	LB206
HIR1^{ΔN}	pVac8.U:yeGFP _c	BamHI/SalI	LB141
	pVac8.U:yeGFP _c		
HIR2	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/XmaI	LB134
HIR2^{G2A}	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/SalI in BamHI/XhoI Plasmid	LB171
HIR2^{G2A,C7A}		BamHI/SalI in BamHI/XhoI Plasmid	LB176
HIR2^{G2A,C6&7A}	pGPTV-II-bar/MAS:mCherry _c	BamHI/SalI in BamHI/XhoI Plasmid	LB177

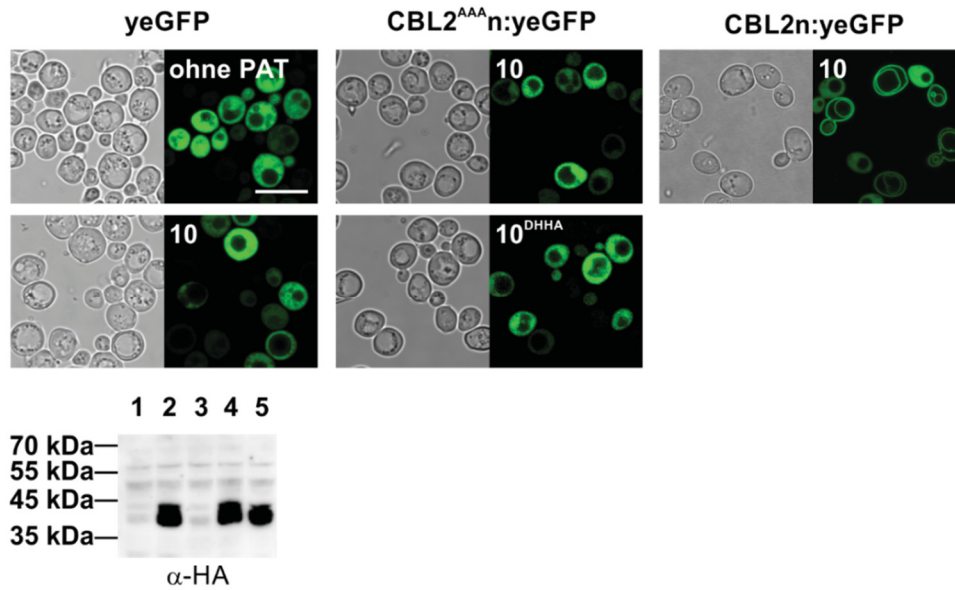


Abb. A1: Die Bindung von CBL2n an die Vakuolenmembran in Hefezellen wird über die S-Acylierung der drei N-terminalen Cysteine von CBL2 vermittelt. Das Fluoreszenzprotein yeGFP wurde allein oder mit PAT10 koexprimiert. Zusätzlich wurde ein nicht-acylierbares CBL2^{AAA}n:yeGFP mit PAT10 und einer katalytisch inaktiven PAT10^{DHHA} in Hefezellen koexprimiert. Zum besseren Vergleich ist hier zusätzlich die Koexpression der Proteine PAT10 und CBL2n aus Abb. 23 gezeigt. Maßstab: 10 µm.

In einer Western Analyse (unten) wurde die Expression von PAT10.3xHA und PAT10^{DHHA}.3xHA nachgewiesen. 1: yeGFP 2: yeGFP + PAT10.3xHA 3: CBL2^{AAA}n:yeGFP 4: CBL2^{AAA}n:yeGFP + PAT10.3xHA 5: CBL2^{AAA}n:yeGFP + PAT10^{DHHA}.3xHA.

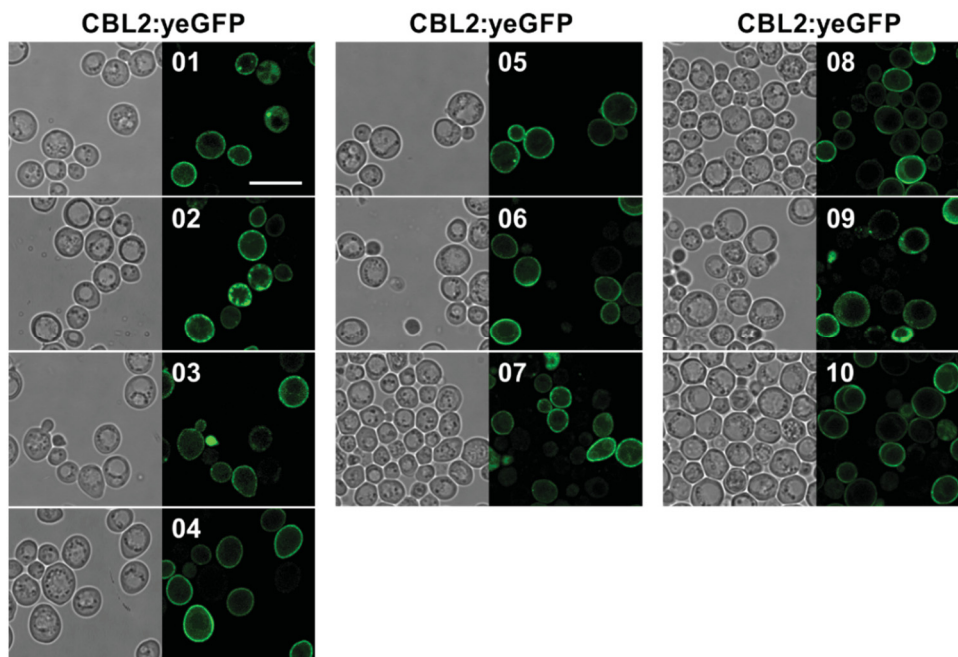


Abb. A2: Das vollständige CBL2 Protein wird durch die gleichen PATs erkannt wie der CBL2 N-Terminus. CBL2:yeGFP wurde mit den PATs 01 – 10 in Hefezellen koexprimiert. Alle hier getesteten PATs ermöglichten eine Bindung von CBL2:yeGFP an die Plasmamembran und Vakuolenmembran der Hefezellen. Maßstab: 10 µm.

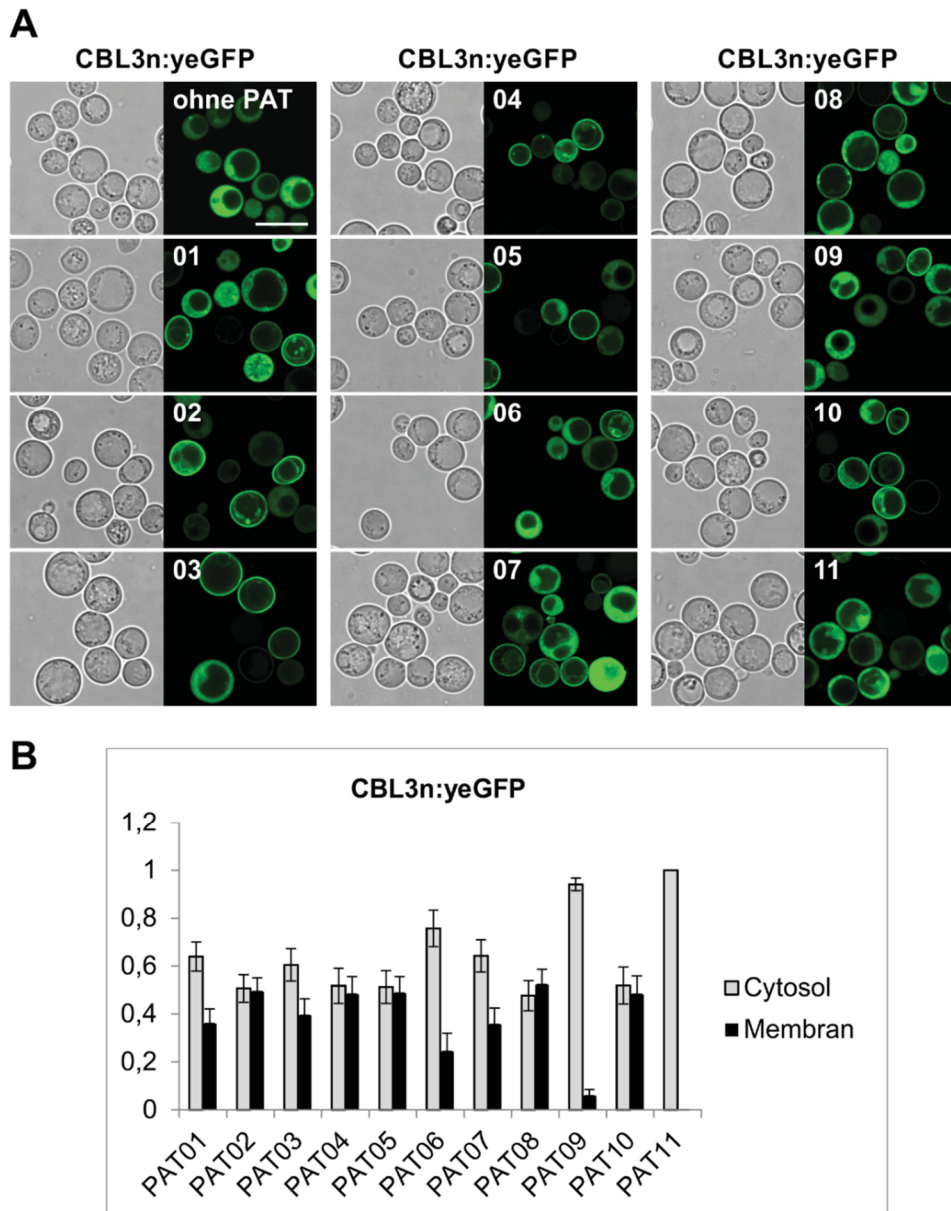


Abb. A3: CBL3n wird durch die gleichen PATs an die Membranen von Hefezellen gebunden wie CBL2n. **A:** PAT01 – 11 wurden zusammen mit dem CBL3 N-Terminus (CBL3n:yeGFP) in Hefezellen koexprimiert. Ohne koexprimierte PAT zeigte CBL3n:yeGFP eine cytosolische Lokalisation. Bei Koexpression der PATs 01 – 10 wurde CBL3n:yeGFP an die Plasmamembran und Vakuolenmembran der Hefezellen gebunden. Diese PATs vermittelten auch schon die Membranbindung von CBL2n:yeGFP. Maßstab: 10 μ m. **B:** Das Diagramm zeigt die Verhältnisse der Hefezellen mit membrangebundener und cytosolischer Fluoreszenz nach den Koexpressionen von CBL3n:yeGFP mit den *Arabidopsis* PATs 01 - 11. Dazu wurden jeweils ca. 100 Hefezellen jeder PAT-CBL3n Kombination ausgewählt und die Anzahl der Hefezellen mit fluoreszierendem Signal an Membranen und im Cytosol bestimmt.

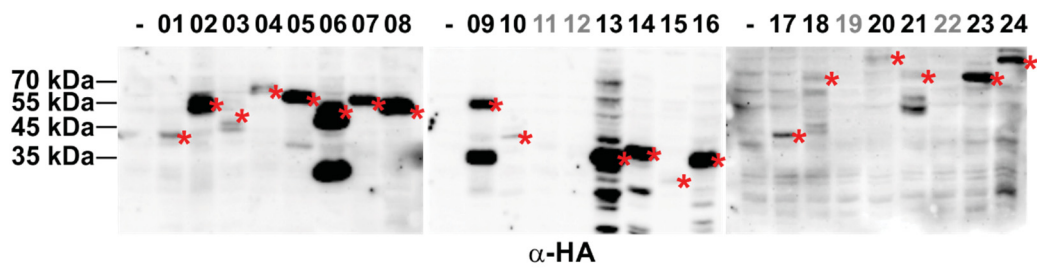


Abb. A4: Nachweis der Proteinexpression der *Arabidopsis* PATs nach Koexpression mit CBL6n:yeGFP in der Hefe *pat* Sechsfachmutante. Die Proteine wurden aus den Hefezellen isoliert und eine Western Analyse durchgeführt. Die Zahlen geben die jeweilige PAT an. Die roten Sternchen rechts neben den Proteinbanden zeigen die Größe des jeweiligen Enzyms an. Bis auf die PATs 11, 12, 19 und 22 (grau markiert) wurden hier alle PATs nachgewiesen.

