

Biochemische und zellbiologische Charakterisierung
des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE
und seiner Interaktoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Tobias Pacher
aus Kirchheim/Teck

2003

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2003
Dekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerd Jürgens
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Fritz Schöffl

Meinem Vater

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Entwicklungs-genetik am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen der Universität Tübingen durchgeführt. Prof. Dr. Gerd Jürgens möchte ich für die Überlassung des Themas danken, die mir gewährte Freiheit bei dessen Bearbeitung sowie die wissenschaftliche Diskussion und Unterstützung, derer ich mir stets sicher sein konnte, wenn sie notwendig war. Bei Prof. Dr. Fritz Schöffl möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor, die zu offenen Diskussionen animierte, und die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft danke ich allen Kollegen recht herzlich. Zudem möchte ich mich für den vielen Spaß, den ich zweifelsohne bei der Arbeit hatte, bei allen Kollegen und ganz besonders bei denen im Großraumlabor bedanken. Für die Unterstützung bei den ersten Gehversuchen im Labor danke ich Georg Stropfen, Axel Völker, Philippe Nacry, und ganz besonders Maren Heese, die immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme im Labor hatte.

Für die Unterstützung bei diversen Klonierungen danke ich Katharina Steinborn, Isabel Müller und Derek van Lonkhuyzen. Für die Bereitstellung verschiedener Bakterienstämme möchte ich mich bei Axel Völker, Maren Heese und Isabel Müller bedanken. Zudem danke ich Katharina Steinborn, Niko Geldner, Jirí Friml und Georg Stropfen für die Suche nach T-DNA-Linien sowie deren Bereitstellung für weiterführende Experimente. Für die Bereitstellung der Pflanzenlinien MM125 und X37-2 danke ich Ulrike Mayer. Nicht zu vergessen ist die Arbeit von Brigitte Schneck in der Spülküche, für die ich mich bedanken möchte. Bei Toni Weinschenk möchte ich mich für die massenspektrometrischen Analysen bedanken. Für zahlreiche Diskussionen und Anregungen danke ich Niko Geldner, Maren Heese und vor allem Martin Guttenberger, dessen enger Zusammenarbeit ich unter anderem die Einführung in die Mikrogeltechniken und diverse biochemische Tricks verdanke. Zudem danke ich Martin Guttenberger für die Unterstützung bei der Proteinreinigung. Schließlich möchte ich mich für die kritische und schnelle Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit bei Martin Guttenberger, Georg Stropfen, Gerd Jürgens und Claudia Dangelmayr bedanken.

Dass mir die Bodenhaftung nicht verloren gegangen ist, den Kontakt zur Welt außerhalb der Käseglocke Tübingens und so manche Abwechslung aus dem Alltagstrott verdanke ich meinen Freunden in Neckartailfingen, Großbettlingen und Umgebung sowie meiner Familie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Claudia Dangelmayr bedanken!

Nichts auf der Welt ist so gerecht verteilt wie der Verstand.
Denn jedermann ist überzeugt, dass er genug davon habe.

René Descartes, frz. Mathematiker u. Philosoph, 1596-1650

Inhaltsverzeichnis

Tabellen, Abbildungen, Abkürzungen, Veröffentlichungen

Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Cytokinese somatischer Zellen Höherer Pflanzen.....	3
1.2 Das SNARE-Modell.....	6
1.3 Die homotypische Membranfusion (Vakuolenfusion in Hefe).....	7
1.4 Die Interaktion von Sec1/Munc18-Proteinen mit Syntaxinen.....	10
1.5 Membranfusion während der Cytokinese von Arabidopsis.....	12
1.6 Biologische Fragestellung der Arbeit.....	14
2. Ergebnisse.....	15
2.1 Der putative KNOLLE-Interaktor Syb4.....	15
2.1.1 <i>Gewebespezifische Expression und Membranassoziation von Syb4</i>	15
2.1.2 <i>Die syb4 T-DNA-Insertionslinie 1004</i>	17
2.1.3 <i>Klonierung von Myc-Syb4</i>	18
2.1.4 <i>Etablierung von Myc-Syb4 transgenen Pflanzenlinien mit homozygot mutantem SYB4 Gen</i>	21
2.1.5 <i>Analyse der Myc-Syb4 exprimierenden Linie HH1</i>	22
2.1.5.1 Vergleich der Lokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE	22
2.1.5.2 Detaillierte Analyse der subzellulären Lokalisation von Syb4	23
2.1.5.3 Subzelluläre Verteilung von Myc-Syb4 bei Inhibierung der Sekretion durch BFA	26
2.2 Die Interaktion des Sec1/Munc18-Proteins KEULE mit dem cytokinespezifischen Syntaxin KNOLLE.....	31
2.2.1 <i>Klonierung und Expression von Myc-Epitop-markiertem KEULE unter Kontrolle von KNOLLE-cis-regulatorischen Elementen</i>	31

2.2.2	<i>Klonierung und Expression von punktmutiertem, T7-Epitop-markiertem KNOLLE</i>	34
2.3	Biochemische Charakterisierung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe	38
2.3.1	<i>Anreicherung und Nachweis von KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexen</i>	38
2.3.2	<i>16-BAC/SDS-2D-Gelelektrophorese (Differentieller Ansatz)</i>	41
2.3.3	<i>Etablierung eines universellen Proteinaseschutzes</i>	44
2.3.4	<i>Die Interaktion von Myc-SNP33 mit KNOLLE</i>	47
2.3.4.1	Etablierung von Myc-SNP33/T7-KNOLLE-His ₆ exprimierenden Pflanzenlinien in doppelt mutantem Hintergrund	47
2.3.4.2	Etablierung von Wurzelkallusgewebekulturen und Expressionskontrolle	48
2.3.4.3	Nachweis der Interaktion von KNOLLE mit Myc-SNP33	50
2.3.4.4	Thermisch stabiler Proteinkomplex	54
3.	Diskussion	56
3.1	Das putative Synaptobrevin Syb4	56
3.1.1	<i>Analyse der Expression von Syb4 und Myc-Syb4</i>	56
3.1.2	<i>Vergleich der Immunlokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE</i>	57
3.1.3	<i>Detaillierte Beschreibung der subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4</i>	58
3.1.4	<i>Subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4 nach Inhibierung der Sekretion</i>	59
3.1.5	<i>Syb4, ein Interaktor von KNOLLE?</i>	60
3.1.6	<i>Ausblick auf Experimente zur Klärung der Funktion von Syb4</i>	62
3.2	Die Wechselwirkung von KNOLLE mit KEULE	64
3.2.1	<i>Expression von Myc-KEULE</i>	64
3.2.2	<i>Expression von T7-KNOLLE-AxxA</i>	65
3.2.3	<i>Aussichten zur Untersuchung der KNOLLE/KEULE-Interaktion</i>	66
3.3	Biochemische Charakterisierung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe	67

3.3.1	<i>Anreicherung von Proteinkomplexen und die Suche nach neuen KNOLLE-Interaktoren</i>	67
3.3.1.1	Nachweis von KNOLLE-enhaltenden Proteinkomplexen	67
3.3.1.2	Proteinreinigung zur Identifikation neuer KNOLLE-Interaktoren	67
3.3.1.3	Die Aufreinigung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe – ein hoffnungsloses Unterfangen?	70
3.3.2	<i>Etablierung eines universellen Proteinaseschutzes</i>	71
3.3.3	<i>Nachweis der in vivo-Interaktion von KNOLLE und SNP33</i>	71
3.4	Aussichten und Perspektiven	73
4.	Material und Methoden.....	74
4.1	Material.....	74
4.1.1	<i>Pflanzenmaterial</i>	74
4.1.2	<i>Bakterienstämme und Plasmide</i>	74
4.1.3	<i>Sonstiges</i>	75
4.2	Methoden	77
4.2.1	<i>Arbeiten mit Pflanzen</i>	77
4.2.1.1	<i>Wachstumsbedingungen und Oberflächensterilisation von Samen</i>	77
4.2.1.2	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
4.2.1.3	Induktion, Erhaltung und Ernte von Wurzelkallus-Kulturen	78
4.2.2	<i>Molekularbiologische Standardmethoden (Arbeiten mit DNA)</i>	78
4.2.2.1	<i>Bakterienkulturen und Expression rekombinanter Proteine in E.coli</i>	78
4.2.2.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen.....	79
4.2.2.3	PCR Analyse	79
4.2.3	<i>Biochemische Arbeiten (Arbeiten mit Proteinen)</i>	81
4.2.3.1	Proteinextraktion zur Etablierung eines Proteaseschutzes	81
4.2.3.2	Nachweis der Membranassoziation von Proteinen	82
4.2.3.3	Elektrophoretische Trennmethode.....	83
4.2.3.4	Western-Blot Analyse	86

4.2.3.5	Zellaufschluß und Probenvorbereitung vor Affinitätssäulen	87
4.2.3.6	Affinitätschromatographie	88
4.2.3.7	Indirekte Immunlokalisation	90
4.2.3.8	Ultrafiltration.....	90
4.2.3.9	Proteinnachweis durch Silberfärbung	90
4.2.3.10	Hintergrundfreie Proteinfärbung mit CBB.....	91
Literatur		92
Anhang.....		103

Tabellen

Tabelle 1: Beispiele für die Interaktion verschiedener Sec1/Munc18-Proteine mit Syntaxinen.....	9
Tabelle 2: Übersicht Primer-Kombinationen und PCR-Amplifikate.....	80
Tabelle 3: Pipettierplan für 16-BAC-Gellösungen.....	86
Tabelle 4: Waschbedingungen für Western Blot Analysen.....	87
Tabelle 5: Übersicht zu den eingesetzten Antiseren.	103
Tabelle 6: Übersicht zu den verwendeten Oligonukleotiden.....	104
Tabelle 7: Übersicht über die Bakterienstocks.	105
Tabelle 8: Übersicht der etablierten Pflanzenlinien.	106

Abbildungen

Abbildung 1: Modell des Vesikeltransports während der Cytokinese	5
Abbildung 2: Modell der homotypischen Vakuolenfusion in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Abbildung 3: Modell der Interaktion von nSec1/Munc18 mit Syntaxin 1A und Sly1p mit Sed5p.....	11
Abbildung 4: Gewebespezifische Expression von Syb4 und KNOLLE.....	16
Abbildung 5: Nachweis der Membranverankerung von Syb4 und KNOLLE.	17
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Klonierung des Myc-Epitop-markierten Synaptobrevins <i>SYB4</i>	20
Abbildung 7: Etablierung <i>MYC-SYB4</i> -exprimierender Pflanzen.	22
Abbildung 8: Vergleich der subzellulären Lokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE.	23
Abbildung 9: Detaillierte Analyse der subzellulären Lokalisation von Myc-Syb4.....	25
Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4 nach Inhibierung der Sekretion durch BFA.	28
Abbildung 11: Subzellulären Lokalisation verschiedener Markerproteine und von Myc-Syb4 nach Behandlung mit BFA.	29

Abbildung 12	Schematische Darstellung des Konstrukts zur Expression von <i>MYC-KEULE</i> unter Kontrolle der <i>cis</i> -regulatorischen Elemente von <i>KNOLLE</i>	32
Abbildung 13	Beispiele zur Untersuchung der BASTA resistenten T1-Generation nach Transformation von MM125 bzw. X37-2 heterozygoten Pflanzen mit Myc-KEULE.	33
Abbildung 14:	Schematische Darstellung der Klonierung des punktmutierten <i>KNOLLE</i>	35
Abbildung 15:	Unterscheidung zwischen Myc- <i>KNOLLE</i> und T7- <i>KNOLLE</i> -AxxA.....	36
Abbildung 16:	Untersuchung der BASTA resistenten T1-Pflanzen nach Transformation von X37-2 heterozygoten Pflanzen mit T7- <i>KNOLLE</i> -AxxA.....	37
Abbildung 17:	Vergleich der Proteinreinigungen mit Triton X100 und Octyl-beta-D-Glucopyranosid durch Western Blot Analysen.	40
Abbildung 18:	16-BAC/SDS-2D-Mikrogele zur Identifizierung differentieller Banden bei der Proteinreinigung aus Wurzelkallus der T7- <i>KNOLLE</i> (W3-3) bzw. Myc- <i>KNOLLE</i> -His ₆ (E3-302) exprimierte.....	43
Abbildung 19:	Etablierung eines universellen Proteinaseschutzes.....	46
Abbildung 20:	PCRs zur Analyse der F2- und F3-Generation.....	48
Abbildung 21:	Kontrolle der Expression von T7- <i>KNOLLE</i> -His ₆ und Myc-SNP33 in den abgeernteten Wurzelkalluskulturen mittels Western Blot Analyse.	49
Abbildung 22:	Spezifische Anreicherung von <i>KNOLLE</i> und Myc-SNP33 durch eine Ni-NTA-Affinitätssäule.....	51
Abbildung 23:	Kombination zweier Affinitätssäulen zur Verifizierung der <i>KNOLLE</i> /SNP33-Interaktion.	53
Abbildung 24:	Nachweis eines thermisch stabilen <i>KNOLLE</i> -Komplexes....	55

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARF	ADP-ribosylation factor
16-BAC	Benzylhexadecyldimethylammoniumchlorid
BFA	Brefeldin A
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
CDS	kodierende Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
ER	endoplasmatische Ritikulum
GEF	GDP/GTP Austauschfaktor
Genta	Getamycin
GST	Glutathion-S-Transferase
HOPS	homotypic fusion an vacuole protein sorting
Kan	Kanamycin
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor/Fusions-Protein (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein)
Nyv	new yeast v-SNARE
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PVC	prävakuläres Kompartiment
PVP	Polyvinylpyrolodon
Rif	Rifampicin
SNAP	Bindeproteins, des N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktors („soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein)
SNARE	löslichen Rezeptor des Bindeproteins, des N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktors („soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptors“)
TGN	trans Golgi Netzwerk
Tet	Tetracyclin
UTR	nicht translatierte Region
WT	Wildtyp

Veröffentlichungen

Steinborn K, Maulbetsch C, Priester B, Trautmann S, Pacher T, Geiges B, Küttner F, Lepiniec L, Stierhof YD, Schwarz H, Jürgens G, Mayer U. The *Arabidopsis* PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes Dev.* 2002 Apr 15; 16 (8): 959-971.

Übersichtsartikel

Jürgens G. und Pacher T., Cytokinesis: membrane trafficking by default? *Annual Plant Reviews* (9), Blackwell Publishing 2003, 238-254.

Zusammenfassung

Die Zellteilung ist ein grundsätzliches Merkmal aller Lebewesen. Bei eukaryotischen Zellen folgt auf die Kernteilung die Trennung der beiden Tochterzellen (Cytokinese). In somatischen Zellen Höherer Pflanzen beginnt die Cytokinese in der Mitte der Teilungsebene durch die Bildung eines neuen Membrankompartiments, der Zellplatte. Membranvesikel werden entlang der Mikrotubuli des sogenannten Phragmoplasten in die Teilungsebene transportiert, wo sie zunächst miteinander, später mit der Zellplatte fusionieren. Für die Vesikelfusion in der Teilungsebene spielt bei *Arabidopsis* das cytokinespezifische Syntaxin KNOLLE eine essentielle Rolle. *knolle* Embryonen besitzen große Zellen mit mehreren Zellkernen. Die Trennung der Zellen ist unvollständig, und in der Teilungsebene können nicht fusionierte Vesikel nachgewiesen werden. Zur Funktion der Syntaxine gibt es zwar zahlreiche Erkenntnisse aus tierischen Systemen und Hefe, ein KNOLLE-homologes Protein ist in diesen jedoch nicht bekannt. Somit nimmt KNOLLE eine Sonderstellung unter den bekannten Syntaxinen ein, dessen Aufgabe sich ausschließlich auf die Cytokinese beschränkt.

Durch *in vitro*-Experimente konnten das SNAP25-homologe SNP33, das Sec1/Munc18-Protein KEULE sowie das Synaptobrevin Syb4 als putative Interaktoren von KNOLLE identifiziert werden. Zudem sprechen auch die Phänotypen von *keule* und *snp33* für eine direkte Interaktion mit KNOLLE. In dieser Arbeit wurde untersucht, in wie weit diese *in vitro* gewonnenen Hinweise die Situation *in vivo* widerspiegeln.

Das putative Synaptobrevin Syb4 ist wie KNOLLE ein Membranprotein und konnte in der isolierten Mikrosomenfraktion nachgewiesen werden. In stark teilungsaktiven Geweben war Syb4 verstärkt exprimiert, was seine Rolle als putativen KNOLLE-Interaktor zunächst weiter stützte. Die Insertion einer T-DNA im *SYB4*-Gen führte zu einem gametophytisch letalen Phänotyp. Durch die Expression von Myc-Epitop markiertem Syb4 konnte der Ausfall des endogenen Syb4 vollständig kompensiert werden. Bei der detaillierten Untersuchung der subzellulären Lokalisation konnte Syb4 im ER

nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu KNOLLE war Syb4 konstitutiv exprimiert. Seine subzelluläre Verteilung wurde durch eine Blockierung des sekretorischen Systems mit Brefeldin A nicht beeinflusst. Syb4 colokalisierte nicht mit KNOLLE. Somit schließen die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen eine Interaktion von Syb4 und KNOLLE weitgehend aus und widersprechen den *in vitro* gewonnenen Daten.

Bislang sind noch keine Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von KEULE bekannt. Um die Lokalisation von KEULE untersuchen zu können, wurden Pflanzenlinien etabliert, die Epitop-markiertes KEULE exprimierten. Zudem sollte durch Expression von punktmutiertem KNOLLE die Bedeutung einer postulierten Interaktionsstelle für die KNOLLE/KEULE-Wechselwirkung untersucht werden.

Zur Identifikation weiterer Interaktoren von KNOLLE wurden KNOLLE-enthaltende Proteinkomplexe angereichert. In nativen Mikrogelen konnte ein KNOLLE-Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 180kDa nachgewiesen werden. Durch den Nachweis von Myc-SNP33 in aufgereinigten Proteinkomplexen konnte erstmal eine direkte *in vivo*-Interaktion mit KNOLLE belegt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von Myc-SNP33 zu einer Akkumulation von KNOLLE-enthaltenden Proteinkomplexen führte, ohne dass dies phänotypische Folgen nach sich zog.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das putative Synaptobrevin Syb4 ein ER-residentes Protein ist, dessen subzelluläre Verteilung durch die Blockierung der Sekretion nicht beeinflusst wird. Die dargestellten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Syb4 schließen eine Interaktion mit KNOLLE weitgehend aus. Für die detaillierte Analyse der Interaktion von KNOLLE mit KEULE konnten durch die Etablierung verschiedener transgener Pflanzenlinien wichtige Vorarbeiten geleistet werden. Zudem konnte die Bedeutung der *in vitro*-Interaktion von SNP33 mit KNOLLE durch die gemeinsame Aufreinigung beider Proteine bestätigt werden.

1 Einleitung

1.1 Cytokinese somatischer Zellen Höherer Pflanzen

Nachdem die beiden Tochterchromosomensätze in der Anaphase an die gegenüberliegenden Zellpole transportiert und so voneinander getrennt wurden, erfolgt die Trennung der Tochterzellen (Cytokinese). Im Gegensatz zu Hefe oder tierischen Zellen beginnen somatische Zellen Höherer Pflanzen in der Mitte der Teilungsebene mit der Bildung eines neuen Membrankompartiments (Zellplatte). Dieses expandiert in einem komplexen und bislang nur teilweise verstandenen Prozess lateral, um letzten Endes an einer zuvor festgelegten Stelle mit der parentalen Plasmamembran zu fusionieren (Übersichtsartikel: Verma 2001, Staehelin und Hepler, 1996; Heese et al. 1998). Die Cytokinese während der frühen Embryogenese von *Arabidopsis* oder in synchronisierten Tabak BY-2 Zellen dauert nur ungefähr 30 Minuten. In dieser kurzen Zeit (ca. 4% des gesamten Zellzyklus) muß ein Drittel der Zelloberfläche neu gebildet werden (McClinton and Sung, 1997). Dieser enorme Bedarf ist nur durch einen sehr effizient organisierten Transport von Membranvesikeln zu gewährleisten. Einen essentiellen Beitrag hierzu leistet der sogenannte Phragmoplast, ein Cytoskelettgerüst bestehend aus jeweils zwei Bündeln an Mikrotubuli und Actinfilamenten mit entgegengesetzter Polarität. Die Plusenden der Mikrotubuli überlappen in der Teilungsebene, wohingegen die Enden der Actinfilamente nur aneinander stoßen (Staehelin und Hepler, 1996; Granger und Cyr, 2000). Elektronenmikroskopische, elektronentomographische sowie genetische Studien legen einen Transport von Vesikeln entlang dieser Mikrotubuli in die Teilungsebene nahe (Samuels et al., 1995; Otegui et al., 2001; Mayer et al., 1999). Bislang konnte allerdings noch kein Motorprotein identifiziert werden, welches während der Cytokinese einen derartigen Vesikeltransport in Plusrichtung der Mikrotubuli vermitteln könnte. Die Organisation des Phragmoplasten erfolgt in der frühen Phase der Cytokinese um die noch vorhandenen Mikrotubuli der Spindel, die zuvor der Kernteilung diente (Hush

et al., 1994). Die von Golgi-Apparaten abgeschnürten, an den Mikrotubuli in die Teilungsebene transportierten Vesikel fusionieren dort miteinander. Diese initiale Vesikelfusion stellt vermutlich eine homotypische Fusion dar, bei der zwei Membranen mit identischer Zusammensetzung miteinander fusionieren. Bei Fortschreiten der Cytokinese (späte Phase) depolymerisieren die Mikrotubuli und Actinfilamente in der Mitte des Phragmoplasten, wohingegen am äußeren Rand neue angelagert werden (Valster and Hepler, 1997; Abbildung 1).

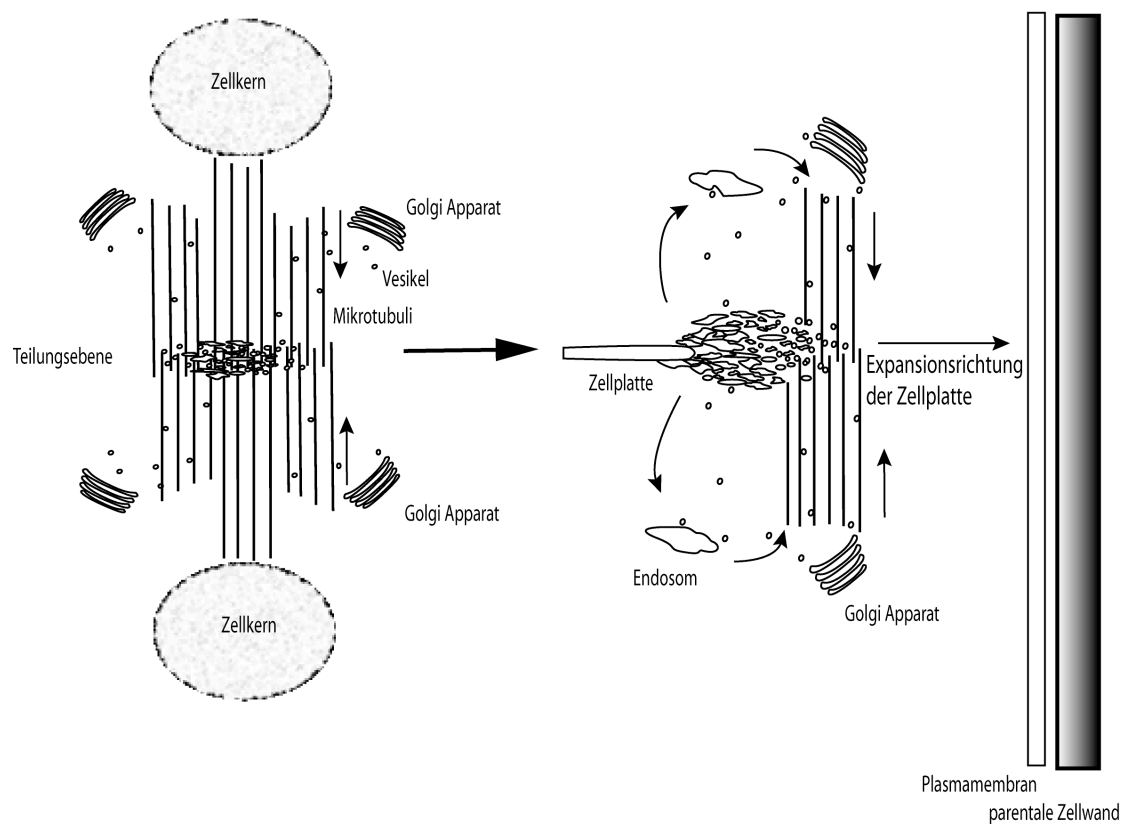


Abbildung 1: Modell des Vesikeltransports während der Cytokinese

Linke Seite: frühe Phase der Cytokinese; von den Golgi-Apparaten abgeschnürte Vesikel werden entlang der Mikrotubuli des Phragmoplasten in die Teilungsebene transportiert, wo sie miteinander fusionieren und die Zellplatte bilden.

Rechte Seite: späte Phase der Cytokinese; zusätzlich zu weiteren Vesikeln, die von den Golgi-Apparaten stammen, wird durch „Recycling“ von Vesikeln über Endosomen überschüssiges Membranmaterial vom Zentrum den wachsenden Rändern der Zellplatte zugeführt.

Damit diese laterale Expansion des Phragmoplasten stattfinden kann, ist eine Spannung notwendig, die durch Actomyosin aufgebaut wird (Molchan et al., 2001). In dieser Phase weist der Phragmoplast die Form eines Hohlzylinders auf. Durch die laterale Expansion werden die transportierten Vesikel immer an der Wachstumszone der Zellplatte angeliefert, wo sie mit dieser fusionieren.

Für die vollständige Abschnürung der Tochterzellen müssen innerhalb kurzer Zeit große Mengen der am Auf- und Umbau der Membranen sowie der Zellwand beteiligten Komponenten bereitgestellt werden. Um einen Engpass bei der Nachlieferung dieser Bausteine zu vermeiden, scheinen die Zellen bei Eintritt in die Mitose mit der Produktion der benötigten Komponenten zu beginnen. Bereits in der Prophase kann eine Akkumulation des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE, welches eine essentielle Rolle bei der Fusion der Membranvesikel in der Teilungsebene spielt (s.u.), in subzellulären Kompartimenten (vermutlich Golgi-Apparate) beobachtet werden (Völker et al., 2001; Lauber et al., 1997). Hinzu kommen die Beobachtungen von Otegui et al. (2001), die bei der Zellularisierung des Endosperms von *Arabidopsis* ein massives „Recycling“ an Membranvesikeln nachweisen konnten. Nach ihrer Kalkulation werden rund 75% der zunächst angelieferten und in das transient gebildete tubulo-vesikuläre Geflecht (Samuels et al., 1995) eingebauten Membranen durch Abschnürung von Vesikeln wieder entfernt. Diese Membranen könnten erneut an der Wachstumszone der Zellplatte angeliefert werden. Eine Zwischenstation dieser Membranzerteilung könnten endosomale Kompartimente in unmittelbarer Nähe zur Zellplatte sein, für deren Existenz es bislang jedoch nur indirekte Evidenzen gibt (Geldner et al., 2001). Bei Behandlung von *Arabidopsis* Keimlingen mit Brefeldin A (BFA) kommt es zu einer drastischen Veränderung der subzellulären Lokalisation verschiedener Proteine, darunter PIN1 und KNOLLE. BFA inhibiert zahlreiche ARF-Proteine, indem es an den dimeren Komplex aus ARF und seinem ARF-GEF bindet, wodurch dieser stabilisiert wird (Morinaga et al., 1999; Peyroche et al., 1999). In Tabak wurde eine Blockierung des sekretorischen Systems durch Inhibierung der Vesikelabschnürung an den Golgi-Apparaten beschrieben (Ritzenthaler et al., 2002). Dies deckt sich mit den Beobachtungen in Säuger-

1999) und Hefe-Zellen (Rambourg et al., 1995). In *Arabidopsis* lassen jedoch die Entfernung des putativen Auxintransporters PIN1 von der Plasmamembran und des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE aus der Zellplatte, sowie deren Akkumulation in „BFA-Kompartimenten“ auf die Blockierung der Vesikelabschnürung von endosomalen Kompartimenten schließen (Geldner et al., 2001; Geldner et al., 2003). Die Kombination von frühzeitiger Synthese der später benötigten Komponenten und deren lokaler Umverteilung über Endosomen könnte somit eine wichtige Rolle für die rasche Vollendung der Cytokinese spielen.

1.2 Das SNARE-Modell

Für die Funktion und Aufrechterhaltung der diversen Membrankompartimente eukaryotischer Zellen sind die Kommunikation und der rege Austausch untereinander essentiell. Ein Großteil dieser Aufgaben wird über zielgerichteten Transport und Fusion von Membranvesikeln bewältigt, deren Etablierung und Regulation bereits frühzeitig in der Evolution der Eukaryonten stattgefunden haben muß, da alle über verwandte, daran beteiligte Komponenten (Proteinfamilien) verfügen. So lassen sich in Hefe- oder Säugerzellen gewonnene Erkenntnisse durchaus auf pflanzliche Systeme übertragen. Eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Verankerung an Zielmembranen spielen demnach so genannte SNARE-Komplexe, die zunächst in Neuronen, später in ähnlicher Form in allen Eukaryonten nachgewiesen werden konnten. Mit der SNARE-Hypothese beschrieben Söllner et al. (1993a, b) die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen an der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran beteiligten Komponenten. Auch wenn heute einige Beziehungen neu definiert und weitere Komponenten in das Modell eingebunden werden müssen, besitzt die zentrale Aussage der Hypothese noch Gültigkeit (Yersin et al., 2003; Lang et al., 2001; Parlati et al., 2000; McNew et al., 2000). Die SNARE-Komplexe bestehen aus einem alpha-helikalen Bündel von 4 „Coiled Coil“ Domänen. Eine dieser „Coiled Coil“ Domänen wird von einem v-SNARE (Synaptobrevin) auf der Vesikelmembran und 3 von t-SNAREs auf der

Zielmembran beigesteuert (Chen und Scheller, 2001, Sutton et al., 1998). SNARE-Komplexe an Endomembransystemen können von Komplexen an der Plasmamembran anhand ihrer t-SNARE-Zusammensetzung unterschieden werden. Während bei ersteren ein Syntaxin und 2 leichte t-SNARE-Ketten beteiligt sind, die jeweils eine „Coiled Coil“ Domäne zum Komplex beisteuern, tritt an der Plasmamembran ein SNAP25-homologes Protein mit seinen beiden „Coiled Coil“ Domänen an die Stelle der beiden leichten Ketten (Antonin et al., 2002). Die verschiedenen Syntaxine und Synaptobrevine sind Mitglieder großer Proteinfamilien mit hoher Spezifität. Im Gegensatz dazu sind SNAP25-homologe Proteine und die leichten t-SNARE-Ketten weniger spezifisch und können an verschiedenen SNARE-Komplexen unterschiedlicher Kompartimente beteiligt sein (McNew et al., 2000; Parlati et al., 2000, Fukuda et al., 2000).

1.3 Die homotypische Membranfusion (Vakuolenfusion in Hefe)

Die SNARE-Proteine können nicht alleine den komplexen Prozess der Erkennung und Fusion von Membrankompartimenten bewältigen. Vielmehr sind für die Integration des Transportes von Membranvesikeln in das Stoffwechselgeschehen einer Zelle, deren Abschnürung und Fusion mit anderen Membrankompartimenten zahlreiche regulatorisch wirksame Interaktoren notwendig (Söllner, 2003; Lin and Scheller, 2000). Deren genaue Rolle ist bisher nur ansatzweise verstanden. Wichtige Erkenntnisse hierzu konnten bei der Untersuchung der homotypischen Fusion von Hefevakuolen gewonnen werden (Abbildung 2). Wie bereits erwähnt besitzt die Fusion der cytokinetischen Vesikel zumindest in der frühen Phase der Cytokinese eine gewisse Ähnlichkeit mit einer homotypischen Fusion (Abschnitt 1.1). Die Vakuolenfusion spielt in Hefe nach erfolgter Zellteilung eine wichtige Rolle. Zu Beginn der Mitose zerfällt die zentrale Hefevakuole in kleinere Kompartimente, von denen ein Teil in die sich abschnürende Tochterzelle transportiert wird. Anschließend fusionieren die kleinen Vakuolen in Mutter- und Tochterzelle zu den neuen zentralen Vakuolen. Im Fall der homotypischen Fusion unterscheiden sich die beiden Membranen nicht

voneinander. Sie enthalten bereits vor dem ersten Kontakt miteinander cis-SNARE-Komplexe bestehend aus Vam3p (Syntaxin-homolog), Vam7p, Vti1p (leichte t-SNARE-Ketten) und Nyv1p oder Ykt6p (v-SNAREs, Parlati et al, 2000; alle SNAREs in derselben Membran). Dieser SNARE-Komplex liegt mit dem sogenannten HOPS-Komplex (Vam2p, Vam6p, Vps11p, Vps16p, Vps18p und Vps33p) assoziiert vor (Rieder und Emr, 1997; Seals et al., 2000). Bevor es zur Wechselwirkung der SNAREs in den beiden sich nähernden Membranen kommen kann, müssen die cis-SNARE-Komplexe unter Mitwirkung einer NSF-homologen ATPase (Sec18p) und eines alpha-SNAP-homologen Proteins (Sec17p) in einem sogenannten „Priming“-Schritt gespalten werden (Ungermann et al., 1998). Anschließend erfolgt der erste Kontakt der Membranen („Tethering“), an dem eine Rab-homologe GTPase (Ypt7p) beteiligt ist, die mit dem noch an den N-Terminus des Syntaxin-homologen t-SNAREs Vam3p gebundenen HOPS-Komplex interagiert (Laage und Ungermann, 2001; Eitzen et al., 2000; Ungermann et al., 2000). Der HOPS-Komplex aktiviert die GTPase-Aktivität von Ypt7p (Wurmser et al., 2000). Die genaue Rolle der Rho-GTPase Cdc42p ist noch unklar. Ihre Funktion liegt zwischen dem „Tethering“ und dem sich daran anschließenden „Docking“, d.h. der Ausbildung des trans-SNARE-Komplexes (SNAREs auf unterschiedlichen Membranen; Müller et al., 2001). Wie die eigentliche Fusion der beiden Membranen erfolgt, ist ebenfalls noch umstritten. Es gibt jedoch Hinweise auf die Beteiligung eines Calcium-Effluxes aus der Vakuole, der Wechselwirkung von Calmodulin mit der Protein Phosphatase 1 sowie einer Beteiligung der V₀-Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase (Peters et al, 1999; Peters et al., 2001). Das postulierte Modell geht von einer Porenbildung durch die V₀-Untereinheiten aus. Durch Dissoziation der Untereinheiten und Eindringen der Membranlipide zwischen die Proteolipide der V₀-Untereinheiten würde dann die eigentliche Fusion ausgelöst werden.

Abbildung 2: Modell der homotypischen Vakuolenfusion in *Saccharomyces cerevisiae* (nach Peters et al., 2001).

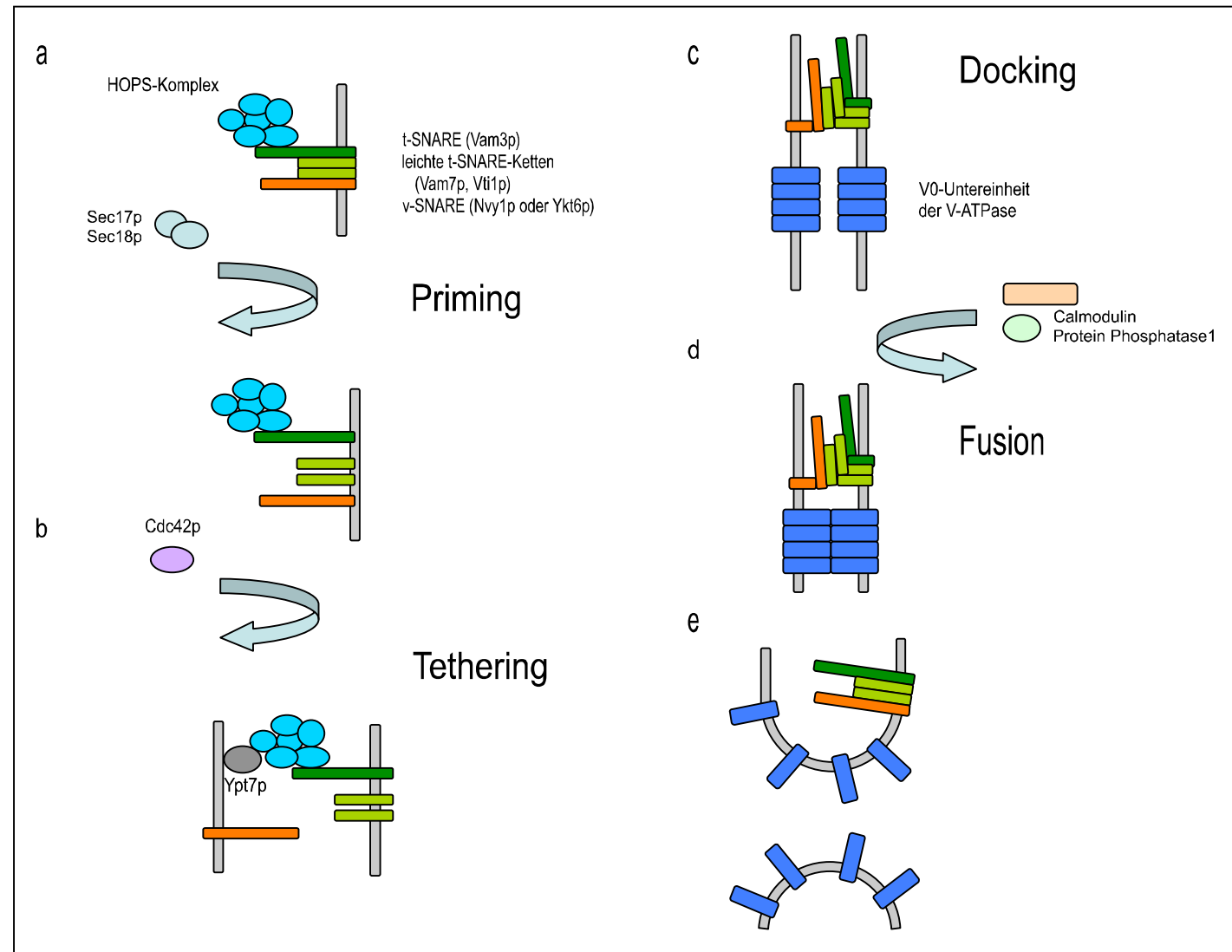
a) Die mit dem HOPS-Komplex assoziiert vorliegenden *cis*-SNARE-Komplexe werden unter Beteiligung der ATPase Sec18p und dem alpha-SNAP-homologen Sec17p im sogenannten „Priming“-Schritt gespalten.

b) Der erste Kontakt der beiden Membranen („Tethering“) erfolgt durch Interaktion des an das Syntaxin Vam3p gebundenen HOPS-Komplexes mit der Rab-GTPase Ypt7p. Die Rolle der Rho-GTPase Cdc42p ist noch unklar.

c) Im „Docking“-Schritt kommt es zur Ausbildung der *trans*-SNARE-Komplexe.

d) Nach Calcium-Efflux aus den Vakuolen, Bindung von Calmodulin und Aktivierung der Proteinphosphatase 1 bilden die V0-Untereinheiten der vakoulären ATPase einen Kanal, der die beiden Membranen verbrückt.

e) Durch Dissoziation der V0-Untereinheiten erfolgt die eigentliche Fusion der beiden Membranen.



1.4 Die Interaktion von Sec1/Munc18-Proteinen mit Syntaxinen

Zahlreiche Interaktionspartner der Syntaxine konnten bereits identifiziert werden. Unter anderem gehört die Familie der Sec1/Munc18-Proteine dazu, welche einige ungewöhnliche Eigenschaften aufweisen. Die bogenförmige Tertiärstruktur ist innerhalb dieser Proteinfamilie konserviert, obwohl es auf Ebene der Primärsequenz zum Teil erhebliche Abweichungen gibt (Übersichtsartikel: Gallwitz und Jahn, 2003). Viel bemerkenswerter ist jedoch die Tatsache, dass es mindestens 3 verschiedene Mechanismen zur Interaktion von Sec1/Munc18-Proteinen mit Syntaxinen gibt (Tabelle 1). Je nach Art der Interaktion können Sec1/Munc18-Proteine dabei unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Munc18-1 bindet Syntaxin1A nur in der geschlossenen Form, d.h. wenn der regulatorisch wirksame N-Terminus des Syntaxins mit Teilen der C-terminalen SNARE-Domäne („Coiled-Coil“ Domäne) interagiert (Abbildung 3a). Die Ausbildung eines SNARE-Komplexes ist in diesem Zustand nicht möglich, Munc18-1 nimmt somit eine inhibierende Aufgabe wahr (Dulubova et al., 1999). Sowohl der N- als auch der C-Terminus von Syntaxin1A sind an der Interaktion mit der zentralen Bindetasche von Munc18-1 beteiligt. Dem gegenüber interagiert Sly1p mit Sed5p in der offenen Form, d.h. wenn keine Wechselwirkung zwischen N- und C-Terminus des Syntaxins stattfindet (Abbildung 3b). Sly1p trägt zur spezifischen SNARE-Komplex-Bildung bei (Peng and Gallwitz, 2002). Die Sly1p/Sed5p-Bindung findet an der äusseren Oberfläche von Sly1p statt. Threonin 7 und Phenylalanin 10 einer kurzen N-terminalen Erkennungsequenz in Sed5p spielen dabei eine essentielle Rolle (Bracher und Weissenhorn, 2002). Zwischen Vps33p und Vam3p findet ein indirekter Kontakt statt. Vps33p ist Teil des HOPS-Komplexes (Rieder und Emr, 1997) und besitzt eine ATP-Bindestelle (Gerhardt et al., 1998). Vam3p besitzt weder eine N-terminale Erkennungsequenz für die Bindung von Vps33p (Misura et al., 2002) noch eine geschlossene Form (Dulubova et al., 2001).

Tabelle 1: Beispiele für die Interaktion verschiedener Sec1/Munc18-Proteine mit Syntaxinen.

Bis auf nSec1/Munc18-1 und Syntaxin1A (Säuget) stammen alle aufgeführten Beispiele aus Hefe.

Sec1/Munc18-Protein	Syntaxin	Kompartiment	Art der Interaktion	Referenz
nSec1/Munc18-1	Syntaxin1A	Präsynaptische Membran (Plasmamembran)	Geschlossene Form von Syntaxin1A	Dulubova et al., 1999
Sec1p	Sso1p, Sso2p	Plasmamembran	N-Terminus von Sso1/2p	Carr et al., 1999
Sly1p	Sed5p	Golgi	N-Terminus von Sed5p	Bracher und Weissenhorn, 2002
Sly1p	Ufe1p	ER	N-Terminus von Ufe1p	Yamaguchi et al., 2002
Vps45p	Tlg2p	TGN	N-Terminus von Tlg2p	Dulubova et al., 2002
Vps33p	Vam3p	Vakuole	Indirekt	Seals et al., 2000

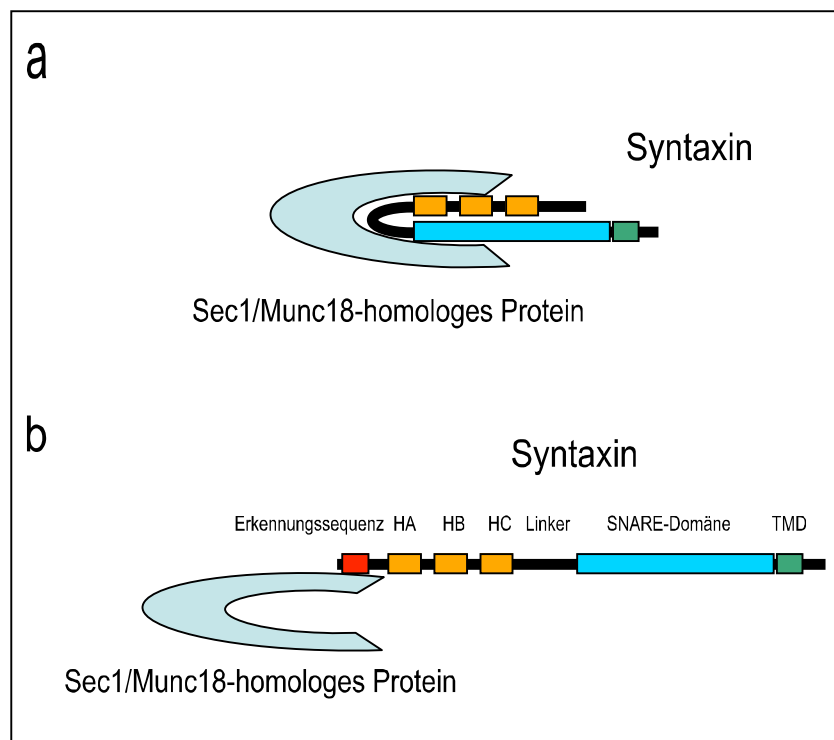


Abbildung 3: Modell der Interaktion von nSec1/Munc18 mit Syntaxin 1A (a) und Sly1p mit Sed5p (b).

Ha, HB, HC: alpha-helikale Bereiche im N-Terminus des Syntaxins; TMD: Transmembrandomäne

a) Bindung von nSec1/Munc18 an die „geschlossene“ Form von Syntaxin 1A. Die Interaktion findet zwischen der zentralen Bindetasche von nSec1/Munc18 und dem N-Terminus sowie eines Teils der SNARE-Domäne von Syntaxin 1A statt.

b) Interaktion zwischen der äußeren Oberfläche von Sly1p und der N-terminalen Erkennungssequenz von Sed5p in der „offenen“ Form.

Im Gegensatz zu den vielen verschiedenen Isoformen der SNARE-Proteine gibt es nur wenige Sec1/Munc18-Protein-Isoformen (in Vertebraten 7: Munc18-1, 18-2, 18-c, Sly1, Vps45, Vps33a und Vps33b; in Hefe 4: Sec1p, Sly1p, Vps45p und Vps33p; in *Arabidopsis* mindestens 6 (Sanderfoot et al., 2000): KEULE, AtSec1a und AtSec1b (Assaad et al., 2001), AtSly1 (Sanderfoot et al., 2000), AtVPS45 (Bassham and Raikhel, 1998) und AtVPS33 (Rojo et al., 2003)). Einige Sec1/Munc18-Proteine sind in der Lage, mit verschiedenen Syntaxinen zu interagieren (z.B. Sly1 mit Syntaxin 5 und 18; Dulubova et al., 2003). Im Fall der Interaktion über die N-terminale Erkennungssequenz des Syntaxins spielt die N-terminale Domäne des Sec1/Munc18-Proteins eine essentielle Rolle bei Bindung und Spezifität.

1.5 Membranfusion während der Cytokinese von *Arabidopsis*

Der Ablauf der Cytokinese in Zellen Höherer Pflanzen unterscheidet sich offensichtlich von der in tierischen Zellen oder in Hefe, obwohl in den letzten Jahren immer deutlicher wurde, dass die zu Grunde liegenden Mechanismen erstaunlich konserviert scheinen (Guertin et al., 2002; Field and Oegema, 1999). Eine Sonderstellung in der Cytokinese somatischer Zellen Höherer Pflanzen nimmt dabei noch immer das cytokinesespezifische Syntaxin KNOLLE ein. Während in tierischen Zellen das konstitutiv exprimierte Syntaxin2, welches in der Interphase an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Bennett et al., 1993), am finalen Schritt der Abschnürung der Tochterzellen beteiligt ist (Low et al., 2003), wird KNOLLE ausschließlich während der Mitose exprimiert (Lauber et al., 1997) und besitzt zudem keine homologen Proteine außerhalb des Pflanzenreichs. Welche essentielle Rolle KNOLLE bei der Vollendung der Cytokinese wahrnimmt, wird in *knolle* Embryonen besonders eindrucksvoll deutlich. Die großen multinukleären Zellen besitzen unvollständige Zellwände, und in der Teilungsebene können nicht fusionierte Membranvesikel beobachtet werden (Lukowitz et al., 1996; Lauber et al., 1997).

Neben *knolle* weist auch *keule* einen Cytokinese-Phänotyp mit nicht fusionierten Vesikeln in der Teilungsebene auf. KEULE besitzt Homologie zu

Sec1/Munc18-Proteinen. Diese stellen wichtige Regulatoren der Syntaxine dar (Tabelle 1). Sowohl eine genetische Interaktion von KNOLLE und KEULE (Waizenegger et al., 2000) als auch eine *in vitro*-Interaktion der Proteine konnte nachgewiesen werden (Assaad et al., 2001).

Es ist anzunehmen, dass auch für die Cytokinese in *Arabidopsis* das bislang in allen untersuchten Systemen gültige SNARE-Modell zutrifft. Demnach sollte das cytokinesespezifische Syntaxin KNOLLE beim „Docking“-Schritt der cytokinetischen Vesikel gemeinsam mit einem SNAP25-homologen Protein und einem Synaptobrevin einen SNARE-Komplex bilden. Die Arbeiten von Heese et al. (2001) legen nahe, dass neben KNOLLE das SNAP25-homologe SNP33 eine Komponente dieses cytokinetischen SNARE-Komplexes darstellt. SNP33 und KNOLLE interagieren sowohl *in vitro* als auch im Hefe-2-Hybrid-System miteinander. Zudem konnte eine Colokalisation von SNP33 und KNOLLE während der Cytokinese gezeigt werden. Im Gegensatz zu KNOLLE ist SNP33 nicht zellzyklusspezifisch exprimiert. Das Protein konnte neben der Zellplatte auch in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Homozygot mutante *snp33* Keimlinge zeigen einen nur schwachen cytokinetischen Defekt (einzelne Zellen mit unvollständigen Zellwänden), die Keimlinge sterben jedoch kurze Zeit nach Ausbildung der Folgeblätter ab. Die zu postulierende 3. Komponente des cytokinetischen SNARE-Komplexes, das Synaptobrevin-homologe Protein, konnte bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden. Erste Hinweise auf ein putatives Synaptobrevin, das mit KNOLLE interagiert (SYB4 = F12F1.27; AT1G11890), stammen aus *in vitro*-Interaktionsstudien mit GST-Fusionsproteinen (Pacher, 1999).

1.6 Biologische Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die biochemische und zellbiologische Charakterisierung des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE und seiner putativen Interaktoren. Nachdem für SNP33, KEULE und Syb4 eine Interaktion mit KNOLLE *in vitro* gezeigt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob diese Wechselwirkungen auch *in vivo* eine Rolle spielen. Das Sec1/Munc18-Protein KEULE besitzt Homologie zu Sly1 (Assaad et al., 2001). Sly1 trägt durch die Wechselwirkung mit Sed5 zur spezifischen Ausbildung des SNARE-Komplexes am Golgi bei (Peng and Gallwitz, 2002; Bracher und Weissenhorn, 2002). Um zu überprüfen, ob zwischen KNOLLE und KEULE eine ähnliche Interaktion über eine N-terminale Erkennungssequenz im Syntaxin KNOLLE stattfindet, wie bei der Sly1/Sed5-Interaktion (siehe Tabelle 1), wurde der N-Terminus von KNOLLE mutiert. Der Einfluss auf die Wechselwirkung von KNOLLE mit KEULE sollte anhand der subzellulären Lokalisation beider Proteine untersucht werden. Hierzu mussten transgene Pflanzen etabliert werden, die Epitop-markiertes KEULE bzw. das punktmutierte KNOLLE exprimierten.

Um neue Interaktoren von KNOLLE identifizieren zu können, sollten KNOLLE enthaltende Proteinkomplexe aufgereinigt werden. Die in den Komplexen enthaltenen Proteine sollten mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Epitop-Markierungen erlaubten neben der Detektion rekombinanter Proteine auch den Einsatz spezifischer Affinitätsmatrices, welche gegen die Epitop-Markierung gerichtet waren (Terpe, 2003). Um diese Proteinkomplexe nachzuweisen und aufzukonzentrieren, konnte auf Pflanzenlinien zurückgegriffen werden, welche derart Epitop-markierte Proteine exprimierten (Völker, 2001; Heese, 2001).

Durch die Etablierung von Pflanzenlinien, die Epitop-markiertes Syb4 exprimieren, konnte die subzelluläre Lokalisation von Syb4 untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob das putative Synaptobrevin Syb4 Teil des cytokinespezifischen SNARE-Komplexes mit KNOLLE und SNP33 ist. Zudem konnte die subzelluläre Verteilung Aufschluss darüber geben, ob Syb4 einer ähnlichen cytokinespezifischen Kontrolle unterliegt wie KNOLLE.

2 Ergebnisse

2.1 Der putative KNOLLE-Interaktor Syb4

In vitro-Interaktionsstudien mit rekombinanten, in *E.coli* exprimierten Proteinen haben Hinweise auf eine Wechselwirkung des putativen Synaptobrevins Syb4 (AT1G11890) mit KNOLLE geliefert (Pacher, 1999). In weiterführenden Experimenten sollte nun überprüft werden, welche Rolle Syb4 *in vivo* spielt und ob es während der Cytokinese tatsächlich gemeinsam mit KNOLLE und SNP33 Teil des cytokinespezifischen SNARE-Komplexes ist.

2.1.1 Gewebespezifische Expression und Membranassoziation von Syb4

Die gewebespezifische Expression von Syb4 konnte mit Hilfe des gegen das Syb4-Teilfragment (AS38-131) gerichteten Antiserums untersucht werden. Der Vergleich der Expression von Syb4 und seines putativen Interaktors KNOLLE in unterschiedlichen Geweben zeigte, dass beide Proteine in den besonders teilungsaktiven Geweben Blüten/junge Schoten, Schoten und in Suspensionskultur stark exprimiert waren (Abbildung 4). Darüber hinaus konnte Syb4 auch in Wurzelextrakten nachgewiesen werden. In Blattmaterial war eine schwache, sehr diffuse Doppelbande zu erkennen. Die Beladung des Gels mit einer vergleichbaren Gesamtproteinmenge in den Spuren der verschiedenen Gewebeproben wurde in CBB gefärbten Parallelgelen überprüft (nicht gezeigt).

Abbildung 4b ist zu entnehmen, dass in den Western Blot Analysen von Pflanzenextrakten neben dem putativen Synaptobrevin Syb4, welches ein apparentes Molekulargewicht von 25kDa besitzt, zwei weitere Proteine mit ca. 35 bzw. 45kDa vom anti Syb4 Antiserum erkannt wurden.

Wie andere Synaptobrevine besitzt auch Syb4 einen C-terminalen, hydrophoben Membrananker. Die Membranassoziation des Proteins konnte

durch Inkubation der isolierten Mikrosomenfraktion in verschiedenen Puffern bestätigt werden. Syb4 wurde wie KNOLLE (Lauber et. a, 1997), welches ebenfalls einen C-terminalen Membrananker besitzt, weder bei hoher Salzkonzentration noch bei alkalischem pH aus der Mikrosomenfraktion extrahiert. Die Inkubation mit dem Detergenz Triton X100 löste jedoch beide Proteine aus dem Pellet der Mikrosomenfraktion (Abbildung 5).

Die starke Expression in sich teilenden Geweben und der Nachweis von Syb4 in der Mikrosomenfraktion stützen somit die vermutete Rolle von Syb4 als Interaktor von KNOLLE.

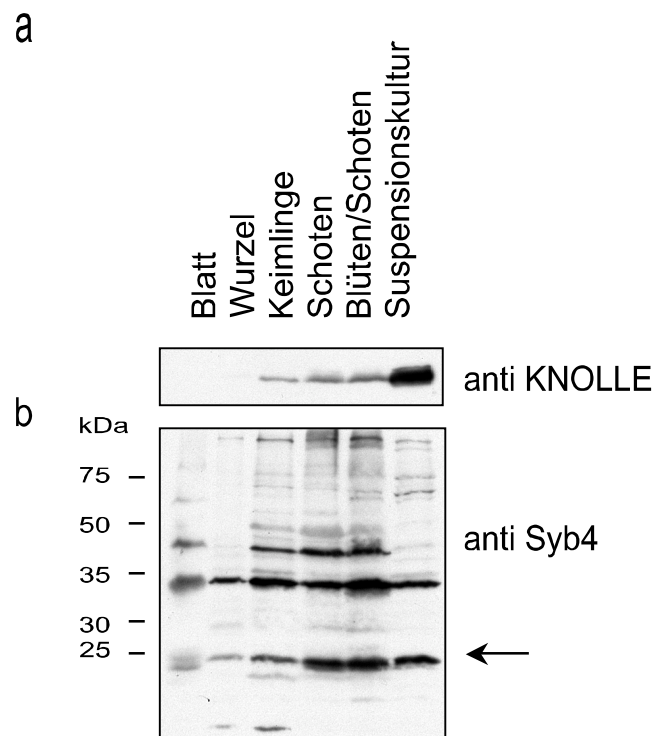


Abbildung 4: Gewebespezifische Expression von Syb4 und KNOLLE.

Frisch abgeerntetes Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert, in Ladepuffer resuspendiert (4ml/g Frischgewicht) und sofort für 5min auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (10min, 13000rpm, Tischzentrifuge) wurden jeweils 5-15µl Überstand geladen (Beladung mit ähnlicher Proteinmenge im Parallelgel mittels CBB-Färbung nachgewiesen).

a) Western Blot Detektion mit polyklonalem anti-KNOLLE Antiserum.

b) Western Blot Detektion mit polyklonalem anti-Syb4 Antiserum. Die Bande von Syb4 mit einem apparenten Molekulargewicht von 25kDa ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

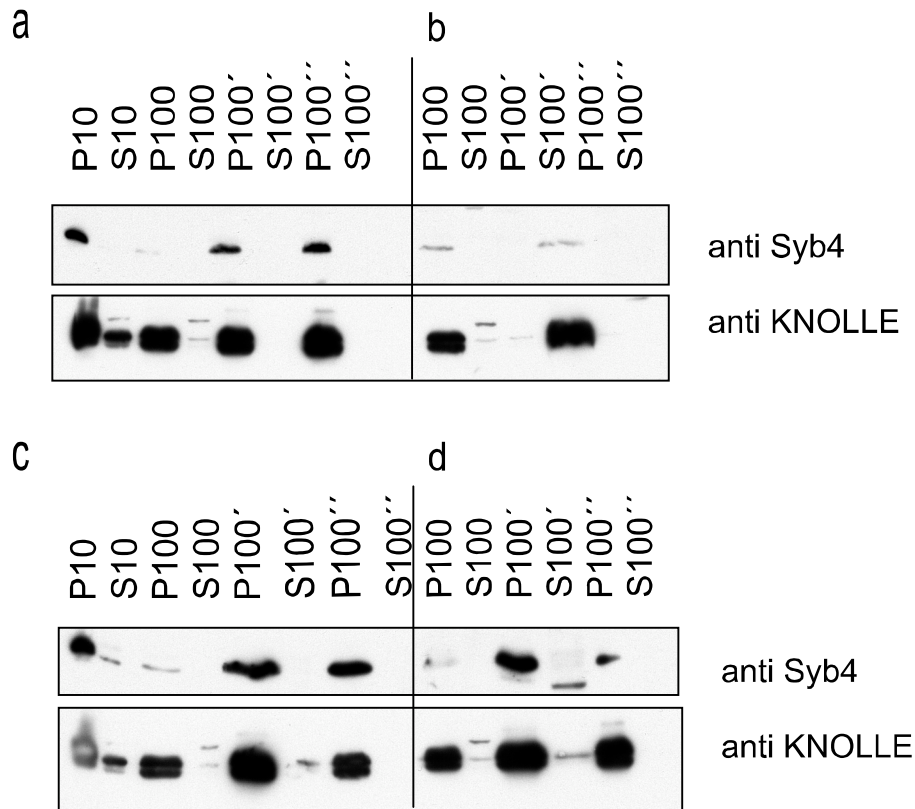


Abbildung 5: Nachweis der Membranverankerung von Syb4 und KNOLLE.

Durch differentielle Zentrifugation wurde die Mikrosomenfraktion (P100) gewonnen, in unterschiedlichen Puffern resuspendiert und durch Ultrazentrifugation erneut pelletiert. Das Pellet (P100') wurde in einem Puffer ohne Zusätze, mit Triton X100, Natriumchlorid oder Natriumcarbonat erneut resuspendiert und pelletiert. P10: Pellet der Zentrifugation bei 10000g, S10: Überstand der Zentrifugation bei 10000g, P100, P100', P100'': Pellet der sukzessiven Zentrifugationen bei 100000g, S100, S100', S100'': Überstand der sukzessiven Zentrifugationen bei 100000g.

- a) Puffer ohne weitere Zusätze.
- b) Puffer mit Triton X100 (1% v/v).
- c) Puffer mit Natriumchlorid (1,0M)
- d) Puffer mit Natriumcarbonat (0,1M, pH10,9)

2.1.2 Die *syb4* T-DNA-Insertionslinie 1004

In der *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien-Sammlung von C. Koncz (Delbrück Labor, Köln) konnten zwei Pflanzenlinien im *SYB4* Gen identifiziert werden (Linien 1004 und 2351). Beide wiesen einen gametophytisch letalen Phänotyp auf. Dies konnte sowohl durch genetische Analyse der Nachkommen heterozygoter Pflanzen als auch durch reziproke Kreuzungen heterozygoter mit wildtypischen Pflanzen gezeigt werden (Georg Stropfen, persönliche Mitteilung). Homozygot mutante Pflanzen konnten nicht nachgewiesen

werden, und auch der Anteil an heterozygoten Pflanzen war deutlich geringer als erwartet (unter 50% bei Verwendung heterozygoter Mutterpflanzen und sogar weniger als 10% bei Verwendung von Pollen einer heterozygoten Pflanze). Für die Expression von Myc-Epitop markiertem Syb4 wurde mir die Linie 1004 freundlicher Weise von Georg Strompen überlassen. Diese Linie enthält eine T-DNA-Insertion im Intron der 5'-UTR des *SYB4* Gens (Position -368).

2.1.3 Klonierung von *MYC-SYB4*

Das gegen das Syb4-Teilfragment (AS38-AS131) gerichtete Antiserum erkannte in Western Blot Analysen neben dem Synaptobrevin zwei weitere Proteine (siehe Abschnitt 2.1.1, Abbildung 4). Zudem konnte mit diesem Antiserum kein bzw. ein nur sehr schwaches Signal in indirekten Immunlokalisations-Untersuchungen an Embryonen und Wurzeln detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um diese Probleme zu umgehen, wurden *MYC-SYB4* transgene Pflanzenlinien etabliert. Hierzu wurde ein genomisches Fragment aus Pflanzen-DNA (Ökotyp Columbia) amplifiziert. Unmittelbar vor dem Start-Codon wurde eine für ein Myc-Epitop codierende Sequenz eingeführt (Abbildung 6) um das unter *SYB4* *cis*-regulatorischer Kontrolle in Pflanzen exprimierte Protein nachweisen zu können. Die beiden komplementären, für das Myc-Epitop codierenden Oligonukleotide enthielten Überhänge für die Ligation in einen *NotI/XbaI* geschnittenen pBluescript-Vektor (pKS; Vektor für *E.coli*). Anschließend konnte mit den Primern CDS-F und Syb ASR 2 ein 1923bp langes Fragment amplifiziert werden (genomische DNA, Ökotyp Columbia; Bereich vom Start Codon des Synaptobrevins bis in das nächste Gen). Nach Restriktionverdau mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI* konnte dieses Fragment in obigen Vektor einkloniert werden. Die Amplifikation der 1223bp langen 5'UTR einschließlich der Promotorregion erfolgte mit den Primern Syb-FP-2 und Prom-R-SnaB1. Nach Restriktionsverdau mit *SacI/SnaBI* wurde dieses PCR-Fragment in den *NotI* geschnittenen, mit dem Klenow-Fragment behandelten und anschließend mit *SacI* verdauten Vektor eingeführt. Durch den Verdau mit *SacI* wurde das

Promotorfragment am 5'-Ende um 55bp verkürzt, da eine weitere *SacI*-Erkennungssequenz enthalten war. Die Umklonierung in das pBIN-Plasmid (Vektor für *Agrobacterium tumefaciens* und die anschließende Transformation von Pflanzen) erfolgte durch Restriktionsverdau des pKS-Konstrukts mit den Enzymen *DraIII/XhoI* und anschließender Klenow-Fragment-Behandlung. Das pBIN-Plasmid wurde mit *SnaI/SacI* geschnitten und der Überhang ebenfalls mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Im Anschluss an die Ligation beider Fragmente wurde das finale Konstrukt in *Agrobacterium* eingebracht. Die Transformation von Pflanzen erfolgte mit Hilfe der „Floral dip method“ (Clough and Bent; 1998). Eine detaillierte Darstellung aller etablierten Bakterienstämme und transgenen Pflanzenlinien befindet sich im Anhang.

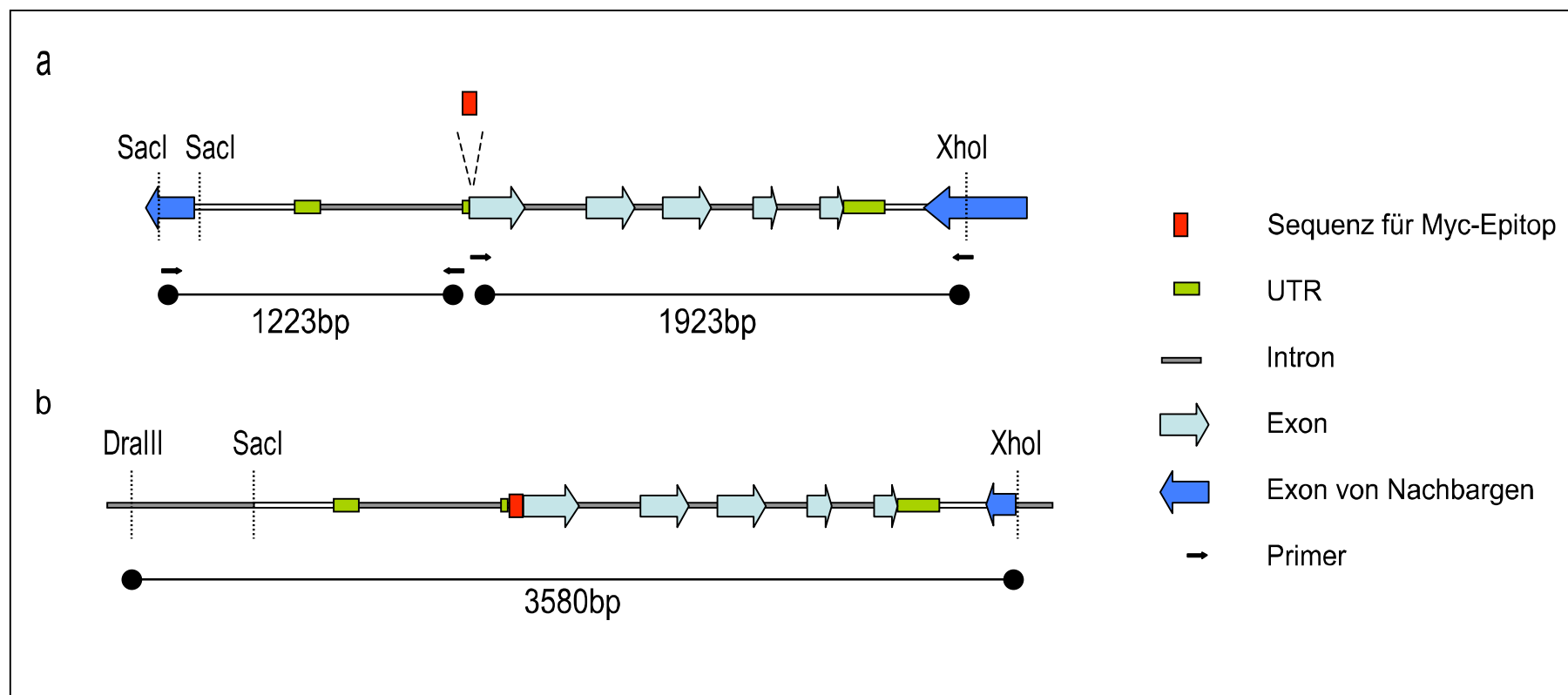


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Klonierung des Myc-Epitop-markierten Synaptobrevins Syb4.

a) Genomische Region des Synaptobrevins. Die Lage der verwendeten Primer für die Amplifikation der beiden Teilfragmente, die Insertionsstelle der für das Myc-Epitop codierenden Sequenz sowie die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme zur Klonierung in das pKS-Plasmid sind eingezeichnet.

b) Schematische Darstellung der in Pflanzen transformierten Region. Die beiden Erkennungssequenzen der zur Umklonierung in das pBIN-Plasmid verwendeten Restriktionsenzyme (*DralIII/Xhol*) sind eingezeichnet. Die Sequenz zwischen der *DralIII*- und der *Sacl*-Erkennungssequenz stammt aus dem pKS-Plasmid.

2.1.4 Etablierung von *MYC-SYB4* transgenen Pflanzenlinien mit homozygot mutantem *SYB4* Gen

Die Funktionalität des Myc-Epitop-markierten *SYB4* Transgens konnte durch die Expression in *syb4* homozygoten Pflanzen (Allel 1004) nachgewiesen werden. Die Selektion der T1-Pflanzen erfolgte auf Hygromycin/Kanamycin-Platten (Hygromycin-Resistenzgen in der T-DNA-Insertion enthalten, Kanamycin-Resistenzgen an die Insertion des *MYC-SYB4* Transgens gekoppelt). Durch PCR konnten die Insertion der T-DNA im *SYB4* Gen (Primer Fish I/ Syb4-F1 neu; Abbildung 7a) sowie das Vorhandensein des wildtypischen Allels bzw. des Transgens (Primer PROM1180/rev CDS160; Abbildung 7b) überprüft werden. In allen Pflanzen der T1-Generation, welche die Selektion mit Hygromycin und Kanamycin überlebt hatten, konnte das mutante Allel 1004 nachgewiesen werden. Zudem enthielten bis auf die Pflanze NN1 alle ein *MYC-SYB4* Transgen (Abbildung 7b). Die unterschiedliche Expressionsstärke des *MYC-SYB4* Transgens in verschiedenen T1-Pflanzenlinien zeigten Western Blot Analysen von Blüten und jungen Schoten (Abbildung 7c und d). Die Linien HH1, WW2, WW3, Z1, Z2 und ZZ2 können als Überexpressionslinien betrachtet werden. Im Gegensatz zum überexprimierten transgenen Protein konnte das endogene Syb4-Protein unter den gewählten Nachweisbedingungen (eingesetzte Probenmenge, Antikörperkonzentration, Waschbedingungen) aufgrund seiner deutlich geringeren Expressionsstärke mit dem gegen Syb4 gerichteten Antiserum nicht nachgewiesen werden.

Unter insgesamt 68 untersuchten Nachkommen der Überexprimierer-Linien HH1, WW3 und Z2 konnten 22 Pflanzen mittels PCR identifiziert werden, die homozygot für die T-DNA Insertion im *SYB4* Gen waren (T2-Generation). Demnach war das vom Transgen exprimierte *MYC-SYB4* funktional. Eine Übersicht zu den Pflanzenlinien befindet sich im Anhang.

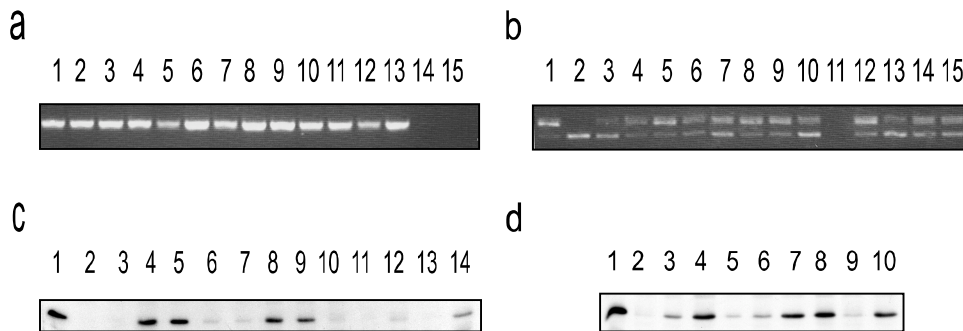


Abbildung 7: Etablierung *MYC-SYB4*-exprimierender Pflanzen.

Die Samen der T0-Pflanzen wurden auf Selektionsplatten ausgestreut (Hygromycin/Kanamycin) und die überlebenden T1-Pflanzen auf Erde umgesetzt. Zur Western Blot Analyse wurden 4-6 Blüten dieser Pflanzen in 40µl Ladepuffer homogenisiert und 5-15µl aufgetragen. Eine Übersicht der Pflanzenlinien befindet sich im Anhang.

a) PCR zum Nachweis der T-DNA Insertion (Allel 1004) mit den Primern Fish I/ Syb4-F1 neu. Der Primer Fish I liegt in der T-DNA Insertion. Das Amplifikat ist ca. 400bp lang. Spur 1: T1-Pflanze HH1, 2-5: WW1-4, 6: Y1, 7-9: Z1-3, 10/11: ZZ2/3, 12/13: heterozygote Positivkontrolle, 14/15: wildtypische Negativkontrolle.

b) PCR zur Unterscheidung zwischen endogenem und Myc-Epitop-markiertem *SYB4* mit den Primern PROM1180/rev CDS160. Die entstehenden Amplifikate sind 373bp (*MYC-SYB4*) bzw. 331bp lang. Spur 1: T1-Pflanze HH1, 2: NN1, 3-6: WW1-4, 7: Y1, 8-10: Z1-3, 11-13: ZZ1-3, 14/15: heterozygote Positivkontrolle.

c) Nachweis des Myc-Syb4-Proteins (ca. 27kDa) mittels Western Blot Analyse. Detektion mit dem anti Syb4 Antiserum. Spur 1: T1-Pflanze HH1, 2: NN2, 3-6: WW1-4, 7: Y1, 8-11: Z1-3+5, 12: ZZ1, 13: ZZ3, 14: ZZ2.

d) Western Blot Detektion mit dem monoklonalen anti Myc-POD Antikörper. Spur 1: T1-Pflanze HH1, 2-5: WW1-4, 6: Y1, 7-9: Z1-3, 10: ZZ2.

2.1.5 Analyse der *MYC-SYB4* exprimierenden Linie HH1

2.1.5.1 Vergleich der Lokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE

Die subzelluläre Verteilung von Syb4 in Keimlingswurzeln konnte mit Hilfe der etablierten *MYC-SYB4* Pflanzenlinien HH1 (siehe Abschnitt 2.1.4) unter Verwendung des gegen das Myc-Epitop gerichteten Antikörpers 9E10 untersucht werden. Ein besonderes Interesse galt dabei dem Vergleich zwischen der Lokalisation von Myc-Syb4 und seinem putativen Interaktor KNOLLE (Abbildung 8). Das Synaptobrevin Syb4 konnte in der Telophase wie KNOLLE in der Teilungsebene nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung schienen die beiden Proteine jedoch nicht in denselben Membrankompartimenten, sondern eng benachbart zu sein (dicker Pfeil in Abbildung 8c). Zudem beschränkte sich die Färbung, anders als bei KNOLLE, nicht auf sich teilende Zellen, sondern war in allen Zellen der

Keimlingswurzeln zu erkennen. Myc-Syb4 konnte in der Peripherie der Zelle, der Kernhülle und zusätzlich in weiteren subzellulären Kompartimenten nachgewiesen werden. Auch mit dem anti KNOLLE Antiserum waren neben der Zellplatte weitere, kleinere Kompartimente zu erkennen. Diese befanden sich in unmittelbarer Nähe zu den mit Myc-Syb4-markierten Kompartimenten (dünner Pfeil in Abbildung 8c).

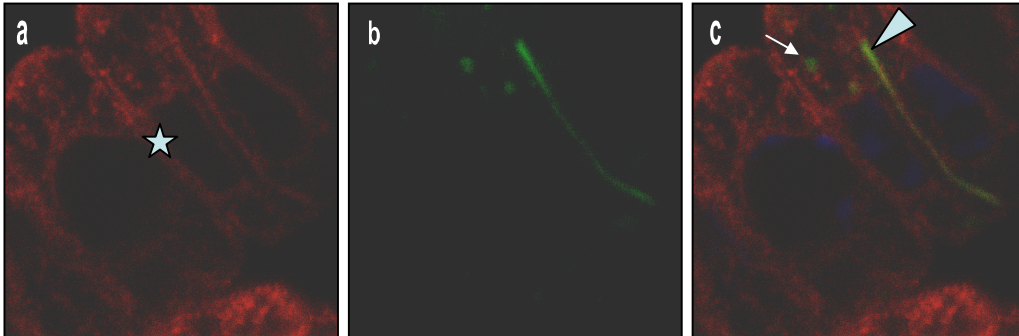


Abbildung 8: Vergleich der subzellulären Lokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE.

a) Nachweis von Myc-Syb4 mit dem anti Myc Antikörper 9E10 (Cy3, rot). Die Markierung der Zelle in der Peripherie ist mit einem Stern gekennzeichnet.

b) Immunfärbung mit dem anti KNOLLE Antiserum (FITC, grün).

c) Überlagerung der beiden Färbungen von a) und b) sowie einer DAPI-Färbung der DNA. Die benachbarten Signale in der Teilungsebene sind durch einen dicken Pfeil, in weiteren Kompartimenten in der Zelle durch einen dünnen Pfeil gekennzeichnet.

Durch die Doppelfärbung mit dem anti Myc- und dem anti KNOLLE Antiserum konnte somit weder eine Colokalisation in der Zellplatte noch eine ähnliche zellzyklusspezifische Expression nachgewiesen werden.

2.1.5.2 Detaillierte Analyse der subzellulären Lokalisation von Syb4

Die genauere Beschreibung der subzellulären Verteilung von Myc-Syb4 war durch die Doppelfärbung von Keimlingswurzeln mit verschiedenen Markerproteinen möglich. Ein Vergleich der Lokalisation des plasmamembranständigen, putativen Auxintransporters PIN1 (Geldner et al., 2001) und Myc-Syb4 lieferte ähnlich wie die Doppelfärbung von Myc-Syb4 und KNOLLE eng benachbarte Signale, jedoch keine Colokalisation (Abbildung 9c). Das PIN1-Signal erschien deutlich schärfer und stets flankiert von dem des Synaptobrevins Syb4 (Abbildung 9a-c).

Dem gegenüber offenbarte die Doppelfärbung von SEC12 und Myc-Syb4 eine klare Colokalisation der beiden Proteine in allen markierten subzellulären Kompartimenten (Abbildung 9d-f). SEC12 wirkt als GEF der GTPase SAR1 und wurde zuvor als ER-residentes Protein beschrieben (Bar-Peled and Raikhel, 1997). Neben der Kernhülle war das cortikale ER, welches unmittelbar unter der Plasmamembran liegt, mit beiden Antiseren deutlich markiert (gelbe Signale in Abbildung 9f). Die mit der Teilungsspindel assoziierte Myc-Syb4-Färbung in Abbildung 9g (mit einem Stern gekennzeichnet) erinnerte an die in der Literatur beschriebene Markierung des ER in der Metaphase (Nebenführ et al., 2000, Burri et al., 2003).

Die Doppelfärbung mit Antiseren gegen zwei verschiedenen Golgi-residente Proteine lieferte keinerlei Colokalisationen (Abbildung 9g-l). Gamma-COP (SEC21), eine Untereinheit des am retrograden Transports beteiligten COP I-Komplexes, wurde als *cis*-Golgi residentes Protein beschrieben (Ritzenthaler et al., 2002; Stenbeck et al., 1992). Es erschien in kleineren Bereichen gleichmäßiger über die Zelle verteilt (Abbildung 9h und i). Das Syntaxin TLG2a diente als TGN Marker Protein (Sanderfoot et al., 2001; Abeliovich et al., 1998). Mit dem gegen TLG2a gerichteten Antiserum wurden größere Areale, in unmittelbarer Nähe zum ER-lokalisierten Synaptobrevin Syb4 angefärbt (Abbildung 9k und l).

Auch mit einem Antiserum gegen das im PVC lokalisierte Syntaxin PEP12 (Sanderfoot et al., 1998) war keine Überlagerung der Signale zu erkennen (Abbildung 9m-o).

Somit kann festgestellt werden, dass die detaillierte Analyse der subzellulären Lokalisation des putativen Synaptobrevins Syb4 ausschließlich mit dem Antiserum gegen das ER-residente Protein SEC12 eine klare Colokalisation der Signale liefert.

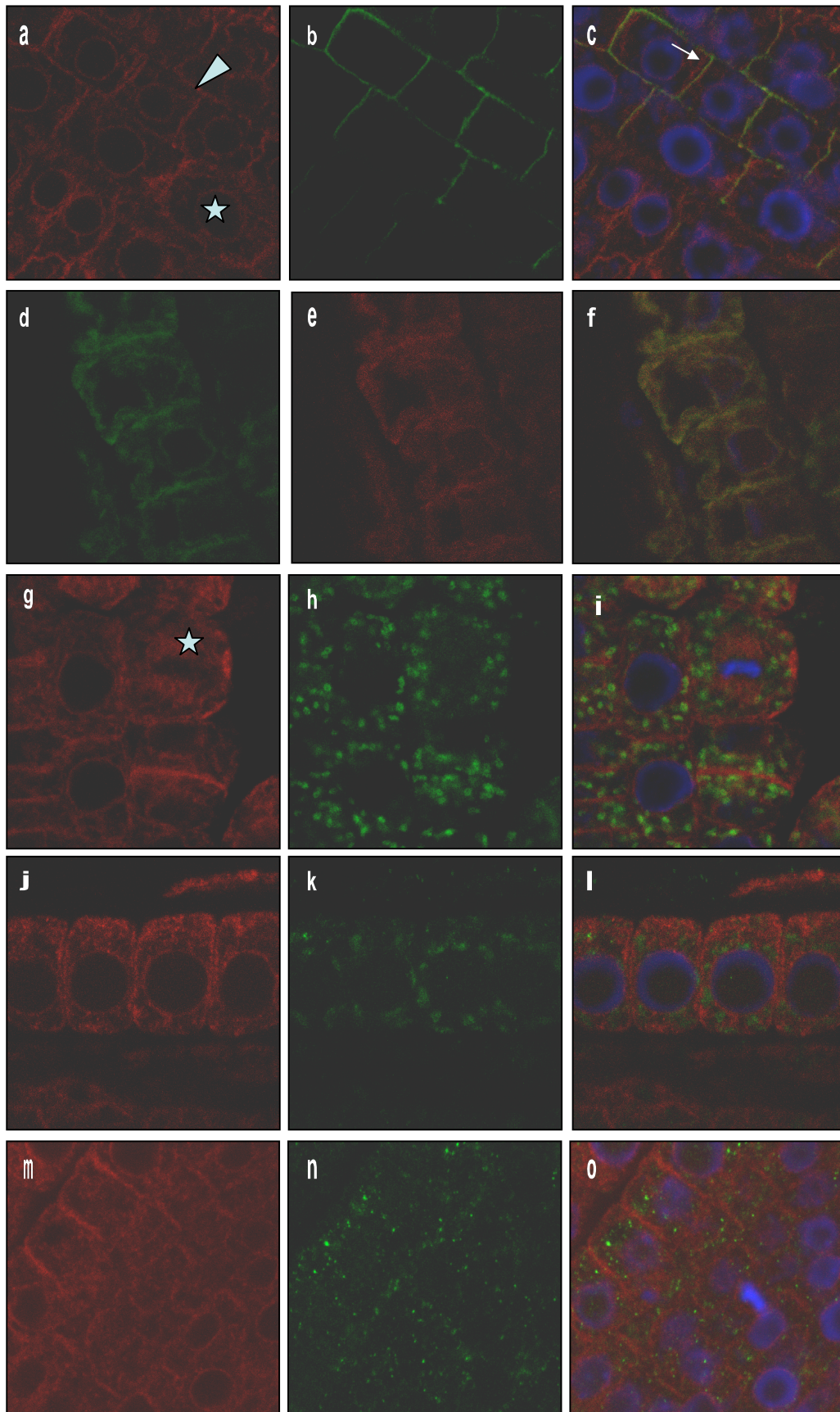


Abbildung 9: Detaillierte Analyse der subzellulären Lokalisation von Myc-Syb4.

Bis auf die Färbung von SEC12 (in rot, Cy3) sind die Signale der verschiedenen Markerproteine jeweils in grün (FITC) dargestellt. Bei der Überlagerung der Kanäle ist zusätzlich die DAPI-Färbung der DNA zu sehen.

a), d), g), j) und m) Indirekte Immunlokalisation von Myc-Syb4 mit dem anti Myc Antikörper 9E10 (a, g, j, m in rot, Cy3; d in grün, FITC).

a) Die Markierung der Zellperipherie ist durch einen dicken Pfeil, die der Kernhülle durch einen Stern markiert.

b) Immunlokalisation von PIN1 an der PM.

c) Überlagerung der Färbung von Myc-Syb4 und PIN1. Die eng benachbarten Signale sind durch einen dünnen Pfeil gekennzeichnet.

e) Immunfärbung des ER-residenten Proteins SEC12.

f) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und SEC12. Die Colokalisation beider Proteine wird durch die gelbe Farbe bei der Überlagerung der Einzelkanäle deutlich.

g) Die mit der Teilungsspindel assoziierten Myc-Syb4-Signale sind durch einen Stern markiert.

h) Immunfärbung von gamma-COP (SEC21) am *cis*-Golgi.

i) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und gamma-COP.

k) Immunfärbung des TGN residenten Syntaxins TLG2a.

l) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und TLG2a.

n) Immunfärbung des Syntaxins PEP12 am PVC.

o) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und PEP12.

2.1.5.3 Subzelluläre Verteilung von Myc-Syb4 bei Inhibierung der Sekretion durch BFA

Brefeldin A (BFA) inhibiert zahlreiche ARF-Proteine. Dies führt zur Blockierung des sekretorischen Systems durch Inhibierung der Vesikelabschnürung an den Golgi-Apparaten (Ritzenthaler et al., 2002) und den endosomalen Kompartimenten (Geldner et al., 2001; Geldner et al., 2003) sowie zu deren morphologischen Veränderung. Durch Inkubation der Keimlinge mit BFA konnte untersucht werden, ob sich die subzelluläre Verteilung des Synaptobrevins Syb4 ändert, wie dies z.B. für KNOLLE oder den putativen Auxin-Transporter PIN1 beschrieben wurde (Geldner et al., 2003). In Abbildung 10 ist deutlich zu erkennen, wie das normalerweise in die Zellplatte lokalisierende KNOLLE (Abbildung 10d) nach Behandlung mit BFA in den „BFA-Kompartimenten“ akkumulierte (Abbildung 10b und c; durch einen dicken Pfeil in c gekennzeichnet). Dem gegenüber änderte sich die subzelluläre Lokalisation von Syb4 nicht (Abbildung 10a, c und d). Bei genauer Betrachtung konnte keine Colokalisation von KNOLLE und Syb4 in diesen Kompartimenten beobachtet werden. Die Myc-Syb4-Färbung in der Teilungsebene blieb auch nach Behandlung mit BFA erhalten (dünner Pfeil in Abbildung 10c). Die Doppelmarkierung mit PIN1 verdeutlichte den Ausschluss von Myc-Syb4 aus den „BFA-Kompartimenten“ noch einmal. Während sich

die Lokalisation von PIN1 drastisch veränderte (Abbildung 10f-h), war die Verteilung von Syb4 ebenso wenig betroffen wie die von SEC12 (Abbildung 10j-l). Auch nach Behandlung mit BFA war eine vollständige Colokalisation von SEC12 und Syb4 im ER zu erkennen. Gamma-COP akkumulierte dagegen in größeren Bereichen der Zelle, die sich jedoch von der Myc-Syb4 Färbung deutlich unterschieden (Abbildung 11b-d). Die Verteilung von TLG2a und PEP12 war von der BFA-Behandlung nicht betroffen (Abbildung 11f-h und j-l).

Somit konnte auch nach Blockierung der Sekretion durch Behandlung mit BFA ausschließlich mit dem ER-ständigen SEC12 und Myc-Syb4 eine Colokalisation beobachtet werden. Die subzelluläre Verteilung von Myc-Syb4 blieb durch diese Behandlung eindeutig unverändert.

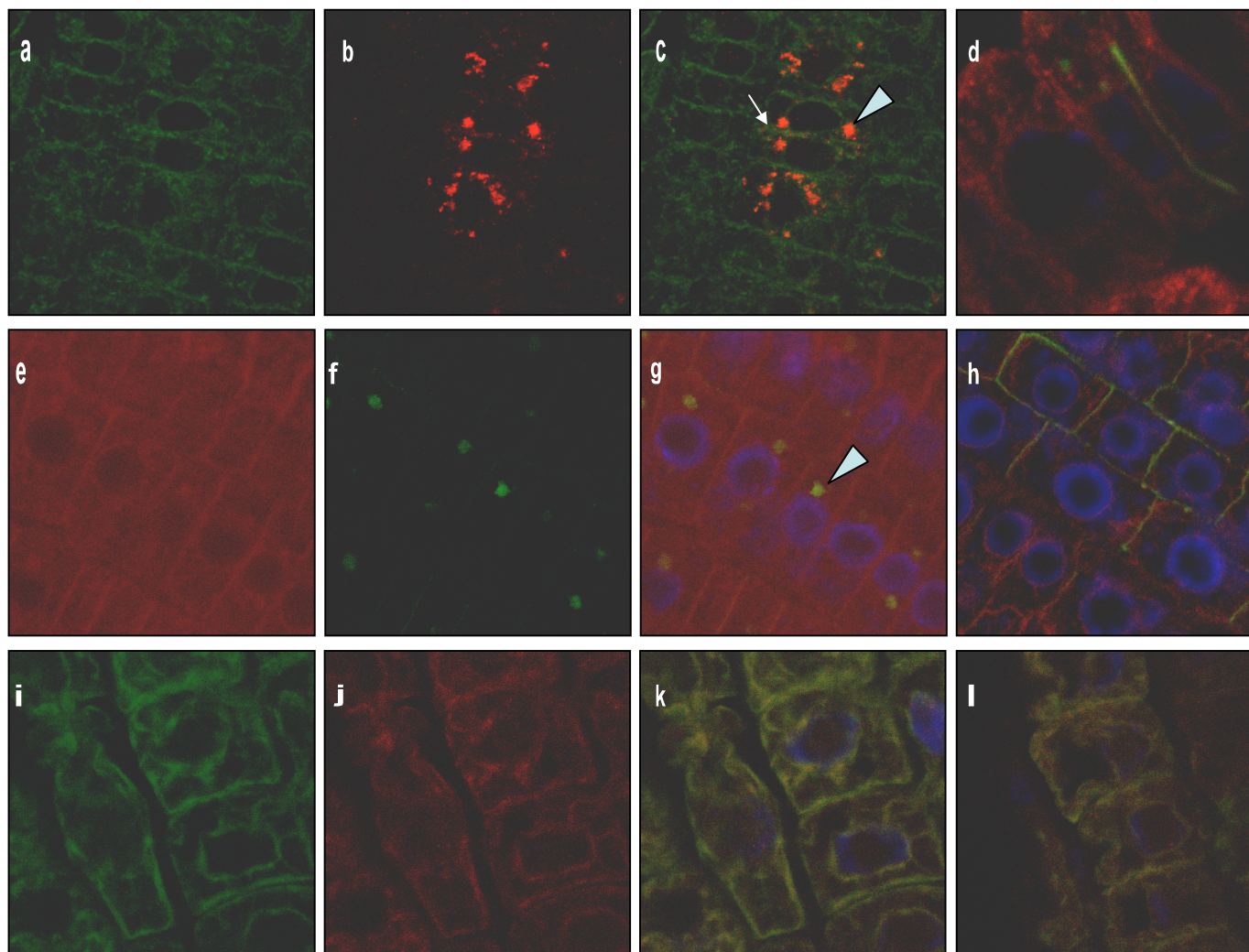


Abbildung 10

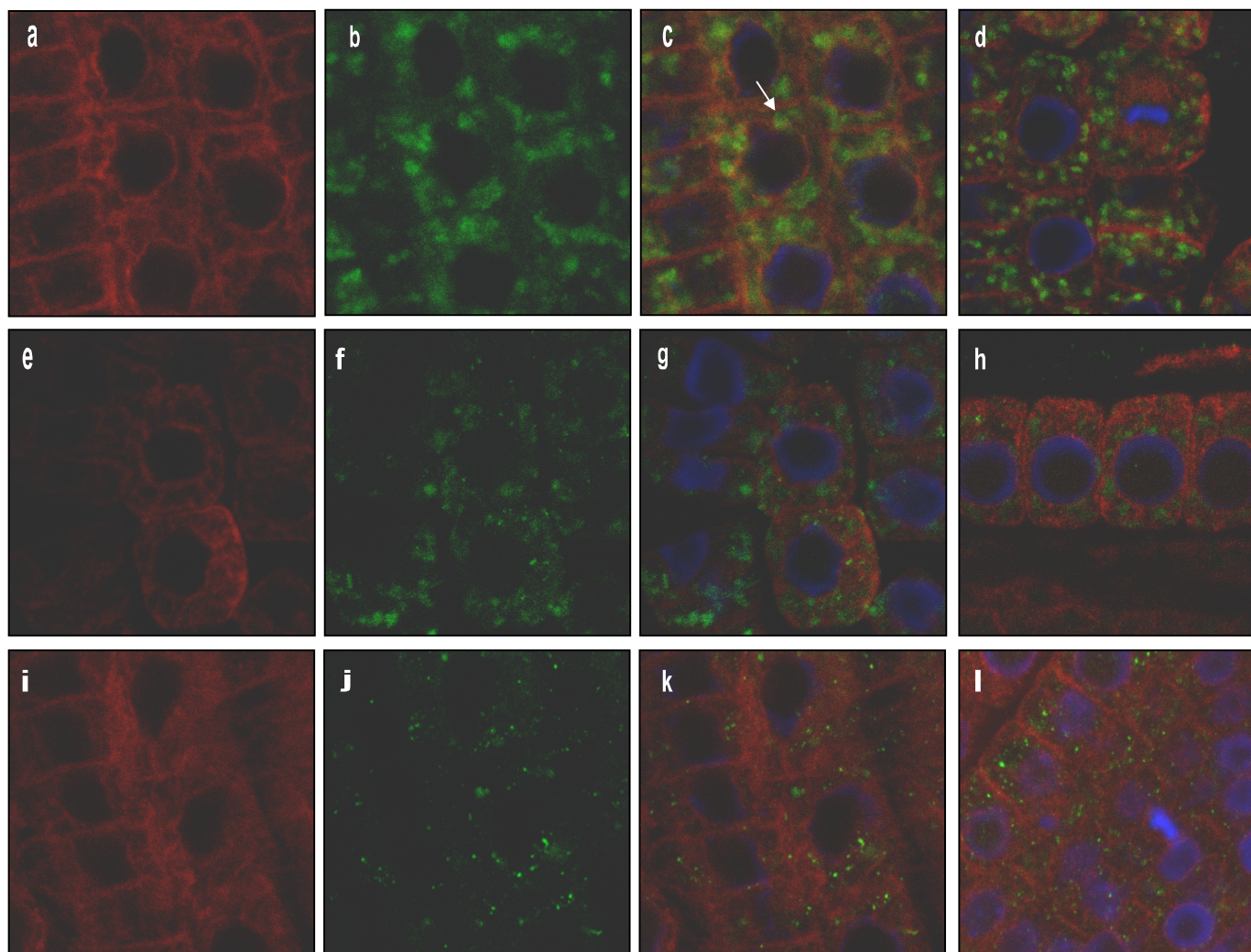


Abbildung 11

Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4 nach Inhibierung der Sekretion durch BFA.

Bei der Doppelfärbung von Myc-Syb4 mit KNOLLE (+BFA) sowie mit SEC12 (+/-BFA) ist Myc-Syb4 in grün (FITC) und KNOLLE bzw. SEC12 in rot (Cy3) dargestellt. Bei der Überlagerung der Kanäle ist zusätzlich die DAPI-Färbung der DNA zu sehen.

- a), e) und i) Indirekte Immunlokalisation von Myc-Syb4 mit dem anti Myc Antikörper 9E10.
- b) Immunlokalisation von KNOLLE nach BFA-Behandlung.
- c) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und KNOLLE nach BFA-Behandlung. Das KNOLLE-Signal in den „BFA-Kompartimenten“ ist durch einen dicken, das Myc-Syb4-Signal in der Teilungsebene durch einen dünnen Pfeil gekennzeichnet.
- d) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 (rot, Cy3) und KNOLLE (grün, FITC) ohne BFA-Behandlung.
- f) Immunlokalisation von PIN1 nach BFA-Behandlung.
- g) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 (rot, Cy3) und PIN1 (grün, FITC) nach BFA-Behandlung. Das PIN1-Signal in den „BFA-Kompartimenten“ ist durch einen dicken Pfeil gekennzeichnet.
- h) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 (rot, Cy3) und PIN1 (grün, FITC) ohne BFA-Behandlung.
- j) Immunlokalisation von SEC12 nach BFA-Behandlung.
- k) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und SEC12 nach BFA-Behandlung. Die Colokalisation beider Proteine wird durch die gelbe Farbe bei der Überlagerung der Einzelkanäle deutlich.
- l) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und SEC12 ohne BFA-Behandlung.

Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation verschiedener Markerproteine und von Myc-Syb4 nach Behandlung mit BFA.

Die verschiedenen Markerproteine sind jeweils in grün (FITC) und Myc-Syb4 in rot (Cy3) dargestellt. Bei der Überlagerung der Kanäle ist zusätzlich die DAPI-Färbung der DNA zu sehen.

- a), e) und i) Indirekte Immunlokalisation von Myc-Syb4 mit dem anti Myc Antikörper 9E10 in.
- b) Immunlokalisation von gamma-COP nach BFA-Behandlung.
- c) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und gamma-COP (SEC21) nach BFA-Behandlung. Die Akkumulation von gamma-COP in größeren Arealen der Zelle ist durch einen dünnen Pfeil markiert.
- d) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und gamma-COP ohne BFA-Behandlung.
- f) Immunlokalisation von TLG2a nach BFA-Behandlung.
- g) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und TLG2a nach BFA-Behandlung.
- h) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und TLG2a ohne BFA-Behandlung.
- j) Immunlokalisation von PEP12 nach BFA-Behandlung.
- k) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und PEP12 nach BFA-Behandlung.
- l) Überlagerung der Signale von Myc-Syb4 und PEP12 ohne BFA-Behandlung.

2.2 Die Interaktion des Sec1/Munc18-Proteins KEULE mit dem cytokinespezifischen Syntaxin KNOLLE

keule und *knolle* homozygote Embryonen weisen sehr ähnliche Störungen in der Cytokinese auf. KEULE besitzt hohe Homologie zur Sec1/Munc18-Proteinfamilie und interagiert mit KNOLLE *in vitro* (Waizenegger et al., 2000; Assaad et al., 2001). Bisher sind jedoch keine Lokalisationsstudien zu KEULE bekannt. Daher wurden *MYC-KEULE*-transgene Pflanzenlinien etabliert, welche die Analyse der subzellulären Verteilung von KEULE in Keimlingswurzeln mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers erlauben. Darüber hinaus soll der Einfluss einer Punktmutation im N-Terminus des KEULE-Interaktors KNOLLE und dessen Deletion auf die Myc-KEULE-Lokalisation untersucht werden. Hierzu soll Myc-KEULE in *knolle* homozygoten Embryonen exprimiert werden, von denen manche zusätzlich das punktmutierte KNOLLE-Transgen tragen.

2.2.1 Klonierung und Expression von Myc-Epitop-markiertem KEULE unter Kontrolle von *KNOLLE*-cis-regulatorischen Elementen

Zur Untersuchung der Lokalisation von KEULE in Pflanzenzellen wurde Myc-Epitop-markiertes KEULE unter der Kontrolle von *KNOLLE* cis-regulatorischen Sequenzen exprimiert (Abbildung 12). Mit Hilfe des *KNOLLE* Promotors ist es möglich, Gene zellzyklusspezifisch und besonders stark zu exprimieren (Müller et al., 2003). Ausgehend von einer cDNA-Bibliothek aus Blüten und jungen Schoten (Grebe et al., 2000) konnte mit dem Primer-Paar fw KEULE/re KEULE die 2001bp lange *KEULE* cDNA amplifiziert werden. Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *Xba*I wurde das PCR-Fragment in ein pBluescript-Plasmid (pKS) einkloniert, welches bereits die Myc-Epitop codierende Sequenz sowie die *KN* cis-regulatorischen Sequenzen enthielt (Müller et al., 2003). Da in beiden für die Amplifikation eingesetzten Primern eine *Xba*I-Erkennungssequenz enthalten war, konnte die Insertion in das Plasmid in beiden Orientierungen erfolgen. Daher musste nach Klonen

gesucht werden, welche die *KEULE* cDNA in der richtigen Orientierung enthielten. Die isolierten Plasmide wurden mit *SmaI* verdaut. Bei richtiger Orientierung entstanden 2 Fragmente mit Größen von 556bp und 7901bp, bei falscher Orientierung mit Größen von 1491bp und 6966bp (Daten nicht gezeigt). Die Umklonierung in das entsprechende bei Müller et al. (2003) beschriebene pBAR B-Plasmid (Vektor für *Agrobacterium tumefaciens*) erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SpeI/HpaI*. Schließlich wurden *keule* (Allel MM125) bzw. *knolle* (Allel X37-2) heterozygote Pflanzen transformiert. Das Allel MM125 enthält eine durch Röntgenstrahlung induzierte Deletion von 156bp im *KEULE* Gen (Assaad et al., 2001). Das Allel X37-2 besitzt eine Deletion von ca. 1kb (Lukowitz et al., 1996). Eine Tabelle mit allen etablierten Bakterienstämmen und Pflanzenlinien befindet sich im Anhang.

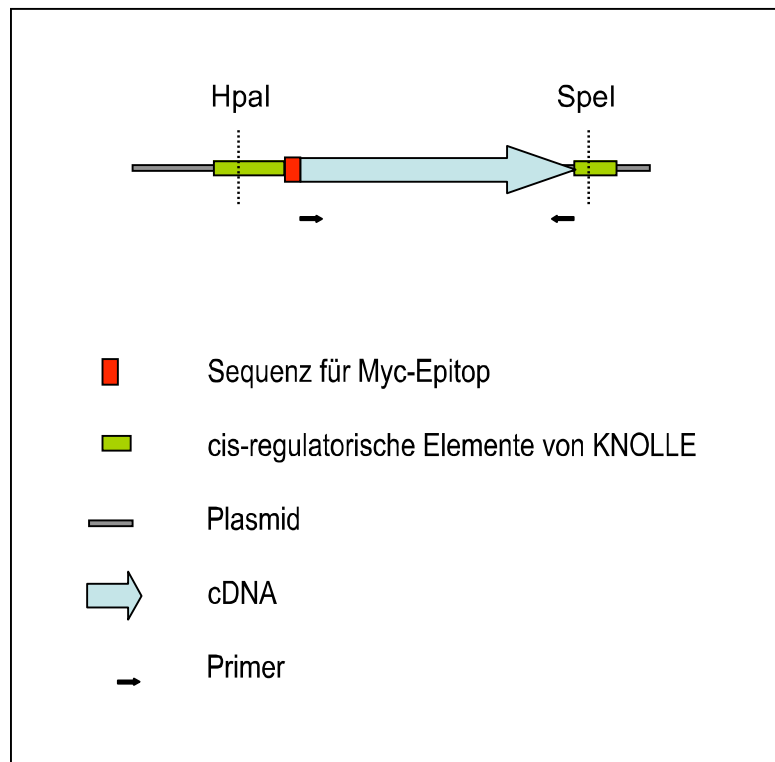


Abbildung 12 Schematische Darstellung des Konstrukts zur Expression von *MYC-KEULE* unter Kontrolle der *cis*-regulatorischen Elemente von *KNOLLE*.

Die BASTA resistenten Pflanzen der T1-Generation wurden mittels PCR und Western Blot analysiert. Mit den Primern KEU genom 3400/rev KEULE genom konnte zwischen dem wildtypischen (829bp) und dem mutanten *keule* Allel MM125 (673bp) unterschieden werden. Wie Abbildung 13a zu

entnehmen ist, waren die Linien G2a-212, G2a-124, I2a-216 und G2a-218 heterozygot für das *keule* Allel MM125. Zudem konnte in den Linien G2a-212, G2a-213 und G2a-214 die Expression von Myc-KEULE mit dem Myc-POD Antikörper in Blüten und jungen Schoten nachgewiesen werden (Abbildung 13b).

Zur Unterscheidung zwischen wildtypischen und dem mutanten *knolle* Allel X37-2 dienen die Primer X37-2 CII und X37-2 D. Lediglich Linie F3a-246 war heterozygot für das *knolle* Allel X37-2 (Abbildung 13c).

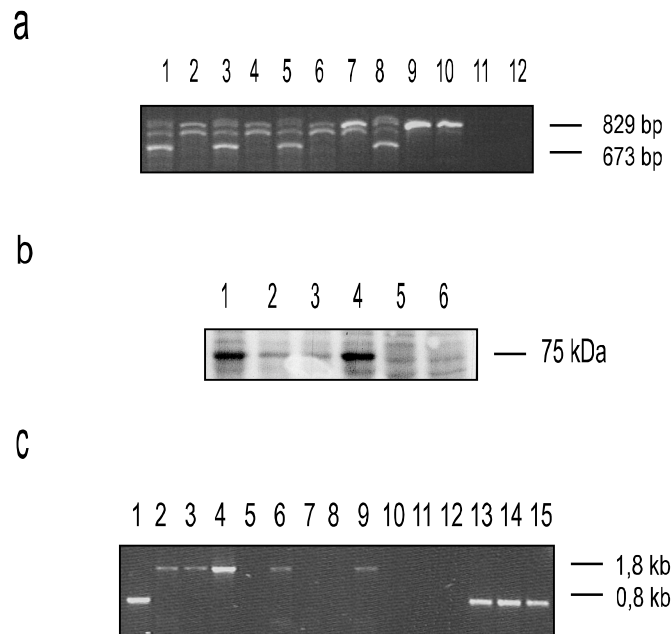


Abbildung 13 Beispiele zur Untersuchung der BASTA resistenten T1-Generation nach Transformation von MM125 bzw. X37-2 heterozygoten Pflanzen mit Myc-KEULE.

Die Nomenklatur der Pflanzen befindet sich im Anhang.

a) PCR zur Unterscheidung zwischen wildtypischem und mutantern *keule* Allel MM125 mit den Primern KEU genom 3400/rev KEULE genom. Erwartete Fragmente: wildtypisch 829bp, mutant 673bp. Spur 1-4: T1-Linie G2a-212 bis -215; Spur 5: Linie I2a-216; Spur 6-8: Linie G2a-217 bis -219; Spur 9 und 10: wildtypische Kontrolle; Spur 11 und 12: Wasserkontrolle.

b) Western Blot Analyse von Blüten/Schoten der T1-Pflanzen. Detektion des ca. 75kDa großen Myc-KEULE mit dem Myc-POD Antikörper. Spur 1-4: Linie G2a-212 bis -214 und -217; Spur 5: Linie I2a-235; Spur 6: wildtypische Negativkontrolle.

c) PCR zur Unterscheidung zwischen wildtypischem und mutantern *knolle* Allel X37-2 mit den Primern X37-2 CII/X37-2 D. Erwartete Banden: wildtypisch ca. 1800bp, mutant ca. 800bp. In X37-2 heterozygoten Pflanzen wurde bevorzugt das kürzere Fragment amplifiziert, so dass Bande mit 1800bp meist nicht zu sehen war. Spur 1, 2 und 4: Linie F3a-246, 247 und -249; Spur 3 und 5-9: Linie G2a-248 und -250 bis -254; Spur 10-12: Wasserkontrolle; Spur 13-15: heterozygote X37-2 Positivkontrolle.

In der T1-Generation konnten somit mehrere Myc-KEULE exprimierende Pflanzenlinien nachgewiesen werden, die jedoch alle mindestens ein

wildtypisches *KEULE* Allel enthielten. Bei Funktionalität des *MYC-KEULE*-Transgens werden in der T2-Generation der MM125-heterozygoten Pflanzen *keule* homozygote Nachkommen erwartet, welche das Transgen tragen. Bislang konnte nur eine X37-2-heterozygote Pflanzenlinie etabliert werden, welche das *MYC-KEULE* Transgen enthält.

2.2.2 Klonierung und Expression von punktmutiertem, T7-Epitop-markiertem KNOLLE

Für die Wechselwirkung zwischen Syntaxinen und den Proteinen der Sec1/Munc18-Proteinfamilie gibt es mindestens drei unterschiedliche Möglichkeiten der Interaktion (siehe Abschnitt 1.4). Bei einer Variante interagiert das Sec1/Munc18-Protein mit dem Syntaxin über eine N-terminale Erkennungssequenz. Dabei tragen ein Threonin (im Fall von Sed5p an Position 7) und ein Phenylalanin (Position 10 in Sed5p) besonders stark zu dieser Wechselwirkung bei (Bracher und Weissenhorn, 2002). Der N-Terminus von KNOLLE enthält ein Threonin an Position 6 und ein Phenylalanin an Position 9, was eine derartige Interaktion mit einem Sec1/Munc18-Protein ermöglichen könnte. Zudem enthält sowohl der N-Terminus von Sed5p als auch der von KNOLLE geladene Aminosäuren (Arginin 4 und Aspartat 5 bei Sed5p, Aspartat 3 bei KNOLLE). Nachdem die *in vitro*-Interaktion von KNOLLE mit dem Sec1/Munc18-Protein KEULE bereits gezeigt werden konnte (Assaad et al., 2001), sollte nun überprüft werden, ob diese tatsächlich über den N-Terminus von KNOLLE stattfindet. Hierzu wurden das Threonin 6 und das Phenylalanin 9 mittels „Primer Extension PCR“ jeweils durch ein Alanin ersetzt (Abbildung 14). Als „Template“ diente das Plasmid 84-6, welches für N-terminal T7-Epitop-markiertes und C-terminal mit einem „His-tag“ versehenes KNOLLE codiert (Völker, 2001). Mit den Primern fw 5'UTR-Sall/re KN-AxxA sowie fw KN-AxxA/re CDS-Drall wurden zunächst die beiden Teilfragmente amplifiziert (609 bzw. 69bp), welche die beiden Punktmutationen enthielten, und anschließend für die „Primer Extension PCR“ eingesetzt wurden. Nach Verdau mit *Sall/Drall* wurde das resultierende 678bp lange Fragment in das

entsprechend geschnittene pBluescript-Plasmid einkloniert (Müller et al., 2003). Dieses enthielt bereits die *cis*-regulatorischen Sequenzen von *KNOLLE* sowie ein Myc-Epitop markiertes *KNOLLE* Gen. Durch den *Sall/Drall*-Verdau konnte der Myc-Epitop markierte N-Terminus von *KNOLLE* aus diesem Plasmid durch den T7-Epitop markierten, punktmutierten N-Terminus ersetzt werden. Der Austausch des N-Terminus bzw. der Epitop-Markierung wurde mittels Kontrollverdau der Plasmide mit dem Restriktionsenzym *AspEI* überprüft. In der Sequenz für das T7-Epitop war eine zusätzliche Erkennungssequenz für *AspEI* enthalten wodurch beim Kontrollverdau drei Fragmente mit einer Größe von 1953bp, 2287bp und 3134bp, aus dem Ausgangsplasmid dagegen zwei Fragmente mit 1953 und 5421bp entstanden (Abbildung 15). Die Umklonierung in das pBAR B-Plasmid erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SpeI/HpaI*. Schließlich wurden *knolle* (Allel X37-2) heterozygote Pflanzen transformiert.

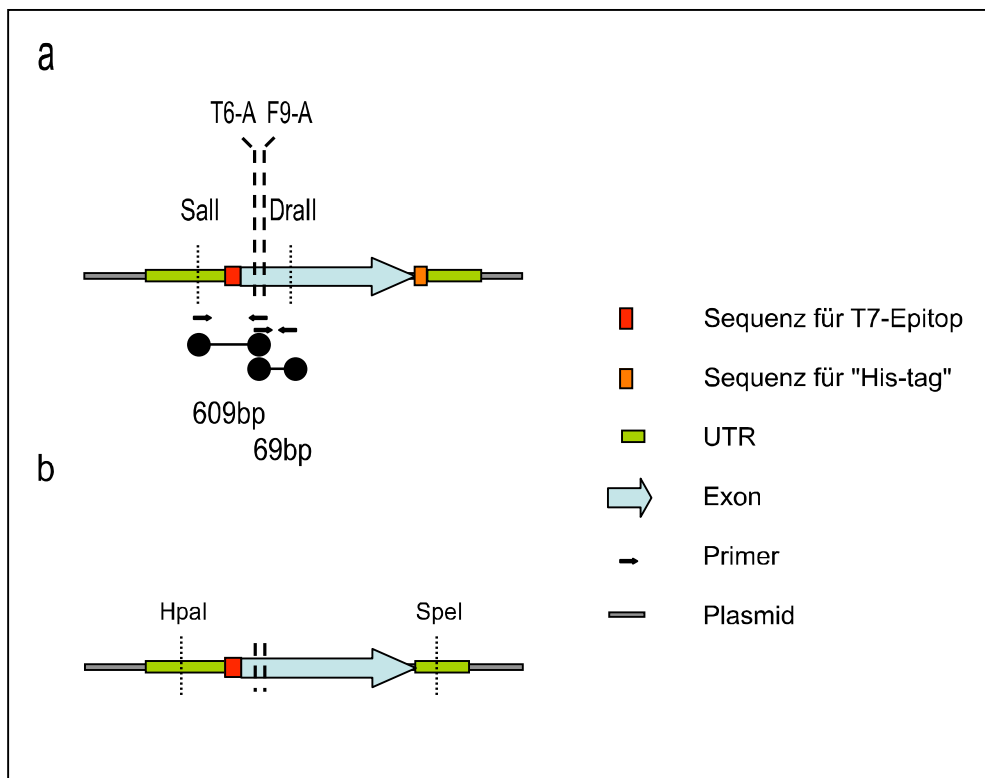


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Klonierung des punktmutierten KNOLLE.

a) Verwendete „Template“ DNA zur Einführung der Aminosäureaustausche (T6-A, F9-A) mittels „Primer Extension PCR“. Die beiden Teilfragmente sowie die Lage der Erkennungssequenzen der zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

b) Konstrukt nach Einführung der Punktmutationen. Die Lage der Erkennungssequenzen der für die Umklonierung in das pBAR B-Plasmid verwendeten Restriktionsenzyme sind markiert.

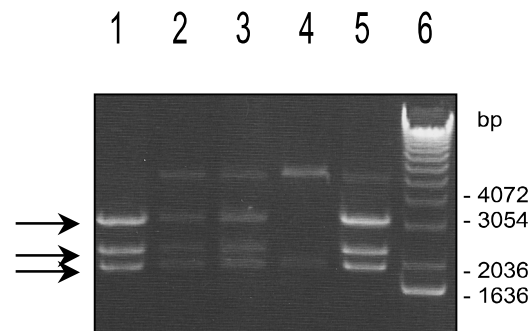


Abbildung 15: Unterscheidung zwischen Myc-KNOLLE und T7-KNOLLE-AxxA.

Nach Austausch des Myc-Epitop-markierten N-Terminus von KNOLLE gegen den T7-Epitop-markierten N-Terminus, welcher die beiden Punktmutationen trägt, wurde das pKS-Plasmid mit dem Restriktionsenzym AspEI verdaut. Das Ausgangsplasmid (mit Myc-KNOLLE) lieferte 2 (Spur 4), das neue Konstrukt (mit T7-KNOLLE-T6-A, F9-A) 3 Fragmente (Spur 1-3 und 5). Spur 6: Größenstandard.

Die BASTA resistenten Pflanzen der T1-Generation wurden mittels PCR und Western Blot analysiert. Das mutante *knolle* Allel X37-2 konnte mit den Primern X37-2 CII/X37-2 D nachgewiesen werden (PCR-Fragment mit ca. 800bp). Da die „Elongationszeit“ bei der in Abbildung 16a dargestellten PCR auf 1min verkürzt wurde, konnte kein PCR-Fragment vom wildtypischen Allel amplifiziert werden. Die Linien B2a-1, B2a-2, B2a-7, B2a-8, B2a-9, A1a-11, C2a-14 und C2a-17 enthielten das *knolle* Allel X37-2. Abbildung 16b zeigt eine erste Analyse der Expression des T7-KNOLLE-AxxA-Transgens. In allen untersuchten Linien konnte durch Detektion mit dem anti KNOLLE Antiserum sowohl das endogene KNOLLE als auch T7-KNOLLE-AxxA nachgewiesen werden. Auffallend war, dass die T7-KNOLLE-AxxA-Bande deutlich schwächer war (mit Pfeil markierte Bande in Abbildung 16b). Die Funktionalität des punktmultierten KNOLLE kann in der T2-Generation überprüft werden.

Somit konnten in der T1-Generation mehrere Pflanzenlinien etabliert werden, welche das punktmultierte *KNOLLE* Transgen tragen und exprimieren. Ein dominant negativer Effekt konnte somit ausgeschlossen werden. Alle untersuchten Pflanzen besaßen einen wildtypischen Phänotyp.

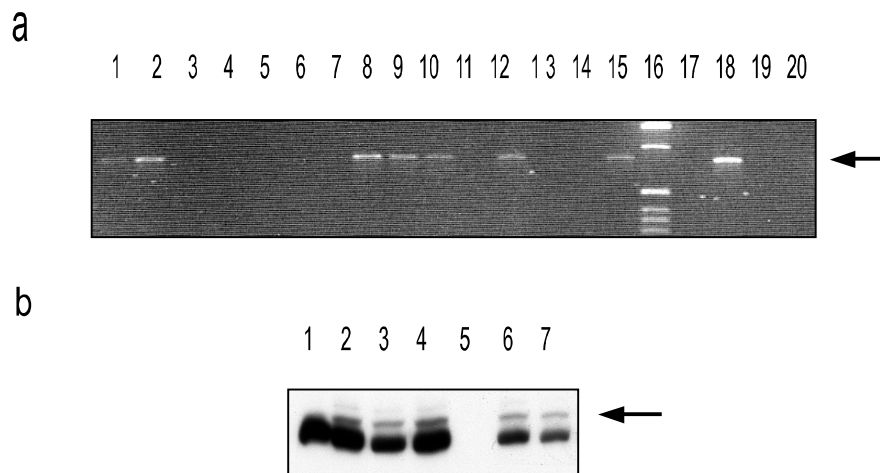


Abbildung 16: Untersuchung der BASTA resistenten T1-Pflanzen nach Transformation von X37-2 heterozygoten Pflanzen mit T7-KNOLLE-AxxA.

Eine Tabelle der transgenen Pflanzen befindet sich im Anhang.

a) PCR zum Nachweis des mutanten *knolle* Allels X37-2 mit den Primern X37-2 CII/X37-2 D. Die erwartete Bande des mutanten Allels (ca. 800bp) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Spur 1-10 und 15: Linie B2a-1 bis -10 und -15; Spur 11-13: Linie A1a-11 bis -13; Spur 14, 17 und 18: Linie C2a-14, -16 und -17; 16: DNA-Größenstandard; Spur 19 und 20: Wasserkontrolle.

b) Western Blot Analyse von Blüten/Schoten der T1-Pflanzen. Detektion mit dem anti KNOLLE Antiserum aus Kaninchen. Die obere, mit dem Pfeil markierte Bande stammt vom Epitop-markierten T7-KNOLLE-AxxA, die untere vom endogenen KNOLLE. Spur 1: Linie C2a-14; Spur 2-4: Linie A1a-11 bis -13; Spur 5: Marker; Spur 6 und 7: Linie B2a-9 und -10.

2.3 Biochemische Charakterisierung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe

Neben der bereits beschriebenen Interaktion von KNOLLE mit KEULE (Abschnitt 2.2) konnte *in vitro* eine Wechselwirkung mit SNP33 nachgewiesen werden (Heese et al., 2001). Zudem spricht die Colokalisation von KNOLLE und SNP33 an der Zellplatte für eine direkte Interaktion beider Proteine. Um diese zu bestätigen und weitere Interaktoren von KNOLLE identifizieren zu können, sollten KNOLLE enthaltende Proteinkomplexe aufgereinigt werden. Schließlich sollten die in den Komplexen enthaltenen Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

2.3.1 Anreicherung und Nachweis von KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexen

Das cytokinespezifische Syntaxin KNOLLE unterliegt einer strikten zellzyklusspezifischen Kontrolle (Lukowitz et al., 1996) und wird somit ausschließlich in sich teilenden Geweben exprimiert. In einer adulten *Arabidopsis* Pflanze gibt es nur sehr wenige Zellen, die sich teilen (v.a. in meristematischem Geweben). Demgegenüber weisen Wurzelkalluskulturen einen relativ hohen Teilungsindex auf. Um pflanzliches Material für Proteinreinigungen zu gewinnen, welches KNOLLE in ausreichenden Mengen enthielt, wurden daher Wurzelkalluskulturen etabliert, die Epitop markiertes KNOLLE in *knolle* homozygotem Hintergrund exprimierten (u.a. Myc-KNOLLE-His₆). Die His₆-Markierung erlaubte zudem den Einsatz einer Metallaffinitätssäule.

Zur Solubilisierung der Proteine aus der isolierten Mikrosomenfraktion wurde zunächst das Detergenz Triton X100 eingesetzt. Trotz verlängerter Lysezeit konnte jedoch weder eine vollständige Solubilisierung von KNOLLE, noch eine zufriedenstellende Bindung an Ni-NTA-Agarose erreicht werden (zusätzlich Variation der Bindezeit und der Menge an eingesetzter Affinitätsmatrix). Daher wurde untersucht, ob ein anderes Detergenz besser

für die Proteinreinigung geeignet war. Unter den eingesetzten Detergenzien (Natriumdeoxycholat, CHAPS und Octyl-beta-D-Glucopyranosid) hat sich Octyl-beta-D-Glucopyranosid als besonders geeignet erwiesen. Im Vergleich zur Proteinreinigung mit Triton X100 konnte eine deutlich bessere Bindung an Ni-NTA-Agarose erreicht werden (Abbildung 17a und e). Neben einer guten Solubilisierung und Bindung von KNOLLE an die Affinitätssäule, musste bei der Auswahl des geeigneten Detergenz beachtet werden, dass es die KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexe nicht durch Denaturierung zerstörte. Der Nachweis dieser Proteinkomplexe war mittels nativer Mikrogel-elektrophorese und anschließender Western Blot Analyse möglich. Sowohl unter Verwendung von Triton X100 als auch von Octyl-beta-D-Glucopyranosid konnte KNOLLE in einem Proteinkomplex mit ähnlichem apparenten Molekulargewicht (ca. 180kDa) dargestellt werden (Abbildung 17b-d und f). Dem gegenüber konnte in *E.coli* exprimiertes T7-KNOLLE (Heese, 2001) als monomeres Protein nachgewiesen werden (Abbildung 17g). Im Verlauf beider Proteinreinigungen trat eine in ihrer Intensität zunehmende Abbaubande von Myc-KNOLLE-His₆ auf (untere, durch einen Pfeil gekennzeichnete Bande in Abbildung 17a und e). Durch die Verwendung eines gegen das N-terminale Myc-Epitop gerichteten Antiserums konnte in den Western Blot Analysen die Abspaltung dieser Epitop-Markierung während der Proteinreinigung nachgewiesen werden (Abbildung 17e, unten).

Somit konnte erstmals die Aufkonzentrierung von KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexen mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 180kDa durch die Isolierung der Mikrosomenfraktion, gefolgt von der Lyse durch verschiedene Detergenzien und den Einsatz einer Ni-NTA-Affinitätssäule nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass während der Aufreinigung eine N-terminale Degradation von Myc-KNOLLE-His₆ stattfand.

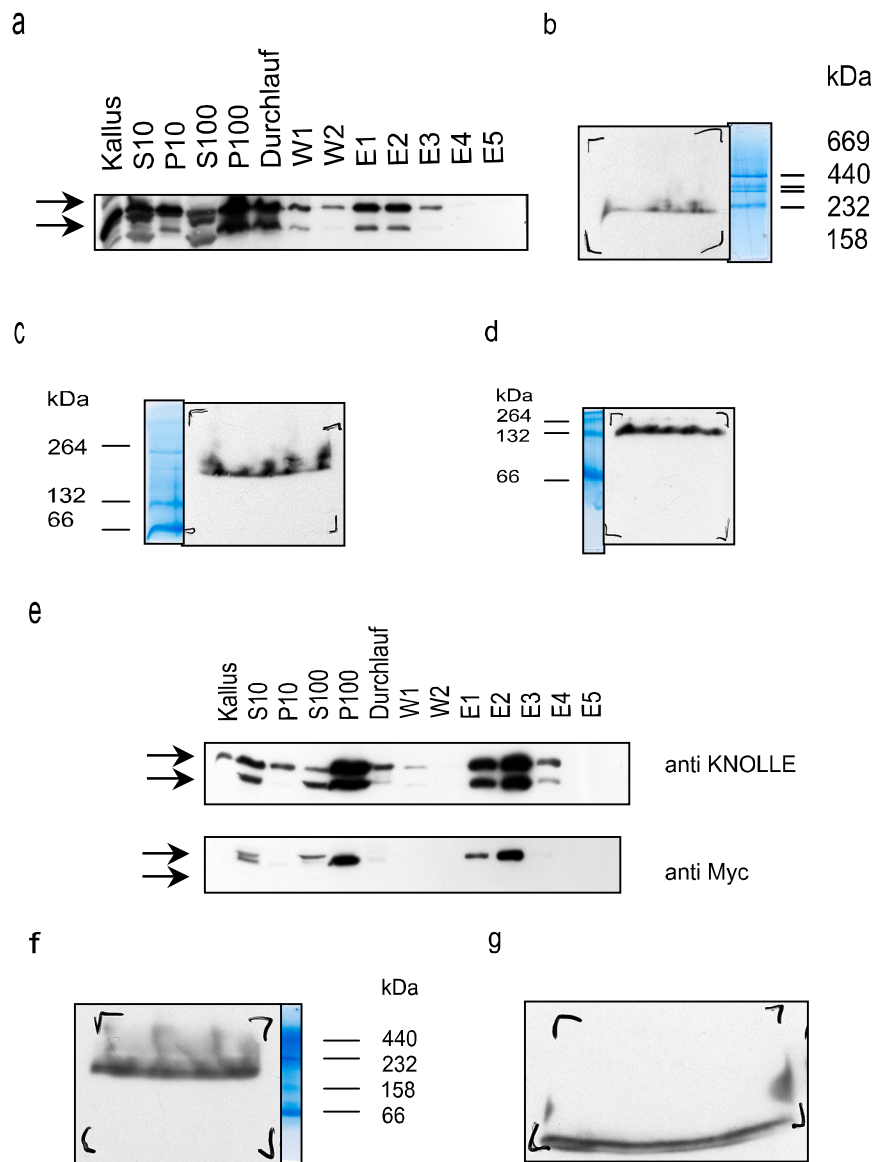


Abbildung 17: Vergleich der Proteinreinigungen mit Triton X100 (a-d) und Octyl-beta-D-Glucopyranosid (e und f) durch Western Blot Analysen.

Auf die nativen Mikrogele wurde jeweils ein Aliquot der Elutionsfraktion 2 der Ni-NTA-Säulen aufgetragen. Den Proben wurden unterschiedliche Markerproteine zugesetzt. Ein Teil der Gele wurde nach der Elektrophorese abgetrennt und die zugesetzten Markerproteine mittels CBB-Färbung nachgewiesen.

a) Verlauf der Proteinreinigung mit Triton X100. Deutlich zu erkennen war die Zunahme der Intensität der Abbaubande sowie die starken Signale im Durchlauf der Ni-NTA-Säule.

b) und c) Natives Acrylamidgradienten-Mikrogele (2-19%). Detektion mit anti KNOLLE Antiserum.

d) Natives Mikrogel (12% Acrylamid). Detektion mit anti KNOLLE Antiserum.

e) Verlauf der Proteinreinigung mit Octyl-beta-D-Glucopyranosid. Die Banden im Durchlauf waren deutlich schwächer als bei der Proteinreinigung mit Triton X100. Bei der Detektion mit Antiserum das gegen die Myc-Epitop Markierung von KNOLLE gerichtet war, konnte nur die obere Bande (Vollängen-Protein) nachgewiesen werden.

f) Natives Acrylamidgradienten-Mikrogel (2-19%). Detektion mit anti KNOLLE Antiserum.

g) Natives Acrylamidgradienten-Mikrogel (2-19%) mit monomerem T7-KNOLLE (in *E.coli* exprimiert) beladen. Bei der Detektion mit anti KNOLLE Antiserum wurde der große

Unterschied im Laufverhalten im Vergleich zum komplexgebundenen KNOLLE aus der Proteinreinigung deutlich.

In flüssigem Stickstoff zermörserter Wurzelkallus E3-302 (Myc-KNOLLE-His₆) wurde 20min in Puffer resuspendiert (je 1g Frischgewicht 4ml Puffer: 50mM Kaliumphosphat pH7,4, 10% v/v Glycerin, 10mM beta-Mercaptoethanol, 10mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail 1x, 0,5mM Aluminiumfluorid). Die Mikrosomenfraktion wurde durch sukzessive Zentrifugation bei 10000g (20min) und 100000g (1h40min) gewonnen. Schließlich wird die Mikrosomenfraktion in Lysepuffer aufgenommen (je g Frischgewicht zu Beginn 0,4ml: 50mM Kaliumphosphat pH8,0, 10% v/v Glycerin, 10mM beta-Mercaptoethanol, 10mM Imidazol, 0,5mM Aluminiumfluorid, 1% v/v Triton X100 bzw. 46mM Octyl-beta-D-Glucopyranosid). Der Bindung an Ni-NTA-Agarose für 1h auf einem Rad im Kühlraum (0,2ml Affinitätsmatrix je g Frischgewicht zu Beginn der Reinigung) folgte das Gießen eines Säulchens. Nach 2 mal waschen mit 10 Säulenvolumen (entspricht dem Lysepuffer, enthielt 20mM Imidazol) erfolgte die Elution mit 5 mal 1 Säulenvolumen Elutionspuffer (entspricht dem Lysepuffer, enthielt 250mM Imidazol).

2.3.2 16-BAC/SDS-2D-Gelelektrophorese (Differentieller Ansatz)

Trotz verbesserter Lyse und Bindung an die Ni-NTA Affinitätssäule war die Darstellung einer KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexbande in CBB-gefärbten, nativen Acrylamidgradienten-Mikrogelen nicht möglich. In den CBB-gefärbten Gelen der Ni-NTA-Elutionsfraktionen konnten stets sehr viele Proteine aus dem Wurzelkallusextrakt nachgewiesen werden, wenn größere Mengen der Probe geladen werden. Auch der Einsatz zusätzlicher Affinitätssäulen (anti Myc-Agarose bzw. anti T7-Agarose; siehe Abschnitt 2.3.4.2) brachte nicht den erhofften Durchbruch. Daher wurde im Anschluss an die Ni-NTA-Säule eine 2D-Gelelektrophorese im Mikrogelmaßstab durchgeführt. Für die erste Dimension wurde ein 16-BAC-Gel eingesetzt, welches speziell für die Trennung integraler Membranproteine etabliert wurde (Hartinger et al., 1996). In der zweiten Dimension wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Mit Hilfe dieser 2D-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen war es möglich, mehr als 100 Proteine aufzutrennen. Um Proteinbanden der putativen KNOLLE-Interaktoren von unspezifisch an die Ni-NTA-Säule gebundenen Proteinen unterscheiden zu können, wurde ein differentieller Ansatz verfolgt. Neben der Proteinreinigung aus dem Wurzelkallus E3-302 (Myc-KNOLLE-His₆) diente in einem Parallelansatz der Wurzelkallus W3-3 (T7-KNOLLE) als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung. Die Bandenmuster der 2D-Gele wurden miteinander verglichen (Abbildung 18) und im Ansatz mit Kallus E3-302 nach zusätzlichen Banden gesucht. Unter der Annahme, dass es sich nur bei diesen

Proteinbanden um KNOLLE-Interaktoren handeln konnte, wurden diese aus dem CBB gefärbten Gel ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Demgegenüber sollte es sich bei allen Banden, die in beiden Ansätzen vorhanden waren, um unspezifisch gebundene Proteine handeln. Auf diese Weise konnten 3 Banden identifiziert und ausgeschnitten werden (Abbildung 18d, Banden 1-3). Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in einer Kooperation mit T. Weinschenk (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen). Der Vergleich der so erhaltenen Proteinsequenzen mit der DNA-Datenbank von *Arabidopsis* lieferte leider für keines der 3 ausgeschnittenen Proteine eine Homologie zu einem Protein, das mit dem Vesikeltransport in Verbindung gebracht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Position des Western Blot Signals von KNOLLE in einem Parallelgel (Abbildung 18f) ließ vermuten, dass es sich bei Bande #1 um KNOLLE handelte. Die massenspektrometrische Analyse von Bande #1 bestätigte dies jedoch nicht.

Somit musste festgestellt werden, dass der differentielle Ansatz in Kombination mit der 16-BAC/SDS-2D-Gelelektrophorese für die Identifizierung neuer Interaktoren des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE ungeeignet war.

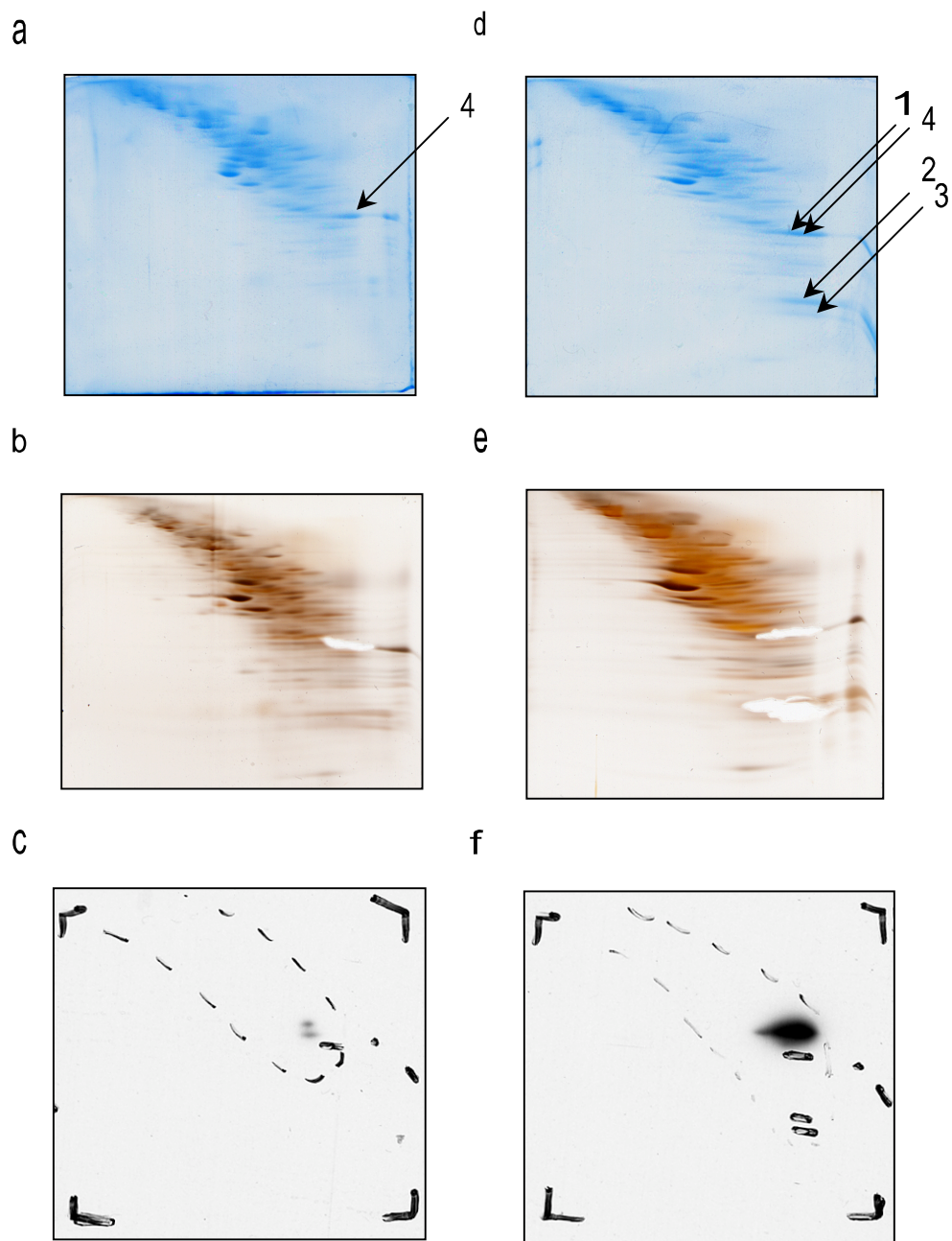


Abbildung 18: 16-BAC/SDS-2D-Mikrogele zur Identifizierung differentieller Banden bei der Proteinreinigung aus Wurzelkallus der T7-KNOLLE (W3-3) bzw. Myc-KNOLLE-His₆ (E3-302) exprimierte.

- a) CBB gefärbtes 2D-Gel. Ansatz mit Kallus W3-3.
- b) Silberfärbung des unter a) abgebildeten Gels nach Entfernung der Coomassie-Färbung.
- c) Western Blot Detektion nach Trennung derselben Probe wie in a) in einem Parallelgel mit dem gegen KNOLLE gerichteten Antiserum in einer Verdünnung von 1:80000.
- d) CBB gefärbtes 2D-Gel. Ansatz mit Kallus E3-302. Banden 1-3: Proteinbanden die im Parallelgel nicht zu sehen sind, das mit der Probe aus Kallus W3-3 beladen ist. Bande 4: Bande, die in beiden Ansätzen zu sehen ist.
- e) Silberfärbung des unter d) abgebildeten Gels nach Entfernung der Coomassie-Färbung.
- f) Western Blot Detektion nach Trennung derselben Probe wie in d) in einem Parallelgel mit dem gegen KNOLLE gerichteten Antiserum in einer Verdünnung von 1:80000.

In flüssigem Stickstoff zermörserte Wurzelkalli wurden für 30min in einem Tris/Borat-Puffer resuspendiert, der Casein zum Schutz vor Proteasen enthielt (siehe Abschnitt 2.3.3; 375mM Borsäure, 125mM Tris, 10% v/v Glycerin, 25mg/ml Casein, 10mM beta-Mercaptoethanol, pH7,6). Dem Abtrennen der Zelltrümmer durch Filtration (MIRACLOTH) folgten eine Zentrifugation bei 10000g (10min) und 100000g (1h40min). Anschließend erfolgte die Lyse der so gewonnen Mikrosomenfraktion für 1h (125mM Natriumphosphat, pH8,0, 10% v/v Glycerin, 46mM Octyl-beta-D-Glucoopyranosid, 10mM beta-Mercaptoethanol, 2mM Imidazol). Die nicht gelösten Bestandteile wurden abgetrennt (100000g, 1h). Je 1g Frischgewicht zu Beginn der Proteinreinigung wurden 40µl Ni-NTA-Agarose für die Bindung eingesetzt. Wasch- und Elutionspuffer entsprachen weitgehend dem Lysepuffer (50mM Natriumphosphatpuffer, pH8,0, 10% v/v Glycerin, 46mM Octyl-beta-D-Glucoopyranosid, 10mM beta-Mercaptoethanol, 2mM bzw. 100mM Imidazol).

2.3.3 Etablierung eines universellen Proteinaseschutzes

Bei der Aufreinigung von Proteinen stellen Proteinase immer wieder Probleme dar. Auch der Zusatz von Inhibitoren gegen bekannte Proteinase bietet nicht immer einen ausreichenden Schutz vor unerwünschter Degradation. Im Zuge der Optimierung der Probenvorbereitung vor der Verwendung verschiedener Affinitätsmatrices wurde ein einfacher, aber sehr effektiver Schutz vor Proteinase etabliert. Bei zahlreichen Proteinreinigungen konnte trotz Zusatz von Proteaseinhibitoren (Inhibitorcocktail von Sigma + PMSF) im Western Blot eine Abbaubande von KNOLLE mit einer teilweise ähnlichen Intensität wie das Vollängen-Protein detektiert werden. Als gängiges Substrat für den Nachweis der Aktivität zahlreicher Proteinase dient Casein. Es galt nun zu überprüfen, ob Casein in höherer Konzentration zugesetzt einen effektiven Schutz vor Proteinase darstellen konnte. Dabei wurde angenommen, dass das im Überschuß vorhandene Casein mit dem zu schützenden Protein um die Proteinase kompetitierte. Zusätzlich wurde untersucht, ob auch BSA diese Schutzrolle wahrnehmen konnte. Abbildung 19a zeigt die vergleichende Darstellung einer Proteinextraktion aus Wurzelkallus unter Verwendung verschiedener Puffer. Eindrucksvoll wurde der Schutz durch Casein in einer Konzentration von 25mg/ml sichtbar. Weder mit dem Inhibitorcocktail noch mit BSA konnte eine ähnliche Inhibierung der Degradation erreicht werden (Abbildung 19a). In den Ansätzen ohne Casein

wurden mit dem anti KNOLLE Antiserum deutlich schwächere Banden detektiert, was darauf schließen ließ, dass ein Teil des Proteins bereits vollständig abgebaut war.

Nachdem Epitop-markiertes KNOLLE bei Proteinextraktionen unter nativen Bedingungen durch den Zusatz von Casein effektiv vor dem unerwünschten Abbau geschützt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob Casein einen generellen Schutz vor Proteinase bietet. Hierzu wurden GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und unter Verwendung verschiedener Puffer extrahiert (Abbildung 19b und c). Die Lysepuffer enthielten entweder Casein, Inhibitorcocktail für Bakterien (Sigma) oder keinen zusätzlichen Proteinaseschutz. Ein ausreichender Schutz für GST-SNP33 konnte nur im Ansatz mit Casein erreicht werden. Sowohl im Ansatz ohne Proteinaseschutz als auch unter Verwendung des Inhibitorcocktails war nur ein Abbauprodukt nachzuweisen. Bei der Extraktion von GST-KNOLLE aus *E.coli* wurde ebenfalls der beste Schutzeffekt mit Casein erreicht. Auch für GST-KNOLLE brachte der Inhibitorcocktail keinen zusätzlichen Schutz. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Degradation über längere Zeit (mindestens zwei Stunden) erhalten bleibt (Abbildung 19b und c).

Der Zusatz von Casein (25mg/ml) in Puffer zur Extraktion von Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen bietet einen effektiven Schutz vor Proteinase. Die Schutzwirkung konnte sowohl bei Proteinextraktionen aus pflanzlichem Material (Wurzelkallus), als auch aus Bakterien (*E.coli*) nachgewiesen werden.

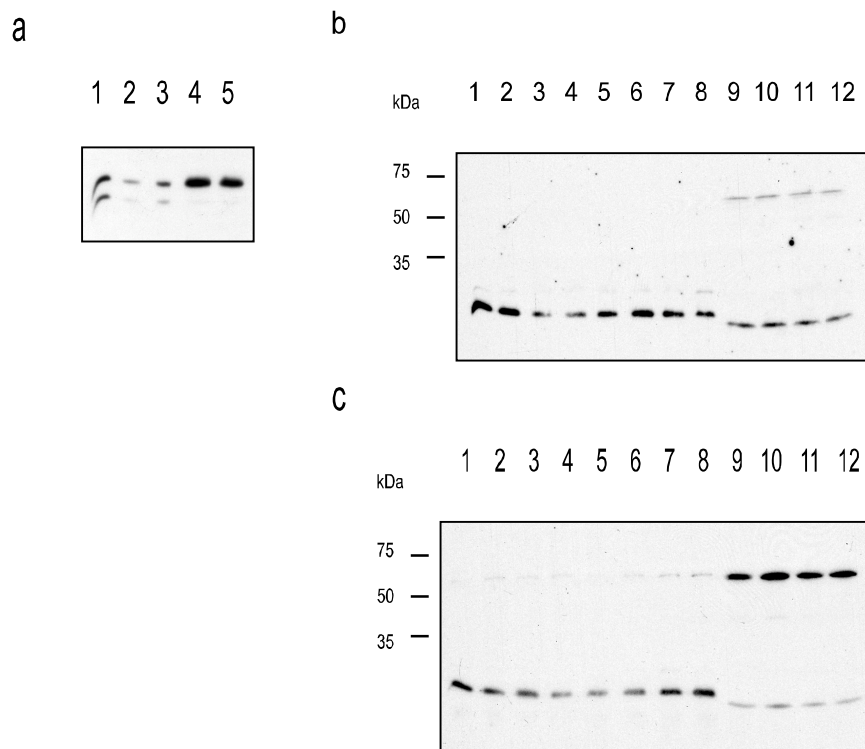


Abbildung 19: Etablierung eines universellen Proteinaschutzes.

a) Proteinextraktion aus Wurzelkalluskulturen E3-302 (exprimierte Myc-KNOLLE-His6). Detektion mit dem anti KNOLLE Antiserum. Spur 1: Puffer ohne Zusatz von Proteaseschutz, Spur 2 und 3: Zusatz von 25mg/ml BSA, Spur 4 und 5; Zusatz von 25mg/ml Casein. Obere Bande: Volllängen-Protein; untere Bande: Abbauprodukt

b) Extraktion von GST-SNP33 (Heese, 2001) aus *E. coli*. Um die Wirksamkeit des Proteaseschutzes zu demonstrieren, wurden Aliquots der Überstände bis zu 2h im Kühlraum gelagert (auf dem Rad). Spur 1-4 Ansatz ohne Zusatz, Spur 5-8 Ansatz mit Proteaseinhibitorcocktail, Spur 9-12: Ansatz mit 25mg/ml Casein. Spur 1/5/9: Überstand unmittelbar nach der Lyse, Spur 2/6/10: 30min Lagerung, Spur 3/7/11: 1h Lagerung, Spur 4/8/12: 2h Lagerung. Nur beim Ansatz mit Casein konnte das Volllängen-Protein (ca.60kDa) detektiert werden (anti GST-POD).

c) Extraktion von GST-KNOLLE (Heese, 2001) aus *E. coli*. Ansätze und Auftragung wie bei b). In Ansätzen ohne Zusatz bzw. bei Verwendung des Inhibitorcocktails konnte nur eine sehr schwache Bande des Volllängen-Proteins (ca.60kDa) detektiert werden, wohingegen im Ansatz mit Casein eine kräftige GST-KNOLLE-Bande zu erkennen war (anti GST-POD). Zudem war die Bande des Spaltprodukts (GST, ca. 30kDa) im Ansatz mit Casein deutlich schwächer als in den beiden anderen Ansätzen.

2.3.4 Die Interaktion von Myc-SNP33 mit KNOLLE

Der Nachweis einer spezifischen Interaktion von KNOLLE mit SNP33 sollte durch die gemeinsame Aufreinigung von KNOLLE und SNP33 erbracht werden.

2.3.4.1 Etablierung von *Myc-SNP33/T7-KNOLLE-His₆* exprimierenden Pflanzenlinien in doppelt mutantern Hintergrund

Das gegen SNP33 gerichtete Antiserum weist in Western Blot Analysen zahlreiche Kreuzreaktionen auf. Um SNP33 während der Aufreinigung von KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexen besser verfolgen zu können, wurde eine Myc-SNP33-Pflanzenlinie (Überexprimierer-Linie #136; Heese, 2001) mit einer T7-KNOLLE-His₆ Linie (J3-1; Völker, 2001) gekreuzt. Die gekreuzten Pflanzen enthielten ihr jeweiliges Transgen in homozygot mutantern Hintergrund. In den aus diesen Kreuzungen resultierenden, auf Selektionsmedium angezogenen Tochtergenerationen wurde mittels PCR und Western Blot Analyse (anti-Myc bzw. anti-KNOLLE Antiserum; nicht gezeigt) nach Pflanzen, die beide Transgene in doppelt homozygot mutantern Hintergrund exprimierten, gesucht. Mit der Primerkombination MH48sp2/GMS25-FW4 konnte zwischen wildtypischem *SNP33* und dem *MYC-SNP*-Transgen unterschieden werden (Abbildung 20a). Da die Unterscheidung zwischen dem endogenen *SNP33* und dem *MYC-SNP33* Transgen mit dieser Primerkombination nicht immer eindeutig möglich war, wurde zusätzliche eine PCR mit den Primern GMS25-FW4/NSSNPWT1 durchgeführt, welche nur bei Vorhandensein eines wildtypischen Allels ein Amplifikat lieferte (Abbildung 20b). Die Primerkombination take2/off diente zum Nachweis von wildtypischem bzw. *T7-KNOLLE-HIS* (Abbildung 20c). In der F3-Generation konnten 8 Pflanzen eindeutig nachgewiesen werden, die beide Transgene in doppelt homozygot mutantern Hintergrund enthielten (#1, #2, #3, #5, #10, #17, #18, #33; siehe Abbildung 20b und c).

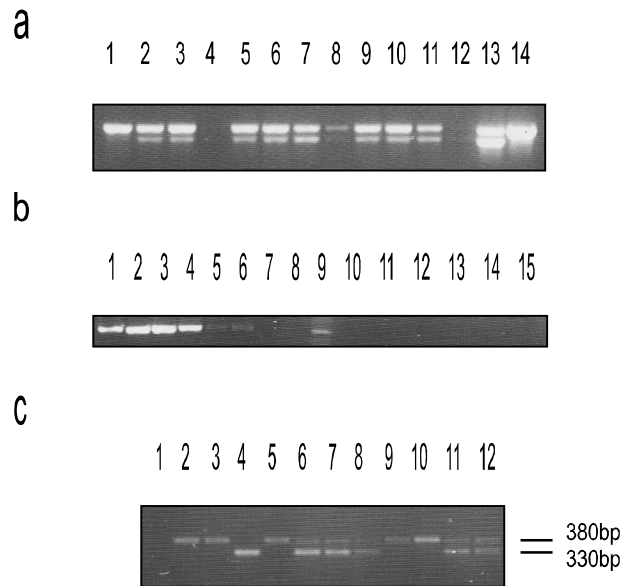


Abbildung 20: PCRs zur Analyse der F2- und F3-Generation.

Die Myc-SNP33-Linie, die T-DNA-Insertionslinien, sowie die PCRs mit den Primern MH48sp2/GMS25-FW4 GMS25-FW4/NSSNPWT1 sind bei Heese (2001), die T7-KNOLLE-His₆ Linie J3-1 bei Völker (2001) beschrieben.

a) PCR mit den Primern MH48sp2/GMS25-FW4. Erwartete Amplifikate 730bp (wildtypisches SNP33) und 785bp (Myc-SNP33). Spur 1-12: verschiedene F2-Pflanzen der Kreuzung zwischen der Myc-SNP33 Linie #136 und der T7-KNOLLE-His₆ Linie J3-1, Spur 13: heterozygote *snp33* T-DNA-Insertionslinie, Spur 14: homozygote *snp33* T-DNA-Insertionslinie die Myc-SNP33 exprimierte (Linie #136).

b) Untersuchung verschiedener F3-Pflanzen. PCR mit den Primern GMS25-FW4/NSSNPWT1. Die Lage der Primer war so gewählt, dass ein PCR-Produkt nur bei Vorhandensein des wildtypischen Allels entstand (ca. 500bp). Spur 1/2: F3-Pflanze #28, Spur 3/4: #32, Spur 5/6: #49, 7/8: #3, Spur 9: Marker, Spur 10/11: #5. Spur 12/13: #10, Spur 14/15: #17. Alle untersuchten F3-Pflanzen waren Nachkommen von den F2-Pflanzen #2, 3 oder 5.

c) PCR mit den Primern take2/off und denselben F2-Pflanzen (1-12) wie bei a) und anschließendem Verdau der PCR-Fragmente mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II. Erwartete Fragmente: ca. 1,2kb PCR-Produkt, nach Verdau ca. 800bp + 380bp (T7-KNOLLE) bzw. 330bp (endogenes KNOLLE). Aus den Pflanzen #2, 3, 5, 9, und 10 konnte nur das Amplifikat vom KNOLLE-Transgen (obere Bande) nachgewiesen werden.

2.3.4.2 Etablierung von Wurzelkallusgewebekulturen und Expressionskontrolle

Für die Aufreinigung von KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexen diente Wurzelkallus als Ausgangsmaterial (siehe Abschnitt 2.3.1). Im Gegensatz zu Tabak (Nagata et al., 1992) ist es leider bis heute nicht möglich, *Arabidopsis* Zellkulturen zu synchronisieren, so dass die Kulturen zum Zeitpunkt des Aberntens einen Querschnitt aller Stadien des Zellzyklus darstellten. Die Cytokinese bei *Arabidopsis* Zellen dauert nur 20-30 Minuten. Dagegen verdoppelten die Kulturen ihre Zellmasse innerhalb einer Woche. Dies

verdeutlicht, dass auch in den Wurzelkalluskulturen der überwiegende Anteil aus Zellen bestand, die zum Zeitpunkt des Aberntens kein KNOLLE exprimierten. Hinzu kam, dass das Wachstum der Zellkulturen sehr empfindlich auf Schwankungen der äußeren Bedingungen, wie z.B. der Temperatur, reagierten. Dies wirkte sich wiederum stark auf die Expressionsstärke von KNOLLE aus. Daher wurden alle abgeernteten Kalli zunächst mittels Western Blot auf die Expression von KNOLLE untersucht (Abbildung 21). Dabei war es möglich, verschiedene Epitop-markierte KNOLLE-Varianten anhand ihrer unterschiedlichen molekularen Masse voneinander zu unterscheiden.

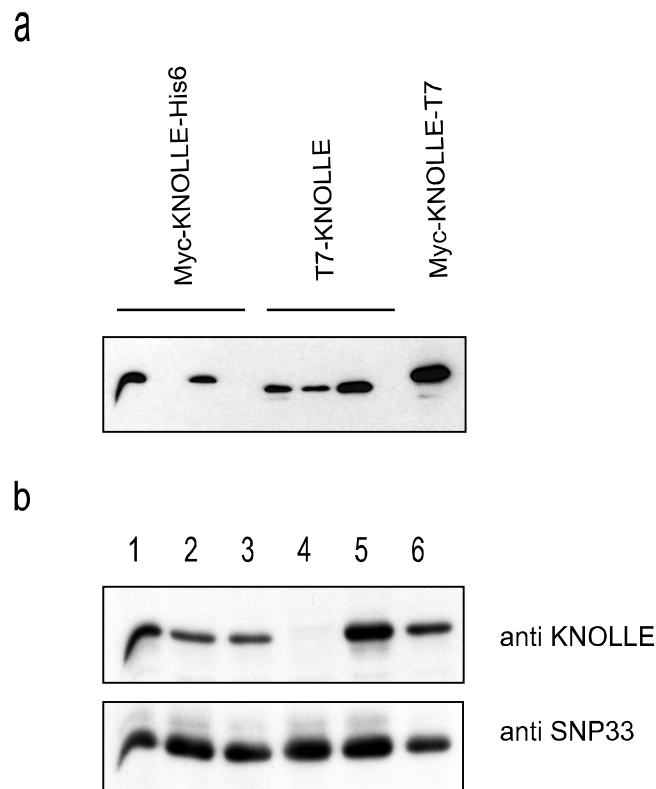


Abbildung 21: Kontrolle der Expression von T7-KNOLLE-His₆ und Myc-SNP33 in den abgeernteten Wurzelkalluskulturen mittels Western Blot Analyse.

a) Detektion mit dem anti KNOLLE Antiserum. Unterschiedliche Epitop-markierte KNOLLE-Varianten in den verschiedenen Kalluskulturen konnten anhand ihres apparenten Molekulargewichts unterschieden werden. Nicht alle abgeernteten Kulturen exprimierten KNOLLE zum Erntezeitpunkt.

b) Detektion mit dem anti KNOLLE Antiserum bzw. dem anti Myc-POD Antikörper. Die konstitutive Expression von SNP33 im Gegensatz zur zellzykluspezifischen Expression von KNOLLE wurde deutlich. Spur 1-6: Unterschiedliche Ernten einer Wurzelkalluskultur, angelegt aus Keimlingen der Kreuzungslinie #2 (F3-Generation).

Nicht in allen untersuchten Kulturen war zum Erntezeitpunkt KNOLLE exprimiert. Die Analyse verschiedener „Ernten“ einer Kalluskultur, welche das *Myc-SNP33*- und *T7-KNOLLE-HIS*-Transgen enthielten, zeigte deutlich die konstitutive Expression von *Myc-SNP33*. Im Gegensatz dazu wurde KNOLLE nur in sich gerade teilenden Zellen exprimiert (z.B. nicht in Spur 4 der Abbildung 21). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Heese et al. (2001), die *Myc-SNP33* neben der Zellplatte auch an der Plasmamembran nachweisen konnten. Auch die Arbeiten von Kargul et al. (2001) deuten auf eine weitere Funktion von *SNP33* außerhalb der Cytokinese hin.

2.3.4.3 Nachweis der Interaktion von KNOLLE mit *Myc-SNP33*

Der Kreuzungskallus #2 exprimierte *T7-KNOLLE-His₆* und *Myc-SNP33* (siehe Abschnitt 2.4.1 und 2.4.2). Durch Bindung von *T7-KNOLLE-His₆* an eine Ni-NTA-Affinitätsmatrix sollte überprüft werden, ob *Myc-SNP33* im Gegensatz zu anderen, im Lysat der Mikrosomenfraktion enthaltenen Proteinen spezifisch mit angereichert werden konnte. Abbildung 22 zeigt die Western Blot Analyse dieser Proteinreinigung. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl KNOLLE (über das T7-Epitop detektiert) als auch *Myc-SNP33* (über das *Myc*-Epitop detektiert) mit Hilfe der Ni-NTA-Säule aufkonzentriert werden konnten. Dagegen waren das Syntaxin *AtPep12* sowie das, als GEF der GTPase *Sar1* wirksame, *AtSec12* nahezu vollständig im Durchlauf der Ni-NTA-Säule enthalten. Dies zeigt, dass die Anreicherung von *Myc-SNP33* spezifisch über eine Wechselwirkung mit KNOLLE erfolgte, da nicht alle Proteine durch den Einsatz der Ni-NTA-Säule aufkonzentriert wurden.

Somit konnte erstmals eine direkte Interaktion des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE mit dem konstitutiv exprimierten SNAP25-homologen Protein *SNP33* in *Arabidopsis*-Zellen nachgewiesen werden.

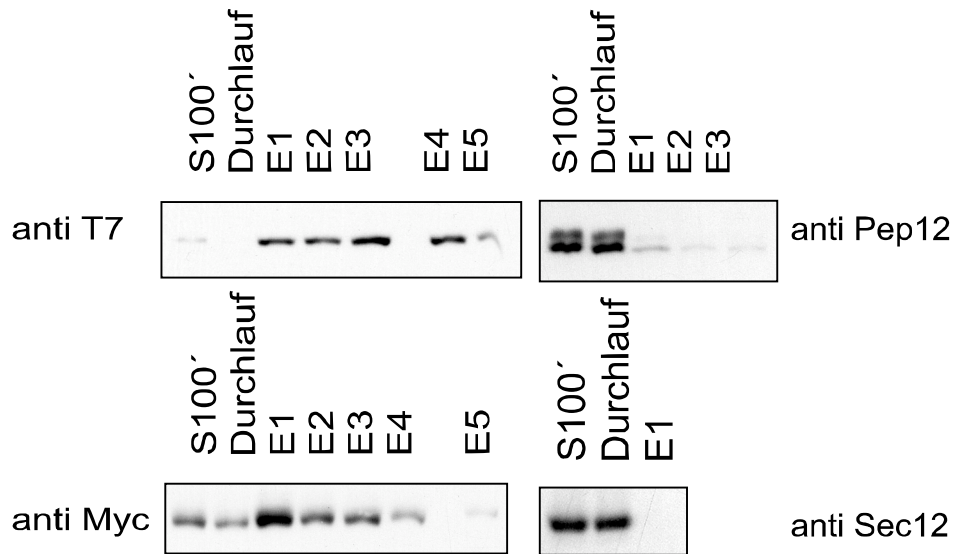


Abbildung 22: Spezifische Anreicherung von KNOLLE und Myc-SNP33 durch eine Ni-NTA-Affinitätssäule.

Die Gewinnung der Mikrosomenfraktion und deren Lyse erfolgte wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Als Ausgangsmaterial diente Kreuzungskallus #2, der T7-KNOLLE-His₆ und Myc-SNP33 exprimierte. Der gelöste Teil (S100') wurde für die Bindung an die Ni-NTA-Affinitätsmatrix eingesetzt. Die Detektion von KNOLLE erfolgte mit anti T7, die von SNP33 mit anti Myc Antiserum. Zur Kontrolle der Ni-NTA-Spezifität diente die Detektion mit anti Pep12 und anti Sec12 Antiserum.

Um den Nachweis dieser spezifischen Interaktion weiter zu erhärten, wurden die Proteine, die in den Elutionsfraktionen einer Ni-NTA-Säule enthalten waren, an eine anti Myc-Affinitätssäule gebunden. Als Ausgangsmaterial für diese erweiterte Proteinreinigung dienten zwei unterschiedliche Kalluskulturen. Die erste Kultur exprimierte ein doppelt Epitop-markiertes KNOLLE Protein (E3-302: Myc-KNOLLE-His₆), bei der zweiten handelte es sich um den Kreuzungskallus #2, welcher T7-KNOLLE-His₆ und zusätzlich Myc-SNP33 exprimierte. Sowohl im Ansatz mit Kallus E3-302 als auch mit dem Kreuzungskallus #2 konnte KNOLLE mit der Ni-NTA-Säule angereichert werden. Für SNP33 konnte dies dagegen nur bei Verwendung des Kreuzungskallus gezeigt werden (Abbildung 23a). Dieser exprimierte Myc-SNP33 deutlich stärker als der Kallus E3-302 das endogene SNP33. Aus Kallus E3-302 konnte nur ein geringer Teil des enthaltenen SNP33 gemeinsam mit KNOLLE gebunden werden.

Im Ansatz mit Kallus E3-302 Myc-KNOLLE-His₆ konnte das Epitop markierte KNOLLE aus den Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule direkt an die anti Myc-Agarose gebunden werden. In Elutionsfraktion 1 wurde jedoch nur eine relativ

schwache KNOLLE-Bande detektiert (Abbildung 23b). Dagegen war für T7-KNOLLE-His₆ eine Bindung an die Affinitätssäule nur durch die Interaktion mit Myc-SNP33 möglich. Eine KNOLLE-Bande konnte in den Elutionsfraktionen dieses Ansatzes jedoch nicht detektiert werden (Abbildung 23c). Die Inkubation der Affinitätsmatrices beider Ansätze im Ladepuffer für die SDS-PAGE offenbarte die feste Bindung von KNOLLE und SNP33 an die Affinitätssäulen. Eine vollständige Elution dieser spezifisch gebundenen Proteine war erst durch Erhitzen des Säulenmaterials (Beads) in einem Säulenvolumen Ladepuffer möglich.

Durch die Kombination zweier Affinitätssäulen (Ni-NTA und anti Myc-Agarose) konnte gezeigt werden, dass KNOLLE und SNP33 eng assoziiert vorliegen. Diese Interaktion wurde auch durch die Behandlung mit einem Zitronensäurehaltigen Puffer (pH 2,2 = Elutionspuffer der anti Myc-Affinitätssäule) nicht zerstört. Auffallend war der starke Einfluss der SNP33-Expressionsstärke auf die Konzentration an KNOLLE/SNP33-Proteinkomplex. Während im Ansatz mit endogenem SNP33 (Kallus W3-3) nur ein geringer Anteil mit KNOLLE assoziiert vorlag, konnte durch Überexpression von Myc-SNP33 der Anteil an KNOLLE-komplexiertem SNP33 deutlich erhöht werden.

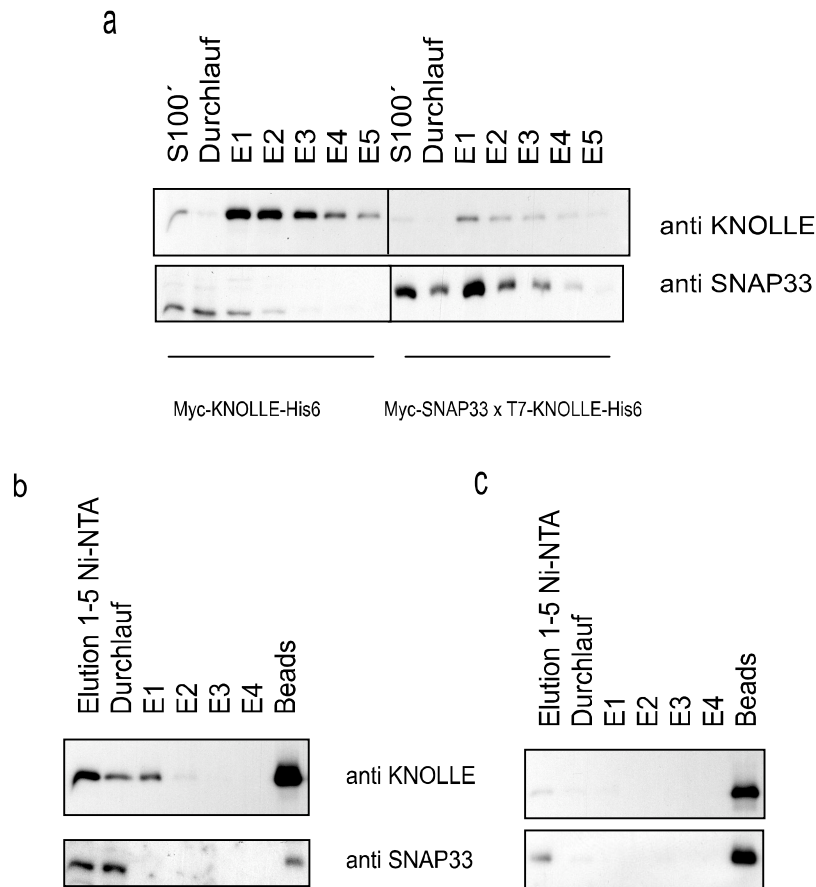


Abbildung 23: Kombination zweier Affinitätssäulen zur Verifizierung der KNOLLE/SNAP33-Interaktion.

a) Nachweis der Aufreinigung von KNOLLE und SNAP33 über die Ni-NTA-Säule. Der mit Octyl-beta-D-Glucopyranosid solubilisierte Anteil der Mikrosomenfraktion (S100') wurde für die Bindung an Ni-NTA eingesetzt. Bindung, Waschschrirte und Elution erfolgten wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

b) Bindung an die und Elution von der anti Myc-Säule; Ansatz mit Kallus E3-302.

c) Bindung an die und Elution von der anti Myc-Säule; Ansatz mit Kreuzungskallus #2.

Die vereinigten Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule wurden über Nacht an die anti Myc Agarose gebunden. Den 3 Waschschrirten mit Phosphatpuffer (5,75mM Phosphatpuffer, pH 7,3, 2,7mM Kaliumchlorid, 137mM Natriumchlorid, 46 mM Octyl-beta-D-Glucopyranosid, 10mM beta-Mercaptoetanol) folgte die Elution mit 5 mal einem Säulenvolumen Zitronensäure (100mM, pH 2,2) und eine Neutralisation mit Tris (2M, pH 10,4). Schließlich wurde die Affinitätsmatrices in einem Säulenvolumen Ladepuffer für die SDS-PAGE erhitzt.

2.3.4.4 *Thermisch stabiler Proteinkomplex*

Der aus Syntaxin1A, SNAP25 und dem Synaptobrevin bestehende synaptische SNARE-Komplex besitzt eine ausserordentliche thermische Stabilität (Fasshauer et al., 1999; Yang et al., 1999). Zudem ist der Komplex resistent gegenüber dem Detergenz SDS (Sutton et al., 1998). Dies kann mit der „Leucin-Zipper-ähnlichen coiled coil“-Interaktion der SNARE-Domänen erklärt werden, die im SNARE-Komplex wie die Stränge einer Kordel umeinander geschlungen sind. Daher sollte die Stabilität der KNOLLE-enthaltenden Proteinkomplexe durch Inkubation mit bzw. ohne Zusatz des Ladepuffers für die SDS-PAGE bei unterschiedlichen Temperaturen überprüft werden. Als Probe diente die Elutionsfraktion einer Ni-NTA-Säule. In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass auch KNOLLE, zumindest teilweise in einem sehr stabilen, hochmolekularen Komplex vorliegt (Abbildung 24). Mit dem gegen KNOLLE gerichteten Antiserum wurden neben der Bande des Monomers (ca. 35kDa) zwei weitere Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 140 bzw. 180kDa detektiert. Ohne Zusatz des SDS-haltigen Ladepuffers überstand der Komplex eine Inkubation bei 50°C (5min) weitgehend unbeschadet. Dagegen führte der Zusatz des Ladepuffers zu einem nahezu vollständigen Verlust der Komplexbande.

Für das in Abbildung 24 dargestellte Experiment diente der Myc-SNP33-überexprimierende Kreuzungskallus #2 als Ausgangsmaterial. Der Nachweis der KNOLLE/SNP33-Interaktion wurde bereits in Abschnitt 2.3.4.3 beschrieben. Allerdings konnte Myc-SNP33 nicht als Bestandteil dieses thermisch stabilen Komplexes, sondern lediglich das monomere Myc-SNP33 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei Verwendung anderer Kalluskulturen, die SNP33 nicht überexprimierten, konnte nur eine sehr geringe Konzentration des thermisch stabilen Komplexes nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das cytokinesespezifische Syntaxin KNOLLE konnte somit in einem (bzw. zwei) thermisch relativ stabilen Proteinkomplex nachgewiesen werden, der eine Behandlung mit dem Detergenz SDS jedoch nicht unbeschadet

überstand. SNP33 war selbst nicht Teil dieses Komplexes, seine Expressionsstärke hatte jedoch einen Einfluss auf die Konzentration des thermisch stabilen KNOLLE-enthaltenden Proteinkomplexes.

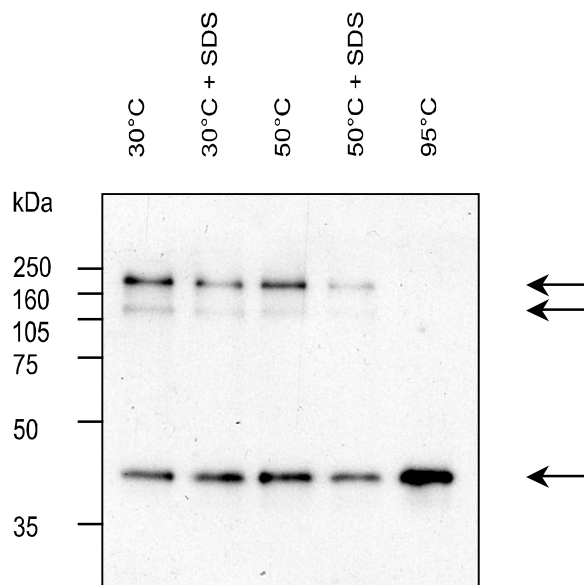


Abbildung 24: Nachweis eines thermisch stabilen KNOLLE-Komplexes.

Die Proteinreinigung aus dem Kreuzungskallus #2 erfolgte wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Aliquots der vereinigten Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule wurden direkt bzw. nach Zusatz von Ladebuffer für die SDS-PAGE für 5min bei 30, 50 bzw. 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden alle Ansätze, die noch keinen Ladebuffer enthalten, mit diesem versetzt und sofort auf das Gel aufgetragen. Durch die Pfeile sind die beiden KNOLLE-enthaltenden Proteinkomplexe mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 180 und 140kDa, sowie die Minomerbande mit ca. 40 kDa gekennzeichnet.

3 Diskussion

3.1 Das putative Synaptobrevin Syb4

3.1.1 Analyse der Expression von Syb4 und Myc-Syb4

Nachdem das Synaptobrevin Syb4 durch *in vitro* Interaktionsstudien als putativer Interaktor des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE identifiziert worden war (Pacher, 1999), galt es nun diese ersten Hinweise durch weitere Experimente zu verifizieren. In den Western Blot Analysen zur gewebespezifischen Expression zeigte sich, dass Syb4 in sich teilenden Geweben verstärkt nachgewiesen werden kann. Allerdings werden von dem gegen das Syb4-Teilfragment (AS38-AS131) gerichteten Antiserum zahlreiche weitere Proteine erkannt, so dass es zur Immunlokalisation von Syb4 nicht ohne Vorbehalte verwendet werden kann. Daher wurde ein Myc-Epitop markiertes *SYB4* kloniert und in Pflanzen exprimiert, was die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Antiserums ermöglichte. Die Funktionalität des rekombinanten Proteins konnte durch „Rettung“ *syb4* homozygoter Pflanzen nachgewiesen werden. Wie die genetische Analyse der transgenen Pflanzen gezeigt hat, kann der Ausfall des endogenen Syb4 und somit der gametophytisch letale Phänotyp kompensiert werden. Es wurden mehrere Pflanzenlinien etabliert, welche das Myc-Epitop markierte Transgen in homozygot mutantern Hintergrund tragen. Durch die Analyse der Proteinexpression in Blüten und jungen Schoten mittels Western Blot konnte zudem gezeigt werden, dass die Expressionsstärke von Myc-Syb4 in den unterschiedlichen Pflanzenlinien stark variiert. Dies könnte auf die Insertion des Transgens in unterschiedlichen Regionen im Genom zurückzuführen sein. So könnte die Transgen-Insertion in einer stark transkribierten Region zu einer verstärkten, eine Insertion in einer wenig transkribierten Region dagegen zu einer verminderten Expression führen. Mehrfachinsertionen können aufgrund der geringen Transformationsrate ausgeschlossen werden.

3.1.2 Vergleich der Immunlokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE

Für die indirekte Immunlokalisation von Myc-Syb4 wurde die Pflanzenlinie HH1 verwendet, welche das Transgen deutlich stärker exprimiert als eine wildtypische Pflanze das endogene Syb4. Dies konnte in Western Blot Analysen mit dem gegen das Syb4-Teilfragment gerichteten Antiserum gezeigt werden. Trotz Überexpression des Transgens besitzen die Pflanzen unter den Kulturbedingungen einen wildtypischen Phänotyp. Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation stand die Frage einer möglichen Colokalisation des putativen Synaptobrevins Syb4 mit dem cytokinespezifischen Syntaxin KNOLLE im Mittelpunkt. Es galt zu überprüfen, ob die durch *in vitro*-Studien gewonnenen Hinweise auf eine Interaktion der beiden Proteine gestärkt werden können. Während der Cytokinese kann Myc-Syb4 in der Teilungsebene detektiert werden. Eine genauere Betrachtung der Doppelfärbung mit KNOLLE legt jedoch nahe, dass es sich um eng benachbarte Signale und nicht um eine Colokalisation an der Zellplatte handelt. Mangels Auflösung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie kann diese Frage derzeit leider nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Eine eindeutige Klärung sollen die bereits begonnenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Wurzelspitzen *MYC-SYB4* transgener Keimlinge liefern (Zusammenarbeit mit York Stierhof).

Im Gegensatz zu KNOLLE scheint die Expression von Syb4 nicht zellzyklusabhängig reguliert zu sein. Bei den Untersuchungen der subzellulären Lokalisation konnte Myc-Syb4 in allen Zellen der Keimlingswurzel nachgewiesen werden. Neben der Kernhülle war vor allem in der Peripherie der Zellen ein Myc-Syb4 Signal zu erkennen. Diese Immunlokalisation von Myc-Syb4 deckt sich mit den bereits zuvor beobachteten, extrem schwachen Signalen mit dem gegen das Syb4-Teilfragment gerichteten Antiserum. Da die Färbungen mit diesem Antiserum nur andeutungsweise zu erkennen waren, konnte ihnen für eine sichere Aussage zur subzellulären Lokalisation von Syb4 zunächst nur wenig Gewicht zugerechnet werden. Erst die Bestätigung durch die Detektion des überexprimierten Myc-Syb4 erhärtete diese Beobachtungen. Zudem kann nun

ausgeschlossen werden, dass es durch die Überexpression zu einer teilweisen Fehllokalisierung des Transgens kommt.

Die konstitutive Expression von Syb4 wirft zahlreiche Fragen auf. In der Promotorregion des *SYB4* Gens sind zwei „MSA-Elemente“. In Zellkulturen aus Tabak (BY-2 Zellen) konnte gezeigt werden, dass diese eine G2/M-Phase-spezifische Expression vermitteln (Ito et al., 2001) und auch in *Arabidopsis* werden *KNOLLE* und *HINKEL*, deren Promotoren „MSA-Elemente“ enthalten, G2/M-Phase-spezifisch exprimiert (Strompen et al., 2002; Lukowitz et al., 1996). Welche Rolle die „MSA-Elemente“ für die Regulation der zellzyklusspezifischen Expression in *Arabidopsis* spielen, bleibt zu klären. Unter Umständen reichen diese allein in *Arabidopsis* nicht für eine zellzyklusspezifische Expression aus, sondern benötigen noch weitere flankierende Regionen. Eine genauere Analyse der Promotorregionen des zellzyklusspezifisch exprimierten Syntaxins *KNOLLE* sowie von Syb4 könnte näheren Aufschluss darüber geben.

3.1.3 Detaillierte Beschreibung der subzellulären Lokalisation von Myc-Syb4

Weiterführende Analysen der subzellulären Lokalisation von Myc-Syb4 in der Linie HH1 konnten zeigen, dass die periphere Färbung der Zellen mit dem anti Myc Antikörper nicht auf eine Lokalisation von Syb4 in der Plasmamembran zurückzuführen ist. Die Doppelmarkierung mit dem PM-ständigen, putativen Auxin-Transporter PIN1 (Geldner et al., 2001) erlaubt eine klare Abgrenzung der beiden Signale. PIN1 ist stets zwischen der peripheren Myc-Syb-Markierung zu sehen, welche zudem deutlich diffuser erscheint.

Schließlich konnte durch die Doppelmarkierung mit einem Antiserum gegen das ER-residente SEC12 (Bar-Peled and Raikhel, 1997) eine klare Colokalisation beider Proteine in allen markierten subzellulären Kompartimenten nachgewiesen werden. Die indirekte Immunlokalisation von Myc-Syb4 zeigt eine deutliche Markierung des ER, wie dies z.B. auch für ER-lokalisiertes GFP (GFP-HDEL) oder die leichte t-SNARE-Kette Sit1 beschrieben wurde (Nebenführ et al., 2000, Burri et al., 2003). Neben der

Kernhülle wird in der Interphase das kortikale ER markiert. Während der Cytokinese können die ER-residenten Proteine im Phragmosom und später in der Teilungsebene nachgewiesen werden.

Dem gegenüber unterscheiden sich die Lokalisationen von gamma-COP (Sec21, *cis*-Golgi; Ritzenthaler et al., 2002; Stenbeck et al., 1992), TLG2a (TGN; Sanderfoot et al., 2001; Abeliovich et al., 1998) und Pep12 (PVC; Sanderfoot et al., 1998) deutlich von der Syb4-Verteilung.

Nachdem Myc-Syb4 eindeutig im ER nachgewiesen werden konnte, muss die in den Western Blot Analysen beobachtete verstärkte Expression von Syb4 in sich teilenden Geweben neu bewertet werden. In stark teilungsaktiven Zellen besteht ein hoher Bedarf an Lipiden und Membranproteinen. Deren Synthese findet zu einem wesentlichen Teil im ER statt. Die verstärkte Expression von Genen, welche für ER-residente Proteine codieren, ist hierfür essentiell. Demnach könnte eine erhöhte Syb4-Konzentration in teilungsaktiven Geweben auf eine Zunahme der ER-Strukturen und nicht auf eine cytokinespezifische Expression wie bei KNOLLE zurückzuführen sein.

3.1.4 Subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4 nach Inhibierung der Sekretion

Durch Inkubation mit BFA wurde die Abschnürung sekretorischer Vesikel inhibiert. Die erfolgreiche Blockierung des sekretorischen Systems konnte anhand der drastisch veränderten Immunlokalisation von KNOLLE und PIN1 überprüft werden. Beide Proteine akkumulieren nach BFA-Behandlung in „BFA-Kompartimenten“, einer Ansammlung vesikulärer Strukturen (Geldner et al., 2003). Dem gegenüber ändert sich die subzelluläre Verteilung von Myc-Syb4 genauso wenig wie die des ER-ständigen SEC12-Proteins. Die Inhibierung der Vesikelabschnürung an den Golgi-Apparaten und Endosomen scheint im Gegensatz zu Tabak (Ritzenthaler et al., 2002) in *Arabidopsis* keinen Einfluss auf die Erhaltung der ER-Strukturen zu haben. In Zellen, in welchen ein starkes KNOLLE-Signal in den „BFA-Kompartimenten“ nachgewiesen werden konnte, war Myc-Syb4 stets in der Teilungsebene und nicht in den „BFA-Kompartimenten“ zu detektieren. Auch nach BFA-Behandlung kann keine Colokalisation von Myc-Syb4 und KNOLLE

nachgewiesen werden. Die unveränderte subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4 nach Inhibierung der Sekretion bestätigt die ER-Lokalisation des Proteins. Zudem stützt es die Annahme, dass es sich bei den Strukturen in der Teilungsebene, in denen Myc-Syb4 nachgewiesen werden konnte, um bereits angelegtes, kortikales ER und nicht um die Zellplatte handelt.

3.1.5 Syb4, ein Interaktor von KNOLLE?

Die subzelluläre Lokalisation von Myc-Syb4 im ER spricht gegen eine Interaktion des putativen Synaptobrevins Syb4 mit KNOLLE. Auch die Insensitivität gegenüber der Inhibierung der Sekretion und der Vesikelabschnürung von endosomalen Kompartimenten lassen eine direkte Wechselwirkung der beiden Proteine als unwahrscheinlich erscheinen. Zudem wird Myc-Syb4 konstitutiv exprimiert und kann in allen Zellen der Keimlingswurzel nachgewiesen werden. Die Funktion des KNOLLE-Interaktors SNP33 beschränkt sich allerdings auch nicht ausschließlich auf die Cytokinese. SNP33 kann sowohl an der Zellplatte als auch an der PM nachgewiesen werden (Heese et al., 2001). Unter Umständen ist für die Cytokinespezifität eines SNARE-Komplexes die strikte zellzyklusspezifische Regulation eines SNARE-Proteins, des Syntaxins KNOLLE, ausreichend, wohingegen die weiteren beteiligten Komponenten aus konstitutiv in der Zelle vorhandenen SNAREs rekrutiert werden könnten (Bednarek and Falbel, 2002).

Neben Syb4 gibt es zahlreiche weitere Kandidaten für eine Interaktion mit KNOLLE. Das Genom von *Arabidopsis* enthält zwölf offene Leseraster, die eine Homologie zu den v-SNAREs aus tierischen Organismen und Hefe aufweisen. Zusätzlich gibt es drei als „novel plant-specific SNAREs“ (NPSN10, 11 und 12) bezeichnete SNAREs, für die keine homologen Proteine in tierischen Organismen und Hefe bekannt sind (Sanderfoot et al., 2000). NPSN11 lokalisiert in protoplastierten *Arabidopsis* Zellen während der Cytokinese in die Teilungsebene. Zudem lieferten Immunpräzipitationsexperimente erste Hinweise auf eine direkte Interaktion von KNOLLE und NPSN11 (Zheng et al., 2002). Ob NPSN11 tatsächlich eine Komponente des

cytokinetischen SNARE-Komplexes, ist sollte jedoch durch weitere Experimente verifiziert werden, vor allem da die Lokalisation in protoplastierten Zellen in die Teilungsebene mittels indirekter Immunmarkierung noch kein sicherer Beleg für eine Lokalisation an die Zellplatte ist. Wie mehrfach gezeigt werden konnte (Nebenführ et al., 2000; Hepler, 1982), befinden sich hier unter anderem auch ER-Strukturen. Zudem konnte auch eine Lokalisation des Golgi-residenten, Sed5-homologen SYP31 in die Teilungsebene protoplastierter Zellen nachgewiesen werden (Rancour et al., 2002).

Gegen eine Interaktion von Syb4 mit KNOLLE spricht auch die Tatsache, dass in keinem Membrankompartiment eine Colokalisation von Myc-Syb4 mit KNOLLE nachgewiesen werden konnte. Ob eine derartige Colokalisation des Syntaxins KNOLLE und des mit ihm interagierenden Synaptobrevins zwingend postuliert werden kann, ist allerdings unklar. Das von Söllner et al. (1993a, b) postulierte SNARE-Modell sagt eine bestimmte Verteilung der SNARE-Proteine auf den beiden zu fusionierenden Membranen voraus, welche mittlerweile durch zahlreiche Experimente weitgehend bestätigt werden konnte (Yersin et al., 2003; Parlati et al., 2000; McNew et al., 2000). Demnach sind die t-SNAREs (Syntaxine und SNAP25-homologe Proteine bzw. leichte t-SNARE-Ketten) auf der Zielmembran und das v-SNARE (Synaptobrevin = VAMP) auf der Vesikelmembran. Bei einer derartigen Verteilung der SNARE-Proteine auf die beiden unterschiedlichen Membranen vor ihrer Fusion ist zunächst keine Colokalisation der t- und v-SNAREs zu erwarten. Erst nach erfolgter Fusion befinden sich alle SNAREs in derselben Membran. Für die Lokalisation von KNOLLE und seinen SNARE-Interaktoren bedeutet dies, dass das t-SNARE SNP33 zwar sehr wohl mit KNOLLE colokalisiert werden kann, während dies jedoch nicht zwangsläufig für das v-SNARE (Synaptobrevin) zutreffen muss. Ob das Synaptobrevin an der Zielmembran (der Zellplatte) nachgewiesen werden kann, hängt von der lokalen Konzentration und seiner Verweildauer nach Erfüllen seiner Funktion ab. Dies trifft auch auf die Membran zu, von der sich die Vesikel abschnüren (Golgi-Apparate und endosomale Kompartimente?). Sollte das Synaptobrevin rasch wieder von der Zellplatte entfernt werden, könnte sich eine Colokalisation mit KNOLLE als schwierig erweisen. Syb4 kann eindeutig

weder in der Zellplatte noch am Golgi oder endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden, wie durch die Doppelfärbung mit KNOLLE, PIN1 und den Golgi-residenten Proteinen gamma-COP und TLG2a gezeigt werden konnte.

Insgesamt widersprechen die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen zu Myc-Syb4 den Hinweisen, die in den *in vitro*-Interaktionsstudien mit rekombinanten Proteinen gewonnen wurden (Pacher, 1999). Dies verdeutlicht, dass *in vitro* Ansätze alleine nur bedingt aussagekräftig sind. Vielmehr müssen die gewonnenen Erkenntnisse stets durch unabhängige Experimente kritisch überprüft werden.

3.1.6 Ausblick auf Experimente zur Klärung der Funktion von Syb4

Welche Rolle Syb4 im ER wahrnimmt muss durch weitere Experimente geklärt werden. Die höchste Homologie besitzt die Aminosäure-Sequenz von Syb4 zu Sec22p aus Hefe. Sec22p konnte wie Syb4 am ER nachgewiesen werden und ist am Transport vom ER zum Golgi beteiligt (Liu and Barlowe, 2002). Im Gegensatz zu Syb4 ist die Deletion von Sec22p in Hefe nicht letal. Ob Syb4 tatsächlich das Sec22p-homologe Protein in *Arabidopsis* darstellt, ist unklar, zumal das Genom von *Arabidopsis* ein weiteres Gen (AB025603.1) mit einer noch höheren Ähnlichkeit zu SEC22 aus Hefe enthält. Es wird interessant sein zu sehen, ob der Ausfall dieses Genprodukts letal ist und wie die subzelluläre Lokalisation im Vergleich zu Syb4 aussieht. Eine essentielle Funktion von Syb4 beim Transport vom ER zum Golgi würde den gametophytisch- und insbesondere den starken Pollen-letalen Phänotyp erklären. Während des Pollenschlauchwachstums werden große Mengen an Membranmaterial benötigt, was zu einer verstärkten sekretorischen Leistung führt (Picton et al., 1981). Unter Umständen sind die mutanten Pollen bei der Befruchtung im Nachteil, da wildtypische Pollenschläuche deutlich schneller wachsen können und somit die Eizellen früher erreichen, wie dies z.B. auch bei der Expression von dominant-negativem NtRab2 in Pollen der Fall ist (Cheung et al., 2002). Erste Hinweise auf die Funktion von Syb4 könnten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *MYC-SYB4* Keimlingswurzeln

sowie an Myc-Syb4-exprimierenden und *syb4* mutanten Pollenschläuchen liefern. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf etwaige Veränderungen von ER- und Golgi-Strukturen in den mutanten Pollenschläuchen liegen. Neben der elektronenmikroskopischen Untersuchung von *MYC-SYB4* Keimlingswurzeln können mit Hilfe der etablierten *MYC-SYB4* Pflanzenlinien Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt werden, die dazu dienen sollen, Interaktoren von Syb4 zu identifizieren und eine klare Aussage bezüglich der oder des mit Syb4 interagierenden Syntaxins machen zu können. Für die indirekten Immunlokalisierungen wurden bereits Antiseren gegen das PVC-lokalisierte Syntaxin PEP12, das TGN-lokalisierte Syntaxin TLG2a sowie KNOLLE verwendet. Ein weiterer Kandidat für die Interaktion mit Syb4 stellt das in protoplastierten *Arabidopsis* Zellkulturen ebenfalls in der Teilungsebene lokalisierende Syntaxin SYP31 dar (Rancour et al., 2002). In Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung nicht teilen, kann SYP31 in nicht näher charakterisierten subzellulären Kompartimenten nachgewiesen werden. SYP31 ist das homologe Protein zu Syntaxin5 in Säugern bzw. zu Sed5p in Hefe, welche am Transport vom ER zum Golgi beteiligt sind und am Golgi lokalisiert werden können. Sed5p bildet gemeinsam mit Bos1p, Bet1p und Sec22p einen SNARE-Komplex (Parlati et al., 2002, Liu and Barlowe, 2002), welcher für die Fusion der vom ER ankommenden Vesikel mit den Golgi-Apparaten verantwortlich ist. Des Weiteren könnte eine Expression der *SYB4* cDNA im konditional letalen *sec22/ykt6* doppelt mutanten Hefestamm (Liu and Barlowe, 2002) weitere Erkenntnisse zur Beteiligung von Syb4 am sekretorischen System liefern.

3.2 Die Wechselwirkung von KNOLLE mit KEULE

3.2.1 Expression von Myc-KEULE

Wie andere Sec1/Munc18-Proteine besitzt KEULE keine Membranverankerung. Trotzdem konnte nachgewiesen werden, dass Sec1/Munc18-Proteine teilweise membranassoziiert vorliegen (Bryant and James, 2003; Yamaguchi et al., 2002, Assaad et al., 2001). Diese Membranlokalisation ist auf die Interaktion mit Syntaxinen zurückzuführen. Um die subzelluläre Lokalisation von KEULE untersuchen zu können, wurden Myc-KEULE-exprimierende Pflanzen etabliert. Dabei unterlag das Transgen der Kontrolle von *KNOLLE* cis-regulatorischen Elementen (Müller et al., 2003). Um die Funktionalität des Transgens zu überprüfen, wurden *keule* (Allel MM125) heterozygote Pflanzen transformiert. Der drastische cytokinetische Defekt der *keule* Embryonen sollte durch die cytokinespezifische Expression der *KEULE* cDNA behoben werden können. Ob das unter Kontrolle der *KNOLLE* cis-regulatorischen Elementen exprimierte Myc-KEULE Protein alle Aufgaben des endogenen KEULE wahrnehmen kann, hängt im Wesentlichen von der Stabilität des Proteins ab. Im Gegensatz zu *knolle* Keimlingen besitzen *keule* Keimlinge keine normalen Wurzelhaare, was nahe legt, dass KEULE neben der Interaktion mit KNOLLE während der Cytokinese noch weitere Funktionen wahrnimmt. Die Expression von Myc-KEULE konnte in Western Blot Analysen von Blüten und jungen Schoten der T1-Generation nachgewiesen werden. Über die Funktionalität kann derzeit noch keine Aussage gemacht werden, da alle untersuchten T1-Pflanzen heterozygot für *keule* waren.

3.2.2 Expression von T7-KNOLLE-AxxA

Ein Beispiel für die detaillierte Beschreibung einer Sec1/Munc18-Protein/Syntaxin-Wechselwirkung ist die Interaktion von Sly1 mit Sed5 (Peng and Gallwitz, 2002; Bracher und Weissenhorn, 2002). Der KNOLLE-Interaktor KEULE besitzt Homologie zu Sly1, und der N-Terminus von KNOLLE erinnert an den von Sed5. Um zu überprüfen, ob zwischen KNOLLE und KEULE eine ähnliche Interaktion über eine N-terminale Erkennungssequenz im Syntaxin stattfindet wie für die Sly1/Sed5-Interaktion beschrieben (Yamaguchi et al., 2002), wurden im N-Terminus von KNOLLE Threonin (6) und Phenylalanin (9) jeweils durch Alanin ersetzt. Nach Transformation von *knolle* (X37-2) heterozygoten Pflanzen konnte in der T1-Generation die Expression des T7-Epitop markierten, mutierten KNOLLE (T7-KN-AxxA) nachgewiesen werden. Alle untersuchten Pflanzen waren entweder homotypisch wildtypisch oder heterozygot für X37-2. In den Western Blot Analysen von Blüten und jungen Schoten dieser Pflanzen war auffallend, dass die T7-KNOLLE-AxxA Bande deutlich schwächer war als die Bande des endogenen KNOLLE Proteins. Ob dies auf eine verminderte Proteinstabilität durch die Einführung der Punktmutationen zurückzuführen ist, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden. In der T1-Generation konnten keine homozygoten *knolle* Pflanzen identifiziert werden, die das T7-KNOLLE-AxxA-Transgen tragen. Dies lässt eine Aussage zur Funktionalität des Transgens nicht zu. Die Analyse der Embryonen der heterozygoten Pflanze und die Untersuchung der T2-Pflanzen wird zeigen, welchen Einfluss der veränderte N-Terminus von KNOLLE auf den Phänotyp von *knolle* (Allel X37-2) hat. Denkbar wäre zum Beispiel eine Abschwächung des Cytokinesedefekts. Ein möglicher dominant negativer Effekt von T7-KNOLLE-AxxA kann ausgeschlossen werden, da alle Pflanzen der T1-Generation einen wildtypischen Phänotyp besaßen.

3.2.3 Aussichten zur Untersuchung der KNOLLE/KEULE-Interaktion

Ziel der Expression von Myc-KEULE und T7-KNOLLE-AxxA in Pflanzen war die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Myc-KEULE und des Einflusses den der N-Terminus von KNOLLE auf diese hat. Leider konnten bislang noch keine Untersuchungen zur Lokalisation an Keimlingswurzeln durchgeführt werden, da die T1-Pflanzen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch am Abreifen waren. Zu erwarten wären eine weitgehend cytosolische Verteilung von Myc-KEULE und eine Membranassoziation durch die Interaktion mit einem oder mehreren Syntaxinen (in Analogie zu Sly1p; Yamaguchi et al, 2002). Durch die Wechselwirkung mit KNOLLE ist der Nachweis von KEULE an der Zellplatte oder in den KNOLLE-positiven Kompartimenten zu erwarten, welche bereits unmittelbar vor Beginn der Cytokinese auftreten.

Durch die Expression von Myc-KEULE in *knolle* Embryonen (Allel X37-2) wird es möglich sein zu untersuchen, ob bzw. wie sich die subzelluläre Verteilung von Myc-KEULE durch die Deletion seines Interaktors KNOLLE verändert. Zudem könnte durch Kreuzung Myc-KEULE/X37-2 heterozygoter Pflanzen mit T7-KNOLLE-AxxA/X37-2 heterozygoten Pflanzen die Auswirkung der Punktmutationen in KNOLLE auf die subzelluläre Lokalisation von Myc-KEULE untersucht werden. Des Weiteren könnte durch Immunpräzipitationen mit anti Myc-Affinitätssäulen untersucht werden, ob Myc-KEULE mit T7-KNOLLE-AxxA interagieren kann.

Auch wird interessant sein zu sehen, ob sich die subzelluläre Verteilung von Myc-KEULE nach Inhibierung der Vesikelabschnürung an den Golgi-Apparaten und endosomalen Kompartimenten durch BFA verändert. Vor allem gilt es dabei zu klären, ob Myc-KEULE, wie KNOLLE, in den „BFA-Kompartimenten“ nachgewiesen werden kann.

3.3 Biochemische Charakterisierung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe

3.3.1 Anreicherung von Proteinkomplexen und die Suche nach neuen KNOLLE-Interaktoren

3.3.1.1 Nachweis von KNOLLE-enthaltenden Proteinkomplexen

In genetischen Ansätzen konnten bislang nur relativ wenige Proteine identifiziert werden, die an der Cytokinese in Pflanzen beteiligt sind (Söllner et al., 2002; Nacry et al., 2000). Daher wurde der Ansatz einer Aufreinigung von KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexen aus *Arabidopsis* gewählt, um neue Interaktoren von KNOLLE zu identifizieren. Zunächst musste überprüft werden, ob KNOLLE unter den Extraktionsbedingungen in einem Komplex erhalten bleibt. Mit Hilfe von nativen Mikrogelelektrophoresen und Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass KNOLLE Teil eines Proteinkomplexes mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 180kDa ist. Dieser Komplex konnte nach Solubilisierung sowohl mit Triton X100 als auch mit Octyl-beta-D-Glucopyranosid, nachgewiesen werden. Dies spricht klar gegen Artefaktbanden durch die Assoziation von monomerem KNOLLE in Detergenzmicellen.

3.3.1.2 Proteinreinigung zur Identifikation neuer KNOLLE-Interaktoren

Für die Identifizierung neuer Interaktoren von KNOLLE war die erzielte Anreicherung durch die Isolierung der Mikrosomenfraktion, deren Lyse mit Octyl-beta-D-Glucopyranosid und die anschließende Verwendung einer Ni-NTA-Affinitätssäule nicht ausreichend. Im Vergleich zu den Proteinreinigungen unter Verwendung von Triton X100 konnte durch den Einsatz von Octyl-beta-D-Glucopyranosid eine verbesserte, aber noch immer keine befriedigende Bindung des Epitop-markierten KNOLLE an die Ni-NTA-Säule erreicht werden. Diese verbesserte Bindung ist vermutlich auf die Bildung kleinerer Detergenzmicellen durch Octyl-beta-D-Glucopyranosid

zurückzuführen. Um die Bindung weiter zu verbessern, musste die Stringenz in den Binde- und Waschschrritten verringert werden. Dies hatte eine Zunahme der unspezifischen Bindung anderer Proteine zur Folge, die auch durch Variation der Bindezeiten sowie der Salzkonzentration in den verschiedenen Puffern nicht kompensiert werden konnte. Somit konnte stets eine Vielzahl der in der solubilisierten Mikrosomenfraktion enthaltenen Proteine durch CBB-Färbung in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden.

Die beschriebenen Experimente beruhten alle auf der Verwendung von Ni-NTA-Agarose. Bei der Optimierung der Metall-Affinitätssäule wurde in einigen Ansätzen jedoch auch TALON (von Clontech) und NEXUS (von Valen) verwendet, die beide Kobalt an Stelle von Nickel enthalten (Liu et al., 2003). Ein generelles Problem der Metall-Affinitätssäulen war die schwache Bindung des His₆-markierten KNOLLE-Proteins, so dass stets ein Überschuss an Affinitätsmatrix eingesetzt werden musste. Auch die Verwendung eines Wurzelkallus, der N-terminal His₆-markiertes KNOLLE exprimiert, führte zu keiner verbesserten Bindung an die Metall-Affinitätssäulen (Daten nicht gezeigt). Unter Umständen stellen Extrakte aus Wurzelkalluskulturen für den Einsatz von Metall-Affinitätssäulen ein besonderes Problem dar. Zumindest kann so die Tatsache interpretiert werden, dass durchaus nicht jedes Protein unspezifisch an die Säulen gebunden hat, einige jedoch angereichert wurden. Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil der gebundenen Proteine über Histidin-Seitenketten einen ähnlichen Komplex mit den Metall-Ionen der Säule bilden wie die Seitenketten der His₆-Markierung.

Die Epitop-Markierungen von KNOLLE und SNP33 erlaubten neben dem Einsatz von Metall-Affinitätssäulen auch die Verwendung von Antikörper-Säulen. Neben den beschriebenen Experimenten unter Verwendung der anti Myc-Säule wurde auch eine anti T7-Antikörpersäule eingesetzt. Doch ähnlich wie bei der Ni-NTA-Säule musste auch bei Verwendung der Antikörper-Säule ein großer Überschuss an Affinitätsmatrix eingesetzt werden, was erneut die unspezifische Bindung zahlreicher Proteine nach sich zog. Zudem ergab sich das Problem, dass eine befriedigende Elution nur durch Inkubation des

Säulenmaterials mit Ladepuffer für die SDS-PAGE bei 95°C möglich war, einer Methode, die häufig in der Literatur beschrieben ist (Assaad et al., 2001; Hilpert et al., 2001). Dies machte eine elektrophoretische Proteintrennung unter nativen Bedingungen unmöglich und führte zudem auch zur Elution der unspezifisch gebundenen Proteine. Unter Umständen trägt die Struktur der auf Agarose-Basis beruhenden Affinitätsmatrices zur schlechten Bindung der KNOLLE enthaltenden Proteinkomplexe bei. Bindestellen, die im Inneren des porösen Trägermaterials liegen, sind vermutlich nicht für große Proteinkomplexe, wohl aber für kleinere Proteine zugänglich. Bislang ist leider noch keine Affinitätsmatrix bekannt, die ausschließlich leicht zugängliche Bindestellen an ihrer Oberfläche trägt, um diesen Siebeffekt zu vermeiden.

Mit Hilfe der 16-BAC/SDS-2D-Gelelektrophorese ist es möglich, ein Gemisch membranständiger Proteine zu trennen (Hartinger et al., 1996). Bei dieser Methode findet die Proteintrennung unter denaturierenden Bedingungen statt. Daher wurde ein differentieller Ansatz gewählt, um putative KNOLLE-Interaktoren von kontaminierenden Proteinen in den Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule zu unterscheiden. Der Vergleich der Bandenmuster der beiden parallelen Proteinreinigungen, mit unterschiedlichen Kalluskulturen als Ausgangsmaterial, führte zur massenspektrometrischen Analyse von drei Protein-Banden. Es stellte sich jedoch heraus, dass keines der ausgeschnittenen Proteine mit der Membranfusion oder mit SNARE-Proteinen in Zusammenhang gebracht werden konnte. Durch die stark unterschiedliche Expressionsstärke zahlreicher Gene in parallel wachsenden Wurzelkalluskulturen erwies sich dieser differentielle Ansatz als ungeeignet für die Identifikation von Proteinen, die spezifisch mit KNOLLE angereichert wurden. Ob diese Schwankungen der Genexpression auf Veränderung der Kulturbedingungen über einen längeren Zeitraum hinweg zurückzuführen sind, wie dies z.B. für die Isoenzyme der Malat-Dehydrogenase beschrieben wurde (Jorge et al., 1997), ist unklar.

Bei der Durchführung der Aufreinigung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe stellten sich zahlreiche Probleme. Zum einen wird KNOLLE nur in sich teilenden Zellen exprimiert, zum anderen handelte es sich um die

Aufreinigung membranständiger Proteinkomplexe. Bei den allermeisten in der Literatur beschriebenen Aufreinigungen membranständiger Proteinkomplexe und deren Analyse mittels Massenspektrometrie handelt es sich dagegen um sehr abundante Komplexe, die z.B. an der Endoxidation oder Photosynthese beteiligt sind (Zolla et al., 2000; Collinson et al., 1994). Letzten Endes muss festgestellt werden, dass es auch nach zahlreichen Optimierungen der Proteinreinigung bislang nicht gelungen ist, KNOLLE enthaltende Komplexe in ausreichender Reinheit zu gewinnen, um neue Interaktoren von KNOLLE massenspektrometrisch zu identifizieren.

3.3.1.3 Die Aufreinigung KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe – ein hoffnungsloses Unterfangen?

Die Proteinreinigung hat sich als deutlich komplexer herausgestellt als erwartet. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde nur das in der Mikrosomenfraktion enthaltene KNOLLE genutzt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Großteil des im Ausgangsmaterial enthaltenen KNOLLE Proteins bereits bei der Zentrifugation mit 10000g pelletiert werden kann. Ob es sich dabei um Zellplatten-gebundenes KNOLLE handelt, ist derzeit noch unklar. Das in dieser Fraktion enthaltene KNOLLE sollte jedoch der weiteren Proteinreinigung zugeführt werden. Ein weiterer deutlicher Reinigungseffekt sollte durch den Einsatz von Ultrafiltrationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze von 100kDa sowie einer anschließenden trägerfreien IEF erzielt werden können, wie dies von Martin Guttenberger zur Zeit forciert wird. Zudem sollte es möglich sein, durch den Einsatz von Affinitätsmatrices, welche Bindestellen nur an der Oberfläche besitzen, die für Proteinkomplexe leicht zugänglich sind, einen deutlich besseren Reinigungsfaktor zu erreichen. Schließlich kann durch den Einsatz flacherer Acrylamidgradienten eine bessere Ausflösung im Bereich zwischen 100 und 200kDa erreicht werden, was die Darstellung, die Identifikation und das Ausschneiden der Banden für die massenspektrometrische Untersuchung ermöglichen sollte.

3.3.2 Etablierung eines universellen Proteinaseschutzes

In den Zellextrakten aus Pflanzenmaterial waren stets Proteinaseen enthalten, deren Aktivität mit den kommerziell erhältlichen Proteinaseinhibitoren nicht unterbunden werden konnte. Derartige Probleme, vor allem im Zusammenhang mit Epitop-markierten Proteinen, werden in der Literatur immer wieder beschrieben (Tian et al., 2003; Hardin and Wolniak, 1998; Reddy et al., 1994; Colas des Frances et al., 1985). Im Verlauf der Proteinreinigung konnte eine zunehmende N-terminale Degradation des Epitop markierten KNOLLE Proteins beobachtet werden, welche durch Casein im Puffer zum Resuspendieren der aufgeschlossenen Zellen weitgehend verhindert werden konnte. Gerade nach Vollendung der diversen Genom-Sequenzierungsprojekte und der zunehmenden Anzahl an Forschungsgruppen, die auf dem Gebiet der biochemischen Charakterisierung von Proteinen mittels Epitop-Markierungen und Fusionsproteinen arbeiten, ist die Etablierung eines solchen Proteinaseschutzes von besonderem Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Casein auch bei der nativen Extraktion von GST-Fusionsproteinen aus *E.coli* seine Wirkung entfaltet und somit universell einsetzbar ist. Mit Hilfe dieses einfachen und kostengünstigen Schutzes von Epitop-markierten Proteinen wird es sicherlich möglich sein, die Proteinausbeute bei der Aufreinigung aus den unterschiedlichsten Organismen deutlich zu erhöhen.

3.3.3 Nachweis der *in vivo*-Interaktion von KNOLLE und SNP33

Durch die Analysen der Proteinreinigungen konnte erstmals gezeigt werden, dass *in vivo* eine direkte Interaktion des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE mit dem konstitutiv exprimierten SNAP25-homologen Protein SNP33 stattfindet. Diese Assoziation kann bei der Aufreinigung von Proteinkomplexen, unter Verwendung von zwei Affinitätssäulen in Folge, nachgewiesen werden. Zudem scheint die Interaktion gegenüber einer Inkubation bei saurem pH resistent zu sein, da keine Elution der komplexierten Proteine von den Antikörpersäulen möglich war.

In Extrakten aus Kreuzungskallus #2, der SNP33 überexprimierte, lag deutlich mehr SNP33 mit KNOLLE assoziiert vor als in Extrakten einer Kalluskultur mit wildtypischer SNP33-Expression. Auffallend war, dass bei wildtypischer Expression nur ein geringer Anteil des eingesetzten SNP33 in den Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Säule nachgewiesen werden konnte. Dem gegenüber kam es bei der Verwendung des SNP33-überexprimierenden Kallus zu einer starken Anreicherung von SNP33 in den Elutionsfraktionen, was die Akkumulation eines KNOLLE/SNP33-enthaltenden Proteinkomplexes in den sich teilenden Zellen nahe legt. Diese scheint jedoch keine gravierenden Folgen für die Entwicklung der Pflanze zu haben. Sowohl die Pflanzen, aus denen die Kalluskulturen angelegt wurden, als auch die Kalluskultur selbst sind von wildtypischen Pflanzen bzw. Kalluskulturen phänotypisch nicht zu unterscheiden (Heese, 2001).

Des Weiteren konnten in den Extrakten des Kreuzungskallus zwei thermisch relativ stabile KNOLLE-enthaltende Proteinkomplexe mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 140 bzw. 180kDa nachgewiesen werden. Dabei könnte es sich bei dem kleineren, geringer abundanten Komplex um ein Zerfallsprodukt des größeren handeln. Interessanterweise konnte in Kallus, der SNP33 nicht überexprimierte, ein deutlich geringerer Gehalt dieser Komplexe nachgewiesen werden, obwohl SNP33 selbst nicht Teil der Komplexe zu sein scheint. Demnach scheinen in den Kalluskulturzellen durch die Überexpression von SNP33 zwar vermehrt KNOLLE/SNP33-enthaltende Proteinkomplexe vorzuliegen, diese sind jedoch nicht thermisch stabil. Des Weiteren reichert sich vermutlich ein (unter der Annahme, dass der kleinere Komplex ein Zerfallsprodukt ist) weiterer, thermisch stabilerer Proteinkomplex an. Somit greift die Überexpression von SNP33 in die Regulation der Vesikelfusion während der Cytokinese ein, ohne dass dies zu einem Phänotyp führt. An welcher Stelle dieser Eingriff stattfindet und wie die Zelle negative Folgen vermeiden kann, ist derzeit noch völlig unklar. Denkbar wäre sowohl eine Akkumulation eines dimeren Komplexes aus KNOLLE und SNP33 als auch eine Stabilisierung der SNARE-Komplexe nach erfolgter Vesikelfusion. Die Ausbildung solcher dimeren Komplexe aus Syntaxinen und SNAP25-homologen Proteinen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Yersin et al., 2003, Lang et al., 2001).

3.4 Aussichten und Perspektiven

Die Aufklärung der Cytokinese bleibt auch in Zukunft ein spannendes Thema, da es noch zahlreiche ungeklärte Fragen gibt. Bislang sind nur sehr wenige Interaktoren des cytokinespezifischen Syntaxins KNOLLE bekannt (KEULE, SNAP33 und NPSN11?). Die Erkenntnisse aus tierischen und Hefe-Zellen deuten jedoch darauf hin, dass für die Regulation der Membranerkennung und Fusion von Vesikeln eine Vielzahl weiterer Interaktoren notwendig sind (Übersichtsartikel: Pelham, 1999; Söllner and Rothman, 1996). So ist z.B. noch nicht geklärt, ob KNOLLE zunächst in einer inaktiven Form in den cytokinetischen Vesikeln vorliegt und erst vor Ort, also in der Teilungsebene aktiviert wird. Denkbar wäre, dass wie bei der homotypischen Vakuolenfusion in Hefe (Peters et al., 2001) bereits auf den cytokinetischen Vesikeln *cis*-SNARE-Komplexe enthalten sind, die in der Teilungsebene durch die Wirkung einer NSF-homologen ATPase aufgebrochen werden. Die Wechselwirkung von Syntaxin1A mit Munc18 oder die Ausbildung des SNARE-Komplexes aus Syntaxin-4, SNAP23, and VAMP-2 wird durch Phosphorylierungen beeinflusst (Tian et al., 2003; Foster et al., 1998). Eine Untersuchung der möglichen Phosphorylierungsstellen in KNOLLE und SNP33 bietet somit einen Ansatzpunkt zur Klärung der Regulation des cytokinetischen SNARE-Komplexes. Zur Zusammensetzung und Rolle der Lipide in der Vesikelmembran und in der Zellplatte gibt es derzeit noch keine Erkenntnisse. Dass auch diese einen wesentlichen Einfluss auf die Membranfusion haben, liegt auf der Hand (Tamm et al., 2003; Yang et al., 2003; McBride et al., 1999). Schließlich sind die Regulation der strikten cytokinespezifischen Expression von KNOLLE und der sehr effiziente Abbau des Proteins nach erfolgter Zellteilung noch nicht geklärt. Dies sind nur einige der interessanten Fragen, die es zu klären gilt.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Pflanzenmaterial

Als Wildtyp-Kontrollen dienten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col). Alle Pflanzenlinien die Epitop-markiertes KNOLLE exprimieren sind bei Völker (2001) beschrieben. Um Pflanzenlinien zu etablieren, die zusätzlich Epitop-markiertes SNP33 exprimieren wurden von Heese beschriebene Pflanzen (2001) eingekreuzt. Für die Transformation mit Epitop-markiertem KEULE wurden *keule* (Allel MM125) heterozygote Pflanzen verwendet. Für die Transformation mit Epitop-markiertem SYB4 wurden Pflanzen eingesetzt, die heterozygot für eine T-DNA-Insertion im SYB4-Gen waren (Linie 1004; aus der Sammlung an *Arabidopsis* T-DNA-Linien von Csaba Koncz, Delbrück Labor, Köln). Landsberg/Niederzenz Pflanzen, die heterozygot für die *knolle* Mutation X37-2 waren, wurden für die Transformation mit Epitop-markiertem KEULE und punktmutiertem KNOLLE verwendet.

Eine Tabelle aller neu etablierten Pflanzenlinien befindet sich im Anhang.

4.1.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die Vermehrung von Plasmid-DNA für Klonierungen erfolgte mit Hilfe des *E.coli* Stammes XL1, die Expression von rekombinantem KNOLLE im Stamm BL21 (DE3) pLysS mit Hilfe des Plasmids pET17b (das bei Assaad et al 2001 beschriebene Plasmid wurde von Farhah F. Assaad freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Für die Klonierung und Expression von Epitop-markiertem KEULE, und punktmutiertem KNOLLE unter Kontrolle von KNOLLE *cis*-regulatorischen Sequenzen wurden von Isabel Müller freundlicherweise das bei Müller et al. (2003) beschriebene pBAR B-Plasmid, das die cDNA von KNOLLE und die Sequenz für einen N-terminalen Myc-tag enthielt, sowie ein entsprechendes pBluescript II KS-Plasmid, zur Verfügung

gestellt. Die Pflanzentransformation mit Epitop-markiertem Syb4 erfolgte mit dem Vektor pBIN. Alle Pflanzen wurden mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes GV3101 (mit dem pMP90 Helferplasmid) transformiert. Eine Tabelle aller verwendeten Plasmide und Bakterienstämme befindet sich im Anhang.

4.1.3 Sonstiges

Kits:

Für die DNA-Sequenzierung wurde der BigDye™ Termination Cycle Sequencing Kit von ABI PRISM[®] und ein ABI-Sequencer310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) eingesetzt. Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem JETQUICK PCR Purification Spin Kit (GENOMED) bzw. JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (GENOMED). Zur Aufreinigung großer linearisierter Vektoren diente der NucleoTrap[®] Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.KG., Düren). Um hochreine Plasmid-DNA zu isolieren wurden der JETSTAR2.0 Plasmid Kit (GENOMED) bzw. der E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I oder II verwendet.

Zur Western-Blot Detektion wurden der BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Kit von Boehringer bzw. das Western-Star™ Chemiluminescent Detection System von Tropix (Bedford, Massachusetts) verwendet.

Die Aufreinigung T7-Epitop-markierter Proteine erfolgte mit Hilfe des T7-Tag Affinity Purification Kits (Novagen).

Chemikalien:

Falls nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien bei Sigma, Roth oder Gibco-BRL bezogen. Oligonucleotide wurden von der Sigma-ARK GmbH (Steinheim) synthetisiert.

Enzyme:

Alle DNA-modifizierenden und Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas, Boehringer, New England Biolabs (NEB) oder Pharmacia bezogen.

Marker:

DNA-Größenstandard: 1kb DNA Ladder (GibcoBRL[®])

Protein-Größenstandard: Full Range Rainbow Marker (Amersham, RPN 800) bzw. SDS 6 High Molecular Weight Marker (Sigma)

Membranen und Filter:

Für Western Blot Analysen wurde die PVDF-Membran (Immobilan-P) von Millipore verwendet. Zum Ernten der Kalluskulturen und während der Proteinreinigung wurde MIRACLOTH (CALBIOCHEM) als Filtrationsmaterial eingesetzt.

Röntgenfilme:

Für die Western-Blot Detektion wurden die Röntgenfilme X-OMAT AR (Kodak) bzw. der CEA RP NEW (Röntgen Bender, Baden-Baden) sowie eine Entwicklermaschine von Agfa (Curix 60) verwendet.

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit Pflanzen

4.2.1.1 Wachstumsbedingungen und Oberflächensterilisation von Samen

Nach dem Ausbringen auf feuchter Pflanzerde wurden die Samen für 2 Tage bei 6°C im Dunkeln vernalisiert. Um eine konstant hohe Luftfeuchtigkeit zu erhalten wurden die Pflanzenkisten bis zum Auflaufen der Keimlinge mit einem transparenten Kunststoffbeutel verschlossen. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte bei 18 bzw. 23°C unter Dauerbelichtung. Um Pflanzen steril anzuziehen wurde die Samenoberfläche durch 2 x 5 min Inkubation mit Ethanol (70% v/v) und anschließend 20 min mit dem Überstand einer gesättigten Calciumhypochlorit Lösung im Eppendorf Reaktionsgefäß sterilisiert. Vor dem Ausbringen der Samen auf Standard Pflanzen Medium (2,2g/l Murashige und Skoog-Salze, 0,5g/l (2-{N-Morpholino-}Ethansulfonsäure, 1% w/v Saccharose und 0,8% w/v Agar, pH 5,8) wurden die Samen 2 x 5 min mit ddH₂O gewaschen (nach Berleth und Jürgens). Bei Bedarf wurden dem Standardmedium nach dem Autoklavieren Hygromycin B (30µg/ml), Kanamycin (50µg/ml) bzw. Phosphinothricin (50µg/ml) zugesetzt.

4.2.1.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis* erfolgte mit kleinen Modifikationen nach der „Floral dip method“ von Clough und Bent (1998). Aus einem Glycerin-Stock der Agrobakterien wurde zunächst eine 5 ml ÜNK angeimpft, aus der wiederum 1ml zum Animpfen einer 250ml ÜNK eingesetzt wurde. Die Zellen wurden 10min mit 6000Upm pelletiert und anschließend in 500ml Saccharose-Lösung (5% w/v), die Silwet L-77 (0,05% v/v) enthielt, resuspendiert. In diese Zellsuspension wurden die Pflanzen für 10-30 Sekunden eingetaucht. Die Pflanzentöpfe wurden ü.N. auf eine Seite gelegt und die Pflanzenkiste mit einem transparenten Kunststoffbeutel verschlossen. Anschließend wurden die Pflanzen normal weiter kultiviert.

4.2.1.3 Induktion, Erhaltung und Ernte von Wurzelkallus-Kulturen

Zur Induktion von Wurzelkalluswachstum wurden 2-3 Wochen alte Keimlinge, die steril auf Standard Pflanzen Medium angezogen wurden, in „Callus Induktion Medium“ überführt (4,3g/l Murashige und Skoog-Salze, 0,5g/l (2-{N-Morpholino-}Ethansulfonsäure, 3% w/v Saccharose, Gamborg's B5 Vitamine, 1mg/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 0,25mg/ml Kinetin, pH 5,6-5,8, nach Soni et al. (1995)). Nach 6-8 Wochen konnte mit der Subkultivierung im selben Medium begonnen werden. Das Kalluswachstum erfolgte bei 18°C auf einem Schüttler (GFL) bei 135Upm. Das Ernten der Kalluskulturen erfolgte durch Abfiltrieren mit Hilfe von MIRACLOTH. Durch vorsichtiges Drücken wurde noch vorhandenes Medium entfernt und die so gewonnenen Kalli sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Murashige und Skoog-Salze, Gamborg's B5 Vitamine und DL-Phosphinothricin wurden von Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande) bezogen.

4.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden (Arbeiten mit DNA)

4.2.2.1 Bakterienkulturen und Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Bakterienkulturen wurden mit LB-Medium (NaCl 1%w/v, Trypton 1% w/v, Hefeextrakt 0,5%w/v) im Schüttelinkubator (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) bei 250Upm angezogen. Den Kulturmedien wurden bei Bedarf unterschiedliche Antibiotika zugesetzt (Ampicillin 100µg/ml, Tetracyclin 25µg/ml, Kanamycin 50µg/ml, Rifampicin 50µg/ml, Gentamycin 25µg/ml). *E.coli* wurde bei 37°C, *Agrobacterium* bei 30°C kultiviert. Bakterien-dauerkulturen (Stocks) wurden nach Zusatz von Glycerin (50% v/v) bei -80°C gelagert. Die Induktion der Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* erfolgte durch Zusatz von IPTG (0,5mM) bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8. Vor und 3-4h nach Induktion wurden jeweils Aliquots genommen, die zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE, CBB-Färbung oder Western Blot dienen. Die Bakterienzellen wurden pelletiert und für 5min bei 95°C in Probenpuffer (siehe SDS-PAGE) inkubiert.

4.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Genomische DNA wurde aus Blättern (0,5-1,0cm²) gewonnen. Hierzu wurde das Blattmaterial in 200µl doppelt konzentriertem CTAB-Puffer mit einem zugespitzten Glasstab homogenisiert, für 30min bei 65°C inkubiert und nach Abkühlen auf RT mit 200µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Die Lösungen wurden gut gemischt, 5min mit 10000g zentrifugiert und 150µl der wäßrigen Phase in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde nach Zusatz von 200µl Isopropanol gefällt (15min 10000g, 4°C), mit Ethanol (70% w/v, -20°C) gewaschen und das getrocknete DNA-Pellet anschließend in 50µl ddH₂O resuspendiert.

CTAB-Puffer2x:

1,4M	NaCl
2% (w/v)	CTAB
1% (w/v)	PVP
100mM	Tris-HCl, pH 8,0
20mM	EDTA

4.2.2.3 PCR Analyse

Alle verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt. Um fehlerfreie PCR-Fragmente für Klonierungen zu amplifizieren wurde das „Expand High fidelity PCR System“ (Boehringer) nach den Herstellerangaben benutzt. Für analytische PCRs wurde im Labor isolierte Taq-DNA-Polymerase unter Verwendung folgender Standardpuffer eingesetzt:

Puffer 7 (5x)	50mM Tris-HCl pH8,8, 125mM KCl, 17,5mM MgCl ₂
Puffer13 (5x)	50mM Tris-HCl pH8,8, 250mM KCl, 7,5mM MgCl ₂
Puffer 9 (10x)	100mM Tris-HCl pH9,2, 250mM KCl, 15,0mM MgCl ₂
DR (10x)	200mM Tris-HCl pH8,7, 500mM KCl, 20,0mM MgCl ₂

Material und Methoden

Temperaturprogramm:	PCR-Mix:	
1. 2min 95°C	PCP-Puffer (5x bzw. 10x)	4 bzw. 2 µl
2. 15sec 95°C	dNTP-Mix	4µl
3. 30sec xx°C	(dATP, dTTP, dCTP, dGTP; jeweils 2mM)	
4. xmin 72°C	Primer A (10µM)	1,0µl
5. 10min72°C	Primer B(10µM)	1,0µl
	Template DNA	1,0µl
	Taq-Polymerase (10x)	0,2µl
	ddH ₂ O	ad 20µl

Die Schritte 2-4 wurden 35 mal wiederholt. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Länge des erwarteten Amplifikats kalkuliert (1min/kb). Die Annealingtemperatur lag für die meisten Primer zwischen 50 und 60°C. Tabelle 2 stellt eine Übersicht zu den verschiedenen eingesetzten Primerkombinationen dar.

Tabelle 2: Übersicht Primer-Kombinationen und PCR-Amplifikate.

Fragestellung	Primerkombination	Erwartete PCR Amplifikate
Nachweis der T-DNA Insertion in Syb4 (Allel 1004)	Fish I AtSyb4-F1 neu	ca. 400bp
Unterscheidung WT Syb4/Myc-Syb4	Prom1180 revCDS160	331bp WT Syb4, 373bp Myc-Syb4
Test auf keule-Allel MM125	KEU genom 3400/ rev KEU genom 4220	829bp WT 673bp MM125
Test auf knolle-Allel X37-2	X37-2 CII X37-2 D	ca. 1,8kb WT ca. 0,8kb X37-2
Unterscheidung WT KNOLLE/T7-KNOLLE	take2 off	ca. 1,2kb PCR-Produkt, nach Verdauch mit <i>Bgl</i> II ca. 800bp + 380bp (T7-KNOLLE) bzw. 330bp (WT KNOLLE)
Unterscheidung WT SNAP33/Myc-SNAP33	MH48sp2 GMS25-FW4	730bp WT SNAP33 785bp Myc-SNAP33
Test auf WT SNAP33	GMS25-FW4 NSSNPWT1	ca. 500bp

4.2.3 Biochemische Arbeiten (Arbeiten mit Proteinen)

4.2.3.1 Proteinextraktion zur Etablierung eines Proteaseschutzes

Aus *E.coli*:

Die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* erfolgte wie unter 4.2.1.1 beschrieben. Die gefrorenen Zellen wurden mit Lysepuffer versetzt (1ml/Pellet aus 1ml Expressionskultur) und für 30min im Kühlraum auf dem Rad inkubiert. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000Upm, Kühlraum) erfolgte die Analyse der Extrakte mittels Western Blot. Um die Wirksamkeit des Proteinaseschutzes zu testen wurde ein Teil der Proben nach Abtrennung der Zelltrümmer bis zu 2h im Kühlraum auf dem Rad inkubiert.

Lysepuffer:

50mM Tris/Hepes, pH 7,0

46mM Octyl-beta-D-Glucopyranosid

10mM beta-Mercaptoethanol

5mM EDTA

1mg/ml Lysozym

Je nach Ansatz wurde dem Lysepuffer Casein (25mg/ml) bzw. Proteaseinhibitorcocktail für Bakterienextrakte (P8465, Sigma) zugesetzt.

Aus Wurzelkallus:

Je 1g in flüssigem Stickstoff zermörsertes Frischmaterial wurde durch Inkubation in 4ml Puffer resuspendiert (30min im Kühlraum, auf dem Rad). Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Filtration mit MIRACLOTH wurde durch sukzessive Zentrifugation (10min 10000g, 1h40min 100000g) die Mikrosomenfraktion gewonnen. Das Pellet der Mikrosomenfraktion wurde im Ladepuffer für die SDS-PAGE aufgenommen und mittels Western Blot analysiert.

Material und Methoden

Puffer zum Resuspendieren:

62,5mM	Natriumphosphat, pH 7,4
150mM	Natriumchlorid
10% (v/v)	Glycerin
10mM	beta-Mercaptoethanol
2mM	EDTA

Je nach Ansatz wurde den Puffer zum Resuspendieren BSA (25mg/ml), Casein (25mg/ml) oder Proteaseinhibitorcocktail für Pflanzenextrakte (P9599, Sigma) zugesetzt.

4.2.3.2 Nachweis der Membranassoziation von Proteinen

Für den Nachweis der Membranassoziation von Proteinen dienten Suspensionskulturzellen als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Mikrosomenfraktion (die Kultiveringung der Suspensionskultur ist in der Dissertation von Thomas Steinmann beschrieben). 2g in flüssigem Stickstoff zermörserte Suspensionskultur wurde in 5ml Puffer resuspendiert und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000g (15min, 4°C) abgetrennt. Je 1,2ml Überstand wurde auf 4 Reaktionsgefäße (1,5ml) aufgeteilt und zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion eine Zentrifugation bei 100000g (1h15min, 4°C, RP45A) durchgeführt. Dem Resuspendieren der so gewonnenen Mikrosomenfraktion in den unterschiedlichen Puffern (0,8ml) und der anschließenden Inkubation für 30min auf dem Rad im Kühlraum folgte eine erneute Ultrazentrifugation (100000g, 1h15min, 4°C, RP45A). Die Pellets der 2. Ultrazentrifugation wurden in 0,2ml Puffer resuspendiert. Zur Analyse mittels Western Blot wurden jeweils 80µl der resuspendierten Pellets mit 20µl 5-fach konzentriertem Ladepuffer für die SDS-PAGE versetzt und 0,5ml der Überstände nach TCA-Fällung in 0,1ml einfach konzentriertem Ladepuffer aufgenommen. 5µl aller Proben wurden auf die Gele aufgetragen.

Puffer:

50mM Kaliumphosphat, pH 7,2

50mM KCl

1mM MgCl₂

10% (v/v) Glycerin

2,5mM DTT

1mM PMSF

Protease Inhibitor Cocktail (für Pflanzen, Sigma) 1x

Unerschiedliche Zusätze:

A	ohne Zusatz
B	1M NaCl
C	0,1M Na ₂ CO ₃ , pH 10,9
D	10% (v/v) Triton X100

4.2.3.3 Elektrophoretische Trennmethoden

4.2.3.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden nach Laemmli (1970) durchgeführt. Abweichend von diesem Protokoll wurde im Probenpuffer beta-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 2% (v/v) eingesetzt. Die Proben wurden durch 2min Erhitzen auf 95°C denaturiert. Falls nicht anders angegeben wurden 6%-ige Sammel- und 15%-ige Trenngele eingesetzt. Die meisten Elektrophoresen erfolgten in Mini-ProteanII Apparaturen (BioRad) bei 200V und 30mA/Gel. Zusätzlich wurden einige Mikrogelelektrophoresen durchgeführt (siehe dort). Bei Mikrogelelektrophoresen die unter denaturierenden Bedingungen im Kühlraum durchgeführt wurden war Lithiumdodecylsulfat an Stelle von SDS im Proben- und Laufpuffer enthalten.

4.2.3.3.2 Mikrogelelektrophorese

Mikrogelelektrophoresen wurden mit Apparaturen wie bei Poehling und Neuhoff (1980) beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Glasplatten (25x36mm) wurden vor jedem Gebrauch durch sukzessive Inkubation in Hypochloritlösung (DanKlorix Hygiene-Reiniger, COLGATE-PALMOLIVE

GmbH; ü.N., anschließend mehrfach kurz gewässert in ddH₂O), 30% (v/v) Salpetersäure (ü.N., anschließend mehrfach kurz gewässert in ddH₂O) und Methanol (mehrfach mehrere min) gereinigt und anschließend im Abzug getrocknet. Bei Verwendung von 0,5mm dicken „Spacern“ erfolgte die elektrophoretische Trennung in Gelen mit einem Volumen von 0,4ml bei 60V und 16mA/Gel (maximal 300mW/Gel). Die Beladung der Mikrogele erfolgte mit Hilfe ausgezogener Glaskapillaren. Im Mikrogelsystem wurden Trennungen sowohl unter nativen (native Acrylamidgradienten-Gelelektrophorese) als auch unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE, LDS-PAGE, 16-BAC-Gelelektrophorese) durchgeführt. Alle für die Herstellung von Mikrogelen eingesetzten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (45µm Porengröße).

4.2.3.3.3 Native Acrylamidgradienten-Mikrogelelektrophorese

Nicht denaturierende 2%-19% Acrylamidgradientengele wurden im Mikrogelsystem durchgeführt. Hierzu wurde ein spezieller Mikrogradientenmischen hergestellt (von Martin Guttenberger freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Nach Füllung des Abflussschlauchs des Gradientenmischers mit Lösung C wurden die beiden Kammern mit 220µl Lösung A und 180µl Lösung B gefüllt. Um eine glatte Gelkuppe zu erhalten wurden die Kammern anschließend mit ddH₂O gefüllt und so die Mikrogele überschichtet.

Lösung A:

3,76ml ddH₂O

0,20ml APS (1% w/v)

0,04ml Triton X100 (10% v/v)

Lösung C:

2,94ml ddH₂O

1,00ml Glycerin (87% v/v)

0,04ml Triton X100

0,02ml APS (1% w/v)

Lösung B:

2,54ml Rotiphorese 30

1,00ml Tris-HCl (1,5M, pH 8,8)

0,46ml Glycerin (87% v/v)

0,04ml Triton X100 (10% v/v)

0,014ml TEMED

0,01ml Bromphenolblau (0,5 % w/v)

Puffer, ddH₂O, Rotiphorese 30 (30% w/v; Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) und Glycerinlösung wurden vor Verwendung sterilfiltriert (0,45µm Ausschlußgrenze). Vor Zusatz von APS, TEMED und Triton X100 wurden Lösung A, B und C für 5min entgast.

Als Größenstandard werden den Proben verschiedene Markerproteine zugesetzt (entweder eine Mischung bestehend aus Aldolase (158kDa), Catalase (232kDa), Ferritin (440kDa) und Thyroglobin (669kDa) oder BSA (Monomer 66kDa, Dimer 132kDa, Tetramer 264kDa)).

4.2.3.3.4 16-BAC/SDS-PAGE 2D-Gelelektrophorese

Als letzten Schritt zur Trennung integraler Membranproteine während der Aufreinigung von KNOLLE enthaltender Proteinkomplexe wurde die von Hartinger et al. (1996) etablierte 16-BAC/SDS-PAGE 2D-Gelelektrophorese angewandt. Die 16-BAC-Gele und der Laufpuffer wurden wie dort beschrieben hergestellt (Tabelle 3). Um genügend Probe laden zu können wurde die Probenvorbereitung auf unsere Bedürfnisse angepaßt. So wurden 75µl Elutionsfraktion einer Ni-NTASäule mit 44,8mg Harnstoff, 11µl DTT (1M) und 0,5µl einer Malachitgrünlösung (5% w/v) versetzt, für 5min bei 65°C inkubiert und dann sofort auf ein präparatives 16-BAC-Mikrogel geladen (0,5mm Spacerdicke, 450µl Trenn- und 100µl Sammelgel). Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 70min mit einer Stromstärke von 4mA (limitierender Parameter). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden ca. 5mm breite Streifen der 16-BAC-Gele zunächst zwei mal in Pufferlösung ohne (125mM Tris/HCl pH 6,8, 8M Harnstoff, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol), danach einmal in Pufferlösung mit SDS (2% (w/v)) wie bei O'Farrell beschrieben (1975) äquilibriert und schließlich über ein 15%-iges SDS-Polyacrylamid-Mikrogel (0,6mm Spacer, 450µl Trenngel) geschichtet. Die Elektrophorese erfolgte stufenweise für 20min bei 60V, 10min 80V, 10min 100V und 20min 120V.

Tabelle 3: Pipettierplan für 16-BAC-Gellösungen.

	10 ml Trenngel, 7,5%	5ml Sammelgel, 4%
Harnstoff	1,8g	0,5g
Kaliumphosphatpuffer, 0,5M, pH2,1	2,50ml	-
Kaliumphosphatpuffer, 0,3M, pH4,1	-	1,25ml
ddH ₂ O	2,50ml	1,50ml
Rotiphorese 30	2,50ml	0,67ml
Bisacrylamid, 1,7 % (w/v)	0,35ml	0,69
Ascorbinsäure, 80mM	0,50ml	0,25ml
Eisensulfat, 5mM	16µl	4,25µl
16-BAC, 0,25M	0,10ml	35µl
Wasserstoffperoxid, 0,04% (v/v)	0,40ml	-
Wasserstoffperoxid, 0,025% (v/v)	-	0,25ml

4.2.3.4 Western-Blot Analyse

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen erfolgte entweder in einer Multiblott Apparatur (Hoefer) für 4h mit 500V und 400mA bzw. ü.N. mit 180V und 140mA oder mit Hilfe einer Semi-Dry Blotting Apparatur in 1h bei 10V und 300mA. Mit der Semi-Dry Apparatur erfolgte aus 15% Gelen nur bis zu einem Molekulargewicht von ca.50 kDa ein ausreichender Transfer auf die Membran. Der Transferpuffer enthielt Glycin (192mM für die Multiblott bzw. 150mM für Semi-Dry Apparatur), Tris (25mM), SDS (0,1% w/v) und Methanol (20% v/v). Nach dem Transfer wurden die Membranen zunächst 2x 5min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1h bei RT bzw. ü.N. im Kühlraum mit Blockierungslösung inkubiert um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membranen zu verhindern. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte ebenfalls entweder für 1h bei RT oder ü.N. im Kühlraum. Alle Blockierungs- und Waschschrte wurden in inerten Kunststoffschalen auf dem Schüttler (GFL) durchgeführt (20-40Upm). Die Antikörperinkubationen erfolgten in 50ml Falcon Gefäßen im Rollinkubator (BACHOFER, Reutlingen). Eine Liste der verwendeten Antiseren befindet sich im Anhang. Aus Tabelle 4 sind die Waschbedingungen für die Detektion mit Meerrettichperoxidase unter Verwendung verschiedener primärer Antiseren zu entnehmen.

Tabelle 4: Waschbedingungen für Western Blot Analysen.

Lösung	Anti KNOLLE (Kaninchen)	Anti Porcino(Kaninchen)	Alle anderen
Blockierung	1h oder ü.N.	1h oder ü.N.	1h oder ü.N.
Primärer Antikörper	1h oder ü.N.	1h oder ü.N.	1h oder ü.N.
Waschlösung A	5x10min	4x10min	-
Waschlösung B	1x5min	1x5min	4x10min
Sekundärer Antikörper	1h	1h	1h
Waschlösung A	3x10min	-	-
Waschlösung B	-	-	3x10min
Waschlösung C	1x5min	1x5min	1x5min

Lösungen:

Blockierung: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 % (v/v) Tween 20,
5% w/v Magermilchpulver

Waschlösung A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1,0% (v/v) Tween 20

Waschlösung B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2% (v/v) Tween 20

Waschlösung C: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

Für die Detektion mit Alkalischer Phosphatase wurde weitgehend das Protokoll des Western-Star™ Chemiluminescent Detection Systems befolgt. Alle hierfür verwendeten Lösungen enthielten 0,2% w/v Casein. Auf Waschlösung C konnte dabei verzichtet werden.

4.2.3.5 Zellaufschluß und Probenvorbereitung vor Affinitätssäulen

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung von Proteinkomplexen diente *Arabidopsis* Wurzelkallus. Die über einen längeren Zeitraum angesammelten und bei –80°C gelagerten Kalli einer Kalluskulturlinie wurden vereinigt und im flüssigen Stickstoff unter Zusatz von Seesand zermörsert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung erneut bei –80°C.

Da die Bindung an Ni-NTA-Agarose zunächst sehr unbefriedigend erfolgte, wurde die Probenvorbereitung mehrfach optimiert. Zum Beispiel wurden die Puffer in ihrer Zusammensetzung variiert, welche für das Resuspendieren des aufgeschlossenen Zellmaterials und zur Solubilisierung der membranständigen Proteine eingesetzt wurden. Die Probenvorbereitung der im Ergebnisteil beschriebenen Experimente ist dort jeweils kurz beschrieben. Generell erfolgte das Resuspendieren des aufgeschlossenen Materials im Kühlraum auf dem Rad (bei kleinen Probenmengen) bzw. im

Erlenmeyerkolben mit Hilfe eines Magnetrührers (bei größeren Probenmengen) für 5-30min (4ml Puffer/g Kallus). Anschließend wurden große Zelltrümmer und Zellkerne durch Filtration mit Hilfe von MIRACLOTH gefolgt von einer Zentrifugation bei 10000g (10-20min) abgetrennt.

4.2.3.6 Affinitätschromatographie

4.2.3.6.1 Ni-NTA-Agarose

Zur Aufreinigung von His₆-markiertem KNOLLE aus *Arabidopsis* Wurzelkallus wurde Ni-NTA-Agarose (QIAGEN) verwendet. Die Bindung erfolgte generell im „Batch“-Verfahren (auf dem Rad im Kühlraum), für Wasch- und Elutionsschritte wurden dagegen Säulchen unterschiedlicher Größe gepackt. Für analytische Aufreinigungen wurden Spritzen aus Polypropylen oder Pipettenspitzen als Säulchen verwendet, die mit einer speziell zugeschnittenen Fritte unten verschlossen wurden. Da die Bindung an die Affinitätsmatrix unzureichend erfolgte, wurde die Probenvorbereitung (siehe Zellaufschluß und Probenvorbereitung vor Affinitätssäulen) und zahlreiche Parameter im Binde-, den Wasch- und den Elutionschritten variiert. So betrug z.B. die Zeit für die Bindung an die Ni-NTA-Agarose (unterschiedliche Konzentrationen) zwischen 1-16h, die Konzentration an NaCl wurde bis auf 0,5M erhöht und für die Elution wurde Histidin bei pH7,0 an Stelle von Imidazol bei pH8,0 eingesetzt. Unter anderem wurde auch der Einfluß verschiedener Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Bindung untersucht. Für die meisten Proteinreinigungen wurde ein Natriumphosphatpuffer (125mM, pH8,0) unter Zusatz von Glycerin (10% v/v), beta-Mercaptoethanol (10mM), Imidazol (2mM) und Octyl-beta-D-Glucopyranosid (46mM) für die Bindung eingesetzt. Die Waschschrte (drei mal 10-faches Säulenvolumen) und Elutionen (fünf mal 1-faches Säulenvolumen) erfolgten in einem entsprechenden Puffer der aber nur 50mM Natriumphosphat enthielt. Zur Elution wurde die Imidazolkonzentration meist auf 250mM erhöht. Alle Schritte wurden im Kühlraum durchgeführt.

4.2.3.6.2 anti-T7-Agarose

Um KNOLLE enthaltende Proteinkomplexe aus Wurzelkallus aufzureinigen wurde die anti-T7-Agarose als zweite Affinitätsmatrix, nach Vorreinigung mit Ni-NTA-Agarose eingesetzt. Hierfür wurde die anti-T7-Agarose zunächst mit dem Elutionspuffer für die Ni-NTA-Säule äquilibriert (50mM Natriumphosphat pH8,0, 10% v/v Glycerin, 250mM Imidazol, 250mM NaCl, 46mM Octyl-beta-D-Glucopyranosid, 10mM beta-Mercaptoethanol). Wie sich in Vorversuchen gezeigt hat, mußte für eine zufriedenstellende Bindung des T7-Epitop-markierten KNOLLE aus Wurzelkallus an die Affinitätsmatrix ein hoher Überschuss an anti-T7-Agarose eingesetzt werden (75µl pure Beads auf 225µl Elutionsfraktion der Ni-NTA-Agarose). Die Bindung erfolgte im „Batch-Verfahren“ über Nacht im Kühlraum. Die anschließenden Wasch- (zwei mal mit 10-fachem Säulenvolumen, Puffer nach Herstellerangaben durch Zusatz von 10% v/v Glycerin und 46mM Octyl-beta-D-Glucopyranosid abgeändert) und Elutionsschritte (fünf mal nach Herstellerangaben) erfolgten nachdem ein Säulchen gepackt wurde.

4.2.3.6.3 anti-Myc-Agarose

Alternativ zur anti-T7-Agarose wurde anti-Myc-Agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc.) als 2. Affinitätsmatrix nach Vorreinigung mit Ni-NTA-Agarose verwendet. Nach Äquilibrierung der anti-Myc-Agarose mit dem Elutionspuffer der Ni-NTA-Säule (hier 125mM Natriumphosphat pH8,0, 10% v/v Glycerin, 100mM Imidazol, 46mM Octyl-beta-D-Glucopyranosid und 10mM beta-Mercaptoethanol) erfolgte die Bindung für 2h im „Batch“-Verfahren im Kühlraum auf dem Rad. Wasch- und Elutionsschritte erfolgten nach Packen einer Säule unter Verwendung derselben Puffer wie bei Verwendung der anti-T7-Agarose.

4.2.3.7 Indirekte Immunlokalisation

Die indirekte Immunlokalisation wurde weitgehend nach der von Lauber et al. (1997) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Behandlung mit 50 μ M BFA erfolgte nach Geldner et al. (2003). Abweichend von den beschriebenen Protokollen wurde auf Triton X100 in den Waschlösungen und auf das Schockfrieren der Objekte in flüssigem Stickstoff verzichtet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem „Confocal Laser Scanning Microscope“ von Leica, einem 63-er Wasser-Objektiv mit nachgeschalteter digitaler Vergrößerung und der zugehörigen „Leica TCS-NT software“. Mit Hilfe von „Photoshop 7,0“ wurden die digitalisierten Bilder weiterverarbeitet und dabei teilweise in Helligkeit und Kontrast verändert.

4.2.3.8 Ultrafiltration

Um Proteinlösungen aufzukonzentrieren wurden Ultrafiltrationseinheiten von VivaScience nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Als Ausschlußgrenze der Vivaspin 2 Einheiten mit RC-Membran (regenerierte Cellulose) wurden 30kDa gewählt.

4.2.3.9 Proteinnachweis durch Silberfärbung

Um Proteine mit sehr hoher Empfindlichkeit auch im niedermolekularen Bereich (kleiner 40kDa) nachweisen zu können wurde die Silberfärbung nach Guttenberger (2001) durchgeführt. Alle hierfür verwendeten Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch frisch hergestellt.

4.2.3.10 *Hintergrundfreie Proteinfärbung mit CBB*

Die Proteinfärbung mittels Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) wurde mit leichten Modifikationen nach Neuhoff et al. (1990) durchgeführt. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit des Proteinnachweises zu erreichen, wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst zwei mal ca. 5min mit ddH₂O gewaschen und anschließend ca. 24h in der Färbelösung inkubiert. Da diese den Farbstoff in kolloidaler Form enthielt waren keine Entfärbeschritte notwendig. Um die Gele dauerhaft zu konservieren wurden sie mehrfach gewässert und zwischen Haushaltsfolien getrocknet.

Färbelösung:

0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

1,7% (v/v) Phosphorsäure

8% (w/v) Ammoniumsulfat

Literatur

Abeliovich H, Grote E, Novick P, Ferro-Novick S. Tlg2p, a yeast syntaxin homolog that resides on the Golgi and endocytic structures. *J Biol Chem*. 1998 May 8;273(19):11719-11727.

Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. and Schneider, T.R. Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principle of all SNAREs. *Nature Structural Biology* 2002, 9, 107-111.

Assaad FF, Mayer U, Wanner G, Jürgens G. The KEULE gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet*. 1996 Dec 13;253(3):267-277.

Assaad FF, Huet Y, Mayer U, Jurgens G. The cytokinesis gene KEULE encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. *J Cell Biol*. 2001 Feb 5;152(3):531-543.

Bar-Peled M, Raikhel NV. Characterization of AtSEC12 and AtSAR1. Proteins likely involved in endoplasmic reticulum and Golgi transport. *Plant Physiol*. 1997 May;114(1):315-324.

Bassham DC, Raikhel NV. An *Arabidopsis* VPS45p homolog implicated in protein transport to the vacuole. *Plant Physiol*. 1998 Jun;117(2):407-15.

Bednarek SY, Falbel TG. Membrane trafficking during plant cytokinesis. *Traffic*. 2002 Sep;3(9):621-629. Review.

Bennett, M.K., Garcia-Araras, J.E., Elferink, L.A., Peterson, K., Fleming, A.M., Hazuka, C.D., and Scheller, R.H. (1993). The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74, 863-873.

Berleth, T. & Jürgens, G. The role of the *momopteros* gene in organising the basal body region of *Arabidopsis* embryo. *Development* 1993; 118, 575-587.

Bracher A, Weissenhorn W. Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p. *EMBO J*. 2002 Nov 15; 21 (22): 6114-6124.

Bryant NJ, James DE. The Sec1p/Munc18 (SM) protein, Vps45p, cycles on and off membranes during vesicle transport. *J Cell Biol*. 2003 May 26; 161 (4): 691-696. Epub 2003 May 19.

Burri L, Varlamov O, Doege CA, Hofmann K, Beilharz T, Rothman JE, Söllner TH, Lithgow T. A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 19; 100 (17): 9873-9877. Epub 2003 Jul 31.

Carr CM, Grote E, Munson M, Hughson FM, Novick PJ. Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. *J Cell Biol*. 1999 Jul 26; 146 (2): 333-344.

Chen, Y.A. and Scheller, R.H. SNARE-mediated membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001; 2, 98-106.

Cheung AY, Chen CY, Glaven RH, de Graaf BH, Vidali L, Hepler PK, Wu HM. Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell*. 2002 Apr; 14 (4): 945-962.

Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 1998 Dec; 16 (6): 735-743.

Colas des Frances, C., Thiellement, H., De Vienne, D. (1985) Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant. Physiol*. 106, 178-182

Collinson IR, Runswick MJ, Buchanan SK, Fearnley IM, Skehel JM, van Raaij MJ, Griffiths DE, Walker JE. Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry*. 1994 Jun 28; 33 (25): 7971-7978.

Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC, Rizo J. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J*. 1999 Aug 16; 18 (16): 4372-4382.

Dulubova I, Yamaguchi T, Gao Y, Min SW, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J. How Tlg2p/syntaxin 16 'snares' Vps45. *EMBO J*. 2002 Jul 15; 21 (14): 3620-3631.

Dulubova I, Yamaguchi T, Arac D, Li H, Huryeva I, Min SW, Rizo J, Sudhof TC. Convergence and divergence in the mechanism of SNARE binding by Sec1/Munc18-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7; 100 (1): 32-37. Epub 2002 Dec 27.

Eitzen G, Will E, Gallwitz D, Haas A, Wickner W. Sequential action of two GTPases to promote vacuole docking and fusion. *EMBO J*. 2000 Dec 15; 19 (24): 6713-6720.

Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S, Jahn R. Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem*. 1999 May 28; 274 (22): 15440-15446.

Field C, Li R, Oegema K. Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Feb; 11 (1): 68-80. Review.

Foster LJ, Yeung B, Mohtashami M, Ross K, Trimble WS, Klip A. Binary interactions of the SNARE proteins syntaxin-4, SNAP23, and VAMP-2 and their regulation by phosphorylation. *Biochemistry*. 1998 Aug 4; 37 (31): 11089-11096.

Fukuda, R., McNew, J.A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J.E. and Söllner, T.H. Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature* 2000; 407, 198-202.

Gallwitz D, Jahn R. The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem Sci*. 2003 Mar; 28 (3): 113-116.

Gerhardt B, Kordas TJ, Thompson CM, Patel P, Vida T. The vesicle transport protein Vps33p is an ATP-binding protein that localizes to the cytosol in an energy-dependent manner. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19; 273 (25): 15818-15829.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.-D., Jürgens, G. and Palme, K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 2001; 413, 425-428.

Granger, C.L. and Cyr, R.J. Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta* 2000; 210, 502-509.

Grebe M, Gadea J, Steinmann T, Kientz M, Rahfeld JU, Salchert K, Koncz C, Jürgens G. A conserved domain of the arabidopsis GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell*. 2000 Mar; 12 (3): 343-356.

Guertin DA, Trautmann S, McCollum D. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Jun; 66 (2): 155-178. Review.

Guttenberger M. Chemical fixation avoids loss of low-molecular-weight polypeptides during silver staining in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 2001 Jan 1; 288 (1): 104-106.

Hardin SC, Wolniak SM. Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinases. *Planta*. 1998 Nov; 206 (4): 577-584.

Hartinger J, Stenius K, Hogemann D, Jahn R. 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem*. 1996 Aug 15; 240 (1): 126-133.

Heese, M., Mayer, U. and Jürgens, G. Cytokinesis in flowering plants: cellular process and developmental integration. *Current Opinion in Plant Biology* 1998; 1, 486-491.

Heese M. Cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*: Characterization of the vesicle trafficking proteins AtSNAP33 and AtRab8. Dissertation Universität Tübingen, 2001

Heese M, Gansel X, Sticher L, Wick P, Grebe M, Granier F, Jurgens G. Functional characterization of the KNOLLE-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis. *J Cell Biol*. 2001 Oct 15; 155 (2): 239-249. Epub 2001 Oct 08.

Hepler, P.K. Endoplasmatic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* 1982; 111, 121-133.

Hilpert K, Hansen G, Wessner H, Kuttner G, Welfle K, Seifert M, Hohne W. Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng*. 2001 Oct; 14 (10): 803-806.

Hush JM, Wadsworth P, Callaham DA, Hepler PK. Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching. *J Cell Sci*. 1994 Apr; 107 (Pt 4): 775-784.

Ito M, Araki S, Matsunaga S, Itoh T, Nishihama R, Machida Y, Doonan JH, Watanabe A. G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell*. 2001 Aug;13(8):1891-1905. Erratum in: *Plant Cell* 2001 Sep; 13 (9): 2159.

Jürgens, G. and Pacher, T. Cytokinesis: membrane trafficking by default? *Annual Plant Reviews* (9), Blackwell Publishing 2003; 238-254.

Jorge IC, Mangolin CA, Machado MF. Malate dehydrogenase isozymes (MDH; EC 1.1.1.37) in long-term callus culture of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) exposed to sugar and temperature stress. *Biochem Genet*. 1997 Jun; 35 (5-6): 155-164.

Kargul J, Gansel X, Tyrrell M, Sticher L, Blatt MR. Protein-binding partners of the tobacco syntaxin NtSyr1. *FEBS Lett.* 2001 Nov 16; 508 (2): 253-258.

Laage R, Ungermann C. The N-terminal domain of the t-SNARE Vam3p coordinates priming and docking in yeast vacuole fusion. *Mol Biol Cell.* 2001 Nov; 12 (11): 3375-3385.

Lämmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227, 660-685.

Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 2001 May 1; 20 (9): 2202-2213.

Lauber MH, Waizenegger I, Steinmann T, Schwarz H, Mayer U, Hwang I, Lukowitz W, Jurgens G. The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J Cell Biol.* 1997 Dec 15; 139 (6): 1485-1493.

Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16: 19-49. Review.

Liu Y and Barlowe C. Analysis of Sec22p in endoplasmic reticulum/Golgi transport reveals cellular redundancy in SNARE protein function. *Mol Biol Cell.* 2002 Sep; 13 (9): 3314-3324.

Liu HL, Ho Y, Hsu CM. Molecular simulations to determine the chelating mechanisms of various metal ions to the His-tag motif: a preliminary study. *J Biomol Struct Dyn.* 2003 Aug; 21 (1): 31-41.

Low SH, Li X, Miura M, Kudo N, Quinones B, Weimbs T. Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Dev Cell.* 2003 May; 4 (5): 753-759.

Lukowitz W, Mayer U, Jurgens G. Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell.* 1996 Jan 12; 84 (1): 61-71.

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 437-473. Review.

Mansour SJ, Skaug J, Zhao XH, Giordano J, Scherer SW, Melancon P p200 ARF-GEP1: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 6; 96 (14): 7968-7973.

Mayer, U., Herzog, U., Berger, F., Inzé, D. and Jürgens, G. Mutations in the *PILZ* group genes disrupt the microtubule cytoskeleton and uncouple cell cycle progression from cell division in *Arabidopsis* embryo and endosperm. *European Journal of Cell Biology* 1999; 78, 100-108.

McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*. 1999 Aug 6; 98 (3): 377-386.

McClinton, R.S. and Sung, Z.R. Organization of cortical microtubules at the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Planta* 1997 201, 252-260.

McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T.H. and Rothman, J.E. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 2000; 407, 153-159.

Morinaga N, Adamik R, Moss J, Vaughan M. Text Brefeldin A inhibited activity of the sec7 domain of p200, a mammalian guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*. 1999 Jun 18; 274 (25): 17417-17423.

Molchan, T.M., Valster, A.H. and Hepler, P.K. Actomyosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. *Planta* 2001 214, 683-693.

Müller I, Wagner W, Volker A, Schellmann S, Nacry P, Kuttner F, Schwarz-Sommer Z, Mayer U, Jurgens G. Syntaxin specificity of cytokinesis in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*. 2003 Jun; 5 (6): 531-534.

Müller O, Johnson DI, Mayer A. Cdc42p functions at the docking stage of yeast vacuole membrane fusion. *EMBO J*. 2001 Oct 15; 20 (20): 5657-5665.

Nacry P, Mayer U, Jurgens G. Genetic dissection of cytokinesis. *Plant Mol Biol*. 2000 Aug; 43 (5-6): 719-733. Review.

Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S.. Tobacco BY-2 cell line as „HeLa“ cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol*. 1992; 132, 1-30

Nebenführ A, Frohlick JA, Staehelin LA. Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiol*. 2000 Sep; 124 (1): 135-151.

Neuhoff V, Stamm R, Pardowitz I, Arold N, Ehrhardt W, Taube D. Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis*. 1990 Feb; 11 (2): 101-17.

O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional elektrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975; 250 (10), 4007-4021.

Otegui, M.S., Mastronarde, D.N., Kang, B.H., Bednarek, S.Y. and Staehelin, L.A. Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography. *Plant Cell* 2001; 13, 2033-2051.

Pacher T. Identifizierung und Charakterisierung eines cytokinespezifischen Synaptobrevins aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit Universität Tübingen, 1999

Parlati, F., McNew, J.A., Fukuda, R., Miller, R., Söllner, T.H. and Rothman, J.E. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* 2000 407, 194-198.

Parlati F, Varlamov O, Paz K, McNew JA, Hurtado D, Sollner TH, Rothman JE. Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16; 99 (8): 5424-5429.

Pelham HR. The Croonian Lecture 1999. Intracellular membrane traffic: getting proteins sorted. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999 Aug 29; 354 (1388): 1471-1478. Review.

Peng R, Gallwitz D. Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *J Cell Biol*. 2002 May 13; 157 (4): 645-655. Epub 2002 May 06.

Peters C, Andrews PD, Stark MJ, Cesaro-Tadic S, Glatz A, Podtelejnikov A, Mann M, Mayer A. Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science*. 1999 Aug 13; 285 (5430): 1084-1087.

Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*. 2001 Feb 1; 409 (6820): 581-588.

Picton JM, Steer MW. Determination of secretory vesicle production rates by dictyosomes in pollen tubes of *Tradescantia* using cytochalasin D. *J Cell Sci*. 1981 Jun; 49: 261-272.

Poehling und Neuhoff One and two-dimensional electrophoresis in micro-slab gels, *Electrophoresis* 1980; 1: 90-102

Rambourg A, Clermont Y, Jackson CL, Kepes F. Effects of brefeldin A on the three-dimensional structure of the Golgi apparatus in a sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Anat Rec.* 1995 Jan; 241 (1): 1-9.

Reddy AS, Safadi F, Beyette JR, Mykles DL. Calcium-dependent proteinase activity in root cultures of *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Mar 30; 199 (3): 1089-1095.

Rieder SE, Emr SD. A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol Biol Cell.* 1997 Nov; 8 (11): 2307-2327.

Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG. Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell.* 2002 Jan; 14 (1): 237-261.

Rojo E, Zouhar J, Kovaleva V, Hong S, Raikhel NV. The AtC-VPS Protein Complex Is Localized to the Tonoplast and the Prevacuolar Compartment in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell.* 2003 Feb; 14 (2): 361-369.

Sanderfoot AA, Assaad FF, Raikhel NV. The *Arabidopsis* genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol.* 2000 Dec; 124 (4): 1558-1569.

Sanderfoot AA, Kovaleva V, Bassham DC, Raikhel NV. Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the *Arabidopsis* cell. *Mol Biol Cell.* 2001 Dec; 12 (12): 3733-3743.

Samuels, A.L., Giddings, T.H., Jr. and Staehelin, L.A. Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *Journal of Cell Biology* 1995 130, 1345-1357.

Seals DF, Eitzen G, Margolis N, Wickner WT, Price A. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15; 97 (17): 9402-9407.

Söllner R, Glasser G, Wanner G, Somerville CR, Jurgens G, Assaad FF. Cytokinesis-defective mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002 Jun; 129 (2): 678-690.

Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. & Rothman, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion.

Cell 1993a; 75, 409-418.

Söllner, T. Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. & Rothman, J.E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993b; 362, 318-324.

Söllner TH, Rothman JE. Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion. *Experientia*. 1996 Dec 15; 52 (12): 1021-1025. Review.

Söllner TH. Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Mol Membr Biol*. 2003 Jul-Sep; 20 (3): 209-220.

Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JA. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell*. 1995 Jan; 7 (1): 85-103.

StaeHELIN, L.A. and Hepler, P.K. Cytokinesis in higher plants. *Cell* 1996; 84, 821-824.

Stenbeck G, Schreiner R, Herrmann D, Auerbach S, Lottspeich F, Rothman JE, Wieland FT. Gamma-COP, a coat subunit of non-clathrin-coated vesicles with homology to Sec21p. *FEBS Lett*. 1992 Dec 14; 314(2): 195-8.

Strompen G, El Kasmi F, Richter S, Lukowitz W, Assaad FF, Jurgens G, Mayer U. The Arabidopsis HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr Biol*. 2002 Jan 22; 12 (2): 153-158.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1998 Sep 24; 395 (6700): 347-353.

Tamm LK, Crane J, Kiessling V. Membrane fusion: a structural perspective on the interplay of lipids and proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2003 Aug; 13 (4): 453-466.

Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003 Jan; 60 (5): 523-533. Epub 2002 Nov 07. Review.

Tian JH, Das S, Sheng ZH. Ca²⁺-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc18. *J Biol Chem*. 2003 Jul 11; 278 (28): 26265-26274. Epub 2003 May 02.

^aUngermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H.R. & Wickner, W. A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J Cell Biol* 1998; 140, 61-69.

Ungermann C, von Mollard GF, Jensen ON, Margolis N, Stevens TH, Wickner W. Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion. *J Cell Biol*. 1999 Jun 28; 145 (7): 1435-1442.

Ungermann C, Nichols BJ, Pelham HR, Wickner W. A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J Cell Biol*. 1998 Jan 12; 140 (1): 61-69.

Ungermann C, Price A, Wickner W. A new role for a SNARE protein as a regulator of the Ypt7/Rab-dependent stage of docking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1; 97 (16): 8889-8891.

Valster AH, Hepler PK Caffeine inhibition of cytokinesis: effect on the phragmoplast cytoskeleton in living *Tradescantia* stamen hair cells. *Protoplasma* 1997; 196: 155-166

Verma DP. CYTOKINESIS AND BUILDING OF THE CELL PLATE IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001 Jun; 52: 751-784.

Völker A. Untersuchungen zur Regulation und Lokalisation des Cytokinese-spezifischen Syntaxins KNOLLE von *Arabidopsis thaliana*. Dissertation Universität Tübingen, 2001

Völker A, Stierhof YD, Jürgens G. Cell cycle-independent expression of the Arabidopsis cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE results in mistargeting to the plasma membrane and is not sufficient for cytokinesis. *J Cell Sci*. 2001 Aug; 114 (Pt 16): 3001-3012.

Waizenegger I, Lukowitz W, Assaad F, Schwarz H, Jurgens G, Mayer U. The Arabidopsis KNOLLE and KEULE genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis. *Curr Biol*. 2000 Nov 2; 10 (21): 1371-1374.

Wickner W, Haas A. Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69: 247-275. Review.

Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol.* 2000 Oct 30; 151 (3): 551-562.

Yamaguchi T, Dulubova I, Min SW, Chen X, Rizo J, Sudhof TC. Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif. *Dev Cell.* 2002 Mar; 2 (3): 295-305.

Yang B, Gonzalez L Jr, Prekeris R, Steegmaier M, Advani RJ, Scheller RH. SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem.* 1999 Feb 26; 274 (9): 5649-5653.

Yang L, Ding L, Huang HW. New phases of phospholipids and implications to the membrane fusion problem. *Biochemistry.* 2003 Jun 10; 42 (22): 6631-6635.

Yersin A, Hirling H, Steiner P, Magnin S, Regazzi R, Huni B, Huguenot P, De los Rios P, Dietler G, Catsicas S, Kasas S. Interactions between synaptic vesicle fusion proteins explored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22; 100 (15): 8736-8741. Epub 2003 Jul 09.

Zheng H, Bednarek SY, Sanderfoot AA, Alonso J, Ecker JR, Raikhel NV. NPSN11 is a cell plate-associated SNARE protein that interacts with the syntaxin KNOLLE. *Plant Physiol.* 2002 Jun; 129 (2): 530-539.

Zolla L, Timperio AM. High performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the simultaneous resolution and identification of intrinsic thylakoid membrane proteins. *Proteins.* 2000 Nov 15; 41 (3): 398-406.

Anhang

Tabelle 5: Übersicht zu den eingesetzten Antisera.

Antiserum	Verdünnung im Western	Verdünnung in IF	Organismus	Herkunft	Bemerkung
anti alpha-Tubulin (B5-1-2)	-	1:4000	Maus	Sigma	Monoklonal
anti Cyclophilin5	1:10000	-	Kaninchen	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti gamma-COP (SEC21)	1:1000	1:1000	Kaninchen	D. Robinson	Polyklonal
anti KNOLLE	1:8000	1:4000	Kaninchen	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti KNOLLE (#10)	-	1:250	Ratte	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti c-Myc (A14)	1:1000	-	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	Polyklonal
anti c-Myc-POD	1:1000	-	Maus	Roche	
anti PEP12	1:1000	1:100	Kaninchen	RoseBiotech	Polyklonal
anti PIN1	1:5000	1:500	Kaninchen	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti PM-ATPase	1:10000	1:300	Maus	H. Schwarz, MPI Tübingen	Monoklonal
anti PORCINO	1:5000	-	Kaninchen	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti SEC12	1:1000	1:100	Kaninchen	RoseBiotech	Polyklonal
anti SNAP33	1:4000	-	Kaninchen	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti SYB4	1:1000 (1:3000)		Kaninchen	H. Schwarz, MPI Tübingen	Polyklonal
anti T7	1:10000	1:150	Maus	Novagen	Monoklonal
anti TLG2a	1:1000	1:100	Kaninchen	RoseBiotech	Polyklonal
anti GST-POD	1:1000	-	Kaninchen	Sigma	
anti Kaninchen-AP	1:5000	-	Ziege	Tropix	
anti Kaninchen-POD	1:2000	-	Schaf	Boehringer	
anti c-Myc-POD	1:1000	-	Maus	Roche	
anti Maus-AP	1:5000	-	Ziege	Novagen	
anti Maus-POD	1:2000	-	Ziege	Boehringer	
anti Ratte-POD	1:1000	-	Ziege	Boehringer	
anti Kaninchen-Cy3	-	1:600	Ziege	Dianova	
anti Kaninchen-FITC	-	1:600	Ziege	Dianova	
anti Maus- Cy3	-	1:600	Ziege	Dianova	
anti Maus- FITC	-	1:600	Ziege	Dianova	
anti Ratte-Cy3	-	1:300	Ziege	Dianova	

Tabelle 6: Übersicht zu den verwendeten Oligonukleotiden.

Oligonukleotid	Sequenz	Beschreibung
KEULE		
fw KEULE	TATGTCTAGAATGTCGTA CTCTGACT	Amplifikation der KEULE cDNA
re KEULE	TTACTCTAGATCATATTTGGAGATC	Amplifikation der KEULE cDNA
5'UTR -300	GCGAAGAAATCACAGTA	Sequenzierprimer
KEULE -100	CAATCACTGCGATTCTCTC	Sequenzierprimer
KEU 200	GGAGTTTCATTGGTTG	Sequenzierprimer
KEU 400	CGAGTGTATTACCTCGG	Sequenzierprimer
KEU 600	CAGTCTTTGCTTCGTTG	Sequenzierprimer
KEU 800	CATGAGTGGACATATGA	Sequenzierprimer
KEU 1200	CAACTTGAACAAGACC	Sequenzierprimer
KEU 1600	GAGGATTTCCCATGTATG	Sequenzierprimer
KEU 1800	GCGTCAAGCGATTTGAG	Sequenzierprimer
KEU genom 3400	GGTGATGCTGGAATGA	Test auf Deletion in KEULE
rev KEULE genom 4220	GATCTCATGGACTGAGC	Test auf Deletion in KEULE
KNOLLE		
fw KN-AxxA	GATGGCGAAATCGGCTATGAGT TACGTTGACTTG	Einführung der Punktmutationen
Re KN-AxxA	CAAGTCAACGTA ACTCATAGCC GATTTGCGCCATG	Einführung der Punktmutationen
re CDS-Drall	AGTCAGGTCCTGCTTCCATATC	Primer für Primer Extension PCR
fw 5'UTR-Sall	ACAGTCGACAAAAGCGATGT	Primer für Primer Extension PCR
off	ATTGGATAACAAGACACGAAAGG	Analytische PCR und Sequenzierprimer
Take 2	CACTGCGATTCTCTCTGATTC	Analytische PCR und Sequenzierprimer
X37-2 CII	TTGTGTCTGGTTTGAGGAAGGC	Analytische PCR
X37-2 D	CTGCATGAGTTCCACACAGAAGG	Analytische PCR
SYB4		
Syb-FP-2	TTATGTGAGCTCTTTCTTTCCTT GATTTGAGTTTGATTCCA	Amplifikation der Promotorregion + 5'UTR von Syb4
Prom-R-SnaB1	GCCGCCTACGTA CTTTGCCTTA TTACTTCTCCAGTAATA	Amplifikation der Promotorregion + 5'UTR von Syb4
CDS-F	ACGATTTCTAGAATGGTGAAAA TGACATTGATAGCTCGTG	Amplifikation der CDS von Syb4 + 3'UTR + Bereich bis zum nächsten Gen
Syb-ASR-2	AGTAGACTCGAGGAACAGAT TTGCTAAGTTATACAGCGGTG	Amplifikation der CDS von Syb4 + 3'UTR + Bereich bis zum nächsten Gen
ev CDS50	GTCACGTCCATCATCGAGCC	Nachweis des WT-Allels
rev CDS160	CAACGGACATTCTTGAAGCG	Unterscheidung WT Syb4/Myc-Syb4 + Sequenzierprimer
PROM 400	CTAAGATGAATGTAGCGTTTG	Sequenzierprimer für Syb4 + Nachweis des WT-Allels
PROM 780	GAGATTTGCTTCCGTTTGG	Sequenzierprimer für Syb4
PROM 1180	GTTTTAAGCATCTGTGTTTC	Unterscheidung WT Syb4/Myc-Syb4 + Sequenzierprimer
CDS 400	GTATGCTTGATCTCAAAGCTAAAG	Sequenzierprimer für Syb4
CDS 800	GATGAACTCTATGAGGTTTCATC	Sequenzierprimer für Syb4
CDS 1200	GTAGCTTAGATAGTTAACATATGG	Sequenzierprimer für Syb4

AtSyb4-F1 neu	CGATCATCGTCTTCCTCTGGTTCTC	Test auf T-DNA-Insertion in Syb4
Fish I	CTGGGAATGGCGAAATCAAGGCATC	Test auf T-DNA-Insertion in Syb4
SNAP33		
MH48sp2	GAACCGACTGGTTTTCAATAC CACC	Analytische PCR
GMS25-FW4	GCTAGATCCTGGGCTTTCGAT TTG	Analytische PCR
NSSNPWT1	CTTGGAAGACTTGAGGTCGAC TGAGTT	Analytische PCR

Tabelle 7: Übersicht über die Bakterienstocks.

Konzentrationen der Antibiotika: Amp 100µg/ml, Tet 50µg/ml, Kan 50µg/ml, Rif 50µg/ml, Genta 25µg/ml. * *Agrobacterium tumefaciens* Stamms GV3101 mit dem pMP90 Helferplasmid und zusätzlichen dem Plasmid pSOUP.

Bakterien Stock	Beschreibung	Bakterien Stamm	Plasmid	Resistenz
KEULE				
Myc-KEULE #34	Myc-tag vor <i>KEULE</i> cDNA, <i>KNOLLE</i> UTRs	<i>E.coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
Myc-KEULE F2, F3	Aus Myc-KEULE #34 umklontiert	<i>E.coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan
Myc-KEULE F3a, F3b, F3c	Entspricht Myc-KEULE F2	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
Myc-KEULE #91	Myc-tag vor <i>KEULE</i> cDNA, <i>KNOLLE</i> UTRs	<i>E.coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
Myc-KEULE G2, G4, G6	Aus Myc-KEULE #91 umklontiert	<i>E.coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan
Myc-KEULE G2a, G2b, G2c	Entspricht Myc-KEULE G2	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
Myc-KEULE #277	Myc-tag vor <i>KEULE</i> cDNA, <i>KNOLLE</i> UTRs	<i>E.coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
Myc-KEULE H2	Aus Myc-KEULE #277 umklontiert	<i>E.coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan
Myc-KEULE H2a, H2b, H2c	Entspricht Myc-KEULE H2	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
Myc-KEULE #280	Myc-tag vor <i>KEULE</i> cDNA, <i>KNOLLE</i> UTRs	<i>E.coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
Myc-KEULE I2	Aus Myc-KEULE #280 umklontiert	<i>E.coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan
Myc-KEULE I2a	Entspricht Myc-KEULE I2	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
KNOLLE				
KNOLLE-AxxA # 47	T7-KNOLLE, Thr(6)-Ala, Phe(9)-Ala, <i>KNOLLE</i> UTRs	<i>E.coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
KNOLLE-AxxA A1	Aus #47 umklontiert	<i>E.coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan
KNOLLE-AxxA A1a, A1b, A1c	Entspricht A1	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
KNOLLE-AxxA # 72	T7-KNOLLE, Thr(6)-Ala, Phe(9)-Ala, <i>KNOLLE</i> UTRs	<i>E.coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
KNOLLE-AxxA B1, B2, B3	Aus #72 umklontiert	<i>E.coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan

KNOLLE-AxxA B2a, B2b, B2c	Entspricht B2	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
KNOLLE-AxxA # 76	T7-KNOLLE, Thr(6)-Ala, Phe(9)-Ala, KNOLLE UTRs	<i>E. coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
KNOLLE-AxxA C2, C4, C6	Aus #76 umklont	<i>E. coli</i> XL1	pBAR	Tet, Kan
KNOLLE-AxxA C2a, C2b, C2c	Entspricht C2	<i>Agrobacterium</i> *	pBAR	Rif, Kan, Genta
Syb4				
Myc in pKS1, 2, 3, 4	Myc-Sequenz in pKS	<i>E. coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
Myc-Syb #1, #8	Myc-Tag vor SYB-CDS in pKS, ohne Promotor	<i>E. coli</i> XL1	KS	Tet, Amp
#12, #18, #38	Finale Konstrukt Myc-Syb in pKS	<i>E. coli</i> XL1	pKS	Tet, Amp
C	<i>Xho</i> I*Klenow/ <i>Sac</i> I geschnittenes Syb in <i>Sac</i> I/ <i>Sma</i> I geschnittenem pBIN	<i>E. coli</i> XL1	pBIN	Tet, Kan
C-1, C-2	entspricht C	<i>Agrobacterium</i>	pBIN	Rif, Kan, Genta
203, 204	<i>Xho</i> I*Klenow/ <i>Adel</i> * Klenow geschnittenes Syb in <i>Sac</i> I*Klenow/ <i>Sma</i> I geschnittenem pBIN	<i>E. coli</i> XL1	pBIN	Tet, Kan
203-1, 203-2, 204-1, 204-2	entspricht 203/204	<i>Agrobacterium</i>	pBIN	Rif, Kan, Genta
A, B	leerer pBIN Vektor	<i>E. coli</i> XL1	pBIN	Tet, Kan

Tabelle 8: Übersicht der etablierten Pflanzenlinien.

Pflanzenlinie	Beschreibung	Resistenz
Myc-KEULE, T1		
MM125 F3a, G2a, H2c, I2a	Nachkommen der MM125 heterozygoten Pflanzen, welche durch die entsprechenden <i>Agrobacterium</i> transformiert wurden.	BASTA
X37-2 F3a, G2a, H2c, I2a	Nachkommen der X37-2 heterozygoten Pflanzen, welche durch die entsprechenden <i>Agrobacterium</i> transformiert wurden.	BASTA
T7-KNOLLE-AxxA, T1		
A1a, B2a, C2a	Nachkommen der X37-2 heterozygoten Pflanzen, welche durch die entsprechenden <i>Agrobacterium</i> transformiert wurden.	BASTA
Myc-SNAP33/T7-KNOLLE-His₆ in doppelt homozygot mutantern Hintergrund; F3-Generation		
SNxKN #1, 2, 3, 5, 10, 17, 18	Kreuzung 13xD (S33-136xJ3-1)	BASTA, Hyg, Kan
SNxKN #33	Kreuzung 14xE (S33-136xK3-301)	BASTA, Hyg, Kan

Syb4 T-DNA-Linien		
B, D, H	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze 1004/31/100	Hyg
L, M	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze 1004/31/103	Hyg
S, O, V, W	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze 1004/31/102	Hyg
X, Y, Z	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze 1004/35/110	Hyg
DD, FF, HH	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze 1004/35/116	Hyg
LL, NN, QQ, RR, SS, UU	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze 1004/35/122	Hyg
WW, ZZ	Nachkommen der heterozygoten Mutterpflanze	Hyg
Myc-Syb4, T1		
NN1, NN2	kein Transgen enthalten	
HH1, Y1, Z1-3, WW1, WW3, WW4, ZZ1-3	heterozygot für Allel 1004, enthalten das Transgen	Hyg, Kan
Myc-Syb4, T2 („rescue“_Linien)		
WW3/8, /11, /12, /29, /33, /34, /64, /68	Nachkommen der T2-Pflanze WW3	Hyg, Kan
ZZ2/15, /16	Nachkommen der T2-Pflanze ZZ2	Hyg, Kan
HH1/37, /38, /39, /46, /47, /48, /49, /51, /55, /58, /61	Nachkommen der T2-Pflanze HH1	Hyg, Kan

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Tobias Benjamin Pacher
Adresse Im Winkelrain 73
72076 Tübingen
Geburtsdatum 25.08.1972 in Kirchheim/Teck
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung 1979-1980 Grundschule in Nürtingen
1980-1983 Grundschule in Neckartailfingen
1983-1989 Realschule in Neckartenzlingen
Abschluss: Mittlere Reife (Gesamtnote 1,5)
1989-1992 Berufliches Gymnasium der dreijährigen Aufbauform
in Nürtingen, agrarwissenschaftliche Richtung,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote 1,2)

Zivildienst 08.1992-10.1993 Naturschutzbund Deutschland

Studium 10.1993-02.1994 Chemie (Diplom), Eberhard-Karls-Universität Tübingen
02.1994-07.1998 Biochemie (Diplom), Eberhard-Karls-Universität
Tübingen mit den Schwerpunkten Physiologische Chemie,
Organische Chemie und Pflanzenphysiologie
03.1996 Vordiplom in Biochemie (Gesamtnote gut)
10.1998 Diplom in Biochemie (Gesamtnote sehr gut)
10.1998-07.1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit dem Thema
„Identifizierung und Charakterisierung eines
cytokinesespezifischen Synaptobrevins aus
Arabidopsis thaliana“

Promotion seit 09.1999 in der Abteilung für Entwicklungsgenetik des ZMBP,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Leitung von Prof.
Dr. G. Jürgens mit dem Thema „Biochemische und
zellbiologische Charakterisierung des cytokinespezifischen
Syntaxins KNOLLE und seiner Interaktoren“

Im Selbstverlag herausgegeben von
Tobias Pacher
Im Winkelrain 73
72076 Tübingen