

---

---

# **Lokalisierung und Charakterisierung Calmodulin- ähnlicher Proteine aus *Arabidopsis thaliana***

---

---

Dissertation der Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sandra Flosdorff

München, den 22.10.2014

Dissertation eingereicht am: 22.10.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2015

Erstgutachterin: Prof. Dr. U. Vothknecht

Zweitgutachterin: Prof. Dr. A. Böttger

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt. Ich habe nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, 22.10.2014

---

Sandra Flosdorff

---

IV

2.2.3.5	Isolation von Chloroplasten .....	30
2.2.3.6	Membranextraktion von Proteinen .....	30
2.2.3.7	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> Blättern.....	31
2.2.3.8	Transiente Transformation von isolierten Protoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31
2.2.3.9	Fluoreszenzmikroskopie .....	32
2.2.4	Bioinformatische Methoden .....	33
2.2.4.1	Erstellung von Sequenz-Alignments.....	33
2.2.4.2	Berechnung der prozentualen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen .....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Lokalisierung und Charakterisierung von CML5.....	35
3.1.1	Bioinformatische Analyse von CML4 und CML5 .....	35
3.1.2	Lokalisierung .....	38
3.1.2.1	<i>In vivo</i> Lokalisierungsanalyse in <i>N. benthamiana</i> . ....	38
3.1.2.2	<i>In vivo</i> Lokalisierungsanalyse in <i>A. thaliana</i> .....	42
3.1.2.3	Fraktionierung durch Saccharose-Gradienten.....	42
3.1.2.4	Behandlung mit Brefeldin A.....	45
3.1.2.5	Kolokalisierungsanalysen mit Ara6.....	47
3.1.3	Topologie.....	49
3.1.3.1	Biochemische Identifikation einer möglichen Präsequenz .....	49
3.1.3.2	Untersuchung zur Membranassoziation.....	53
3.1.3.3	Fluoreszenzuntersuchungen zur Membranverankerung .....	56
3.1.4	<i>In vitro</i> Funktionsanalyse .....	58
3.1.4.1	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Bindung an Phenylsepharose .....	58
3.1.4.2	Untersuchung zur veränderten Mobilität durch Ca <sup>2+</sup> -Bindung.....	59
3.1.5	Identifikation möglicher Interaktionsproteine .....	60
3.1.5.1	Quervernetzung von Patellin1 und Calmodulin.....	61
3.1.5.2	Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose.....	63
3.1.6	<i>In planta</i> Untersuchungen zur Funktion von CML5 .....	64
3.2	Lokalisierung weiterer CMLs.....	68
3.2.1	CML4.....	70
3.2.2	CML3.....	71
3.2.3	CML30.....	73
3.2.4	At1g73440 und At2g36180 .....	75
3.2.5	Weitere CMLs .....	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>6. Abstract .....</b>	<b>89</b>
<b>7. Abkürzungen.....</b>	<b>90</b>
<b>8. Literatur .....</b>	<b>91</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>98</b>

# 1. Einleitung

Pflanzen sind nicht in der Lage sich fortzubewegen, daher ist es für sie von großer Bedeutung, adäquat auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren zu können. Um dies zu ermöglichen, brauchen sie ein ausgefeiltes Signalnetzwerk in ihren Zellen, das äußere Reize in zelluläre Signale umwandelt. Bei der Signaltransduktion bindet in den meisten Fällen ein primärer Botenstoff an einen Rezeptor und aktiviert diesen. Dadurch wird im Inneren der Zelle ein Signal generiert, das zum Beispiel dadurch entsteht, dass in der Zelle die Konzentration eines sekundären Botenstoffes ansteigt. Bei Pflanzen handelt es sich bei diesen sekundären Botenstoffen meistens um zyklisches AMP (Adenosinmonophosphat) oder um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieses zelluläre Signal muss eine Zellantwort auslösen. Hierzu ist es notwendig, dass der sekundäre Botenstoff zelluläre Prozesse auslöst, wie zum Beispiel die Aktivierung von entsprechenden Enzymen. Handelt es sich bei dem sekundären Botenstoff um  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, so wird dieses Signal meistens von Calmodulin aufgenommen, dem wichtigsten Kalzium bindenden Protein in der Pflanzenzelle (Raven, Evert et al. 2006).

## 1.1 Kalziumsignale in der Zelle

Kalzium zählt zu den wichtigsten sekundären Botenstoffen in Pflanzenzellen. In hohen Konzentrationen ist Kalzium giftig für den Energiehaushalt der Zellen. Um diese toxische Wirkung zu verhindern, werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiv aus dem Zytosol in Kalziumspeicher wie das Endoplasmatische Reticulum (ER) und die Vakuole gepumpt und dadurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Konzentration im Zytosol niedrig gehalten ( $\sim 100\text{-}200\text{ nM}$ ) (McCormack and Braam 2003, DeFalco, Bender et al. 2010). Durch den großen Konzentrationsunterschied von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zwischen dem Zytosol und den Kalziumspeichern der Zelle (annähernd 10000 fache), können durch Kalziumkanäle in den Membranen schnelle Änderungen der Kalziumkonzentration im Zytosol ausgelöst werden (Stael, Wurzinger et al. 2012).

Diese Kalziumsignale können durch die unterschiedlichsten Stimuli ausgelöst werden, wie zum Beispiel rotes Licht, Berührung, Kälte, Hitze und oxidativer Stress. Einige dieser Reize bewirken eine schnelle Depolarisation von Membranen. Diese Depolarisation bewirkt, dass spannungsabhängige, kalziumpermeable Ionenkanäle geöffnet werden, und so ein Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen zum Beispiel ins Zytosol stattfindet. Allerdings gibt es wahrscheinlich nicht nur spannungsabhängige Kalziumkanäle, sondern auch Kanäle, die durch andere Faktoren wie

anorganische und organische Nährstoffe gesteuert werden. So wird es möglich, dass diverse Reize ein Kalziumsignal auslösen (Sanders, Brownlee et al. 1999).

Zusätzlich zu Kalziumkanälen gibt es auch noch den aktiven Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen. Hierbei werden die Ionen aktiv zum Beispiel durch  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporter und P-Type ATPasen aus dem Zytosol transportiert. Das heißt, es gibt einen Kalziuminflux und einen Kalziumefflux (Sanders, Brownlee et al. 1999). Durch dieses Zusammenspiel ist es möglich, eine für jeden Reiz spezifische Kalziumsignatur zu erzeugen. Da nämlich so viele verschiedene Reize ein Signal auslösen, stellt sich die Frage, wie Kalziumsignale dann so unterschiedliche Reaktionen der Zelle hervorrufen können. Die Kalziumsignatur-Hypothese versucht diese Frage zu beantworten. Abhängig vom Reiz werden Kalziumsignale generiert, die sich in ihrer Dauer, Frequenz, Amplitude und ihrer räumlichen Verteilung unterscheiden. Nach der Kalziumsignatur-Hypothese erzeugt also jeder Reiz eine einzigartige Kalziumsignatur und so wird es möglich, dass ein so häufig vorkommendes Signal reizspezifische Zellantworten auslöst (Webb 1996, Kudla, Batistič et al. 2010).

Kalziumsignale treten nicht nur im Zytosol auf, sondern es gibt auch Hinweise für Kalziumsignale im Kern, in Chloroplasten, in Mitochondrien und in Peroxisomen. So konnten in Mitochondrien Kalziumsignale gemessen werden, die durch verschiedene Reize ausgelöst wurden. Die Kalziumsignale, die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und durch Berührungen ausgelöst wurden, unterscheiden sich von den zytosolischen Signalen (Logan and Knight 2003). Das zeigt, dass es sich um ein aktiv ausgelöstes Signal handelt. Auch sind einige Vorgänge in Mitochondrien bekannt, die durch Kalziumsignale oder durch Proteine, die Kalziumsignale decodieren, reguliert sind. So wird zum Beispiel der Import von Proteinen in Mitochondrien durch Kalzium und Calmodulin (CaM), ein Kalzium-bindendes Protein, welches an der Weiterverarbeitung von Kalziumsignalen beteiligt ist, reguliert (Kuhn, Bussemer et al. 2009). Auch die Verbindung zwischen Glykolyse und Zitronensäurezyklus scheint bei Pflanzen durch Kalzium reguliert zu sein. Die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase, ein Enzym, welches an der Umwandlung von Pyruvat in Acetyl CoA beteiligt ist, wird durch den Einsatz von CaM Inhibitoren gehemmt (Miernyk, Fang et al. 1987). Ein weiteres Protein in den Mitochondrien, das in der Lage ist CaM zu binden, ist die  $\text{AAA}^+$ -ATPase AFG1L1. Dieses Protein wurde sowohl in Mitochondrien, sowie auch in Chloroplasten lokalisiert (Bussemer, Chigri et al. 2009).



Auch in den Chloroplasten gibt es einige bekannte Prozesse, die durch Kalzium beeinflusst werden. So kann zum Beispiel die CO<sub>2</sub> Fixierung durch die Photosynthese durch Kalzium gestoppt werden. Da die Kalziumkonzentration in den Chloroplasten während des Tages variiert, wäre es möglich, dass die Photosynthese durch die Kalziumkonzentration reguliert wird (Stael, Wurzinger et al. 2012). Der Vesikeltransport in den Chloroplasten, der an der Thylakoidmembran Biogenese beteiligt zu sein scheint, kann durch CaM Inhibitoren oder die Entfernung von Kalzium gehemmt werden (Westphal, Soll et al. 2001) und auch der Import von Kern-codierten Proteinen in die Chloroplasten scheint durch Kalzium/CaM reguliert zu sein (Chigri, Soll et al. 2005, Chigri, Hörmann et al. 2006). Obwohl es noch viele Proteine in den Chloroplasten gibt, die in der Lage sind CaM zu binden und somit an der Weiterverarbeitung von Kalziumsignalen beteiligt sind, wurde bis heute kein CaM im Chloroplasten nachgewiesen (Stael, Wurzinger et al. 2012).

Zu Kalziumsignalen in den Peroxisomen gibt es kaum Informationen. Allerdings verbessert ein Anstieg der Kalziumkonzentration in den Peroxisomen die Entgiftung der reaktiven Sauerstoffspezies H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Katalase Isoform 3 (AtCAT3). Diese Katalase kann *in vitro* durch CaM stimuliert werden (Yang and Poovaiah 2002, Stael, Wurzinger et al. 2012).

Das letzte Kompartiment in der Zelle, bei dem bekannt ist, dass autonome Kalziumsignale generiert werden, ist der Kern. So wird zum Beispiel die Genexpression stressabhängig durch Kalziumsignale reguliert. Dies wird unter anderem dadurch möglich, dass viele Transkriptionsfaktoren durch Kalzium/CaM reguliert werden (Mazars, Brière et al. 2011, Reddy, Ali et al. 2011).

So wird deutlich, dass Kalziumsignale in der Zelle weit verbreitet sind. Diese Signale müssen nach ihrer Entstehung von der Zelle aber weiterverarbeitet werden, um so anschließende Vorgänge zu regulieren.

## 1.2 Calmoduline und Calmodulin-ähnliche Proteine

Wird in einer Zelle aufgrund eines äußeren Einflusses ein Kalziumsignal ausgelöst, muss dieses Signal durch Sensorproteine erfasst und in eine zelluläre Antwort umgewandelt werden. Für diesen Zweck gibt es in pflanzlichen Zellen eine Reihe von Kalzium-bindenden Proteinen. Die drei häufigsten Kalzium-bindenden Proteine in Pflanzen sind Kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs), Calcineurin B-ähnliche Proteine (CBLs) und Calmodulin

(CaM). Alle diese Proteine sind in der Lage, Kalzium über das hochkonservierte EF-Hand Motiv zu binden (DeFalco, Bender et al. 2010). Das EF-Hand Motiv besteht aus einem Helix-Loop-Helix Motiv, wobei der 12 Aminosäure lange Loop ein Kalzium-Ion binden kann. Durch diese Bindung ändert sich in den meisten Fällen die Konformation des Kalzium-bindenden Proteins und ermöglicht so, dass dieses Protein nun mit weiteren Zielproteinen interagieren kann. (Clapham 2007, DeFalco, Bender et al. 2010, Poovaiah, Du et al. 2013). Calmodulin und Calmodulin-ähnliche Proteine (CMLs) bestehen vorwiegend aus EF-Hand Motiven und weisen keine weiteren funktionalen Domänen auf. Das heißt, im Gegensatz zu den CDPKs und den CBLs, weisen weder CaMs noch CMLs eine intrinsische Aktivität auf (McCormack and Braam 2003, Reddy, Ben-Hur et al. 2011)

Bei CaM handelt es sich um ein allgegenwärtiges, kleines (ca. 150 Aminosäuren), saures Protein. Dieses ist sehr stark konserviert. So ist das menschliche CaM mit den CaMs aus *Arabidopsis* zu ungefähr 89 % identisch (Clapham 2007, DeFalco, Bender et al. 2010). CaM besteht aus zwei globulären Strukturen, die durch eine flexible, helikale Verbindungsregion verbunden sind. Die zwei globulären Strukturen weisen jeweils zwei EF-Hand Motive auf. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung durch diese EF-Hand Motive führt zu einer Konformationsänderung im Protein und bewirkt, dass hydrophobe Strukturen zugänglich werden. Diese wiederum ermöglichen dann eine Interaktion mit nachgeschalteten Zielproteinen (Perochon, Aldon et al. 2011, Reddy, Ben-Hur et al. 2011). Nach McCormack and Braam (2003) gibt es in *Arabidopsis* sechs typische CaMs, wobei diese nur für drei verschiedene Isoformen codieren. AtCaM2, 3 und 5 codieren identische Genprodukte. Von diesen unterscheidet sich AtCaM7 nur in einer Aminosäure. Bei AtCaM1 und AtCaM4 handelt es sich wiederum um identische Genprodukte, die sich nur in vier Aminosäuren von AtCaM7 unterscheiden.

Des Weiteren finden sich in *Arabidopsis* ungefähr 50 CMLs. Bei den CMLs handelt es sich um Calmodulin-ähnliche Proteine, wobei die meisten höchstens 50 % identisch mit den CaMs sind. Auch diese Proteine bestehen vorwiegend aus EF-Hand Motiven und weisen mindestens 16 % identische Aminosäuren mit den klassischen CaMs auf. Sie sind zwischen 83 und 330 Aminosäuren lang und die meisten der 50 CMLs haben 4 EF-Hand Motive. Zusätzlich zu Sequenzunterschieden, die sich über das ganze Protein erstrecken, haben einige dieser CMLs signifikante Sequenzunterschiede in den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Regionen (McCormack and Braam 2003, Perochon, Aldon et al. 2011). Diese Unterschiede könnten die Bindekapazität für  $\text{Ca}^{2+}$  verringern, aber im Gegenzug möglicherweise die Affinität für andere zweiwertige Ionen, wie  $\text{Mg}^{2+}$ , erhöhen (McCormack, Tsai et al. 2005).

Die große Anzahl der CaMs und CMLs in *Arabidopsis* lässt darauf schließen, dass diese Proteine an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt sind und überall in der Zelle vorkommen werden. CaM ist zwar ein zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor, ist aber auch im Kern lokalisiert. CaM53 aus *Petunia* scheint durch post-translationale Prenylierung an die Plasmamembran gebunden oder je nach Prenylierungsstatus im Zellkern lokalisiert zu sein. AtCML13 konnte in Plasmamembranfraktionen nachgewiesen werden und AtCML18 ist in der Vakuole lokalisiert (Rodriguez-Concepcion, Yalovsky et al. 1999, DeFalco, Bender et al. 2010). Auch in Peroxisomen wurde CaM gefunden (Yang and Poovaiah 2002). Einige CMLs könnten durch Modifikationen mit Fettsäuren an Membranen gebunden sein (McCormack and Braam 2003) und andere wiederum scheinen Signale zum Import in Zellorganelle aufzuweisen (Reumann, Ma et al. 2004, Chigri, Soll et al. 2005). Es ist also so, dass CaMs und CMLs schon in bestimmten Zellbestandteilen nachgewiesen wurden, aber in Anbetracht der Tatsache, dass es 50 CMLs und sechs CaMs in *Arabidopsis* gibt, zeigen diese Ergebnisse, dass noch großer Forschungsbedarf besteht.

Ähnlich sieht es bei der Entdeckung der zellulären Prozesse, an welchen CaM bzw. CMLs beteiligt sind, aus. So konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass sowohl der Proteinimport in Chloroplasten, wie auch in Mitochondrien, durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM reguliert wird (Chigri, Soll et al. 2005, Chigri 2006, Kuhn, Bussemer et al. 2009). AtCaM2 scheint an der Keimung beteiligt zu sein (Landoni, Francesco et al. 2010), AtCML42 ist an der Entwicklung der Trichome beteiligt (Dobney, Chiasson et al. 2009), AtCML23 und AtCML24 inhibieren die Expression eines Repressors, der am Blühen beteiligt ist (Tsai, Delk et al. 2007), und AtCML19 spielt eine Rolle bei der Reparatur von Zellschäden, die durch UV-Strahlen ausgelöst wurden (Perochon, Aldon et al. 2011). Weiterhin ist AtCaM7 an der Photomorphogenese beteiligt (Kushwaha, Singh et al. 2008) und AtCML9 Knock-out Mutanten zeigen eine erhöhte Toleranz bei Trockenheit und Salzstress (Magnan, Ranty et al. 2008). Dies sind einige Beispiele für Mechanismen, die durch CaMs und CMLs beeinflusst werden, aber die Liste der Proteine, die mit CaMs und CMLs interagieren, ist lang: Metabolische Enzyme, Phosphatasen, Kinasen, Transkriptionsfaktoren, Kanäle, Poren und viele weitere Proteine mit unbekannter Funktion (Perochon, Aldon et al. 2011). Durch diese Beispiele wird deutlich, dass CaMs und CMLs überall in der Zelle an Prozessen beteiligt sind und dass nur ein geringer Anteil dieser inzwischen erforscht ist.

### 1.3 Das Endomembransystem

Einen großen Teil der Zelle nimmt das Endomembransystem ein. Dieses besteht bei Pflanzen aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), dem Golgi-Apparat, den Endosomen, der Plasmamembran (PM), den vakuolären Kompartimenten und allen am Transport beteiligten Vesikeln (Palade 1975).

Proteine, die in das Endomembransystem der Zelle eintreten, werden am ER synthetisiert oder posttranslational in dieses transportiert. Es handelt sich bei dem ER um ein Membransystem, das sich von der Kernhülle bis über die Zellgrenzen hinaus (über Plasmodesmata) erstreckt. Hierdurch wird bei Pflanzen ein interzellulärer Stoffaustausch ermöglicht (Haywood, Kragler et al. 2002). Die zwei Hauptaufgaben des ER sind die Synthese von Proteinen und Lipiden (vor allem transmembrane Proteine und Lipide für das ER, den Golgi Apparat, die Endosomen, Lysosomen, sekretorische Vesikel und die Plasmamembran) und die Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenpumpen entfernen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zytosol und transportieren die Ionen ins ER Lumen. So wird es ermöglicht, dass kurzzeitig  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Zytosol entlassen werden und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale entstehen (Alberts, Johnson et al. 2007).

Das ER unterteilt sich in glattes, raues und transitorisches ER und die Kernhülle. Das glatte ER ist vorwiegend für die Lipidsynthese zuständig (Staehelin 1997). Das transitorische ER sind Regionen des glatten ER, an denen sich, mit neu synthetisierten Proteinen und Lipiden gefüllte Transportvesikel, abschnüren, und zum Golgi-Apparat wandern. Die Kernhülle trennt das Nukleoplasma vom Zytosol und so ist ein Austausch mit dem Kern nur über sogenannte Kernporen möglich. Das raue ER ist der Ort, an dem Proteine kotranslational ins ER Lumen gelangen. Hierfür ist es mit Ribosomen besetzt, was diesen Prozess ermöglicht.

Proteine, die ins ER transloziert werden sollen, zeichnen sich durch eine N-terminale ER Signal Sequenz aus, die durch freie Ribosomen im Zytosol gebildet wird. Diese Signal-Sequenz wird durch das sogenannte SRP (signal-recognition particle) erkannt. SRP bindet an die Signal-Sequenz des gerade translatierten Proteins und das daran gebundene Ribosom. Anschließend wird der Komplex aus SRP, Ribosom und Protein an den SRP-Rezeptor, der an der Membran liegt, transportiert. Dann zerfällt der SRP-SRP Rezeptor Komplex und die Translation des Proteins wird durch das sogenannte Translokton in das ER Lumen fortgesetzt. Durch Signalpeptidasen wird das Signalpeptid abgespalten und das Protein befindet sich im ER Lumen. Transmembranproteine werden direkt in die ER Membran transloziert (mit einer

oder mehreren Transmembrandomänen oder einem GPI Anker (Glykosylphosphatidylinositol Anker) und weitertransportiert. Im ER werden die Proteine korrekt gefaltet und modifiziert, wobei an der korrekten Faltung die sogenannten Chaperone beteiligt sind. Eine im ER stattfindende Modifikation ist die N-Glykosilierung, die auch zur korrekten Faltung beiträgt und an der „Qualitätskontrolle“ der Proteine beteiligt ist. Nur korrekt gefaltete Proteine werden weitertransportiert, wohingegen inkorrekt gefaltete wieder ins Zytosol entlassen und dort abgebaut werden.

Am ER werden die zu transportierenden Proteine in COP II-Vesikel verpackt. Bei COP II handelt es sich um das Mantelprotein, welches sich auf der Außenseite der Vesikel befindet. Nach dem Abschnüren der Vesikel verlieren diese ihre COP II-Hülle, beginnen untereinander zu fusionieren und bilden vesikuläre, tubuläre Cluster. Anschließend wandern diese an Mikrotubuli zur cis-Seite des Golgi-Apparats und fusionieren mit diesem (Alberts, Johnson et al. 2007). Beim Golgi-Apparat handelt es sich um die Gesamtheit der Dictyosomen (Golgi-Körper). Diese sind Stapel membranumschlossener, scheibenförmiger Zisternen, die einen polaren Aufbau haben. Die dem ER zugewandte Seite ist die cis-Seite, die dem ER abgewandte ist die trans-Seite. Dazwischen liegen die mittleren Zisternen. Wie oben schon erwähnt kommen an der cis-Seite Transitvesikel aus dem ER am Golgi-Apparat an, wohingegen sich an der trans-Seite Vesikel abschnüren und weitertransportiert werden (Raven, Evert et al. 2006). An die trans-Seite des Golgi-Apparats schließt sich das trans-Golgi Netzwerk (TGN) an, welches aufgrund seiner Funktion den endosomalen Kompartimenten zugeordnet werden kann (Nebenführ and Staehelin 2001, Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. 2006).

Die Sortierung von Proteinen zu den verschiedenen Kompartimenten des Endomembransystems oder zur Oberfläche der Zelle (Sekretion) zählt neben der Synthese von nichtcellulosischen Zellwandpolysacchariden und der Weiterverarbeitung von Glykoproteinen zu den Hauptaufgaben des Golgi-Apparats.

Neben dem ER und dem Golgi-Apparat, gehören unter anderem noch die endosomalen Kompartimente zum Endomembransystem. Diese lassen sich in verschiedene Arten von Endosomen unterteilen. Es gibt die Recycling-Endosomen (REs), die frühen Endosomen (early endosomes, EEs) und die späten Endosomen (late endosomes, LEs). Die REs sind für die Sortierung und das Recycling von Proteinen zuständig. Bei den EEs und dem TGN handelt es sich um Subdomänen desselben Kompartiments. Dieses fungiert als Schnittstelle

des sekretorischen und des endozytotischen Wegs, da das TGN/EEs für die Sortierung von neu synthetisiertem und endozytiertem Material zuständig ist. Bei endozytiertem Material handelt es sich um Material, welches von außerhalb ins Innere der Zelle aufgenommen wird. Dieses Material wird entweder dem Recyclingweg zugeführt, zur PM transportiert oder wird durch die LEs in die Vakuolen überführt. Die LEs erkennen und nehmen Proteine, die zum Abbau bestimmt sind, auf und transportieren diese zu den Lysosomen bzw. den Vakuolen. Deswegen werden die LEs auch als prävakuoläres Kompartiment (PVC) bezeichnet (Robinson, Jiang et al. 2008). Bei Pflanzen handelt es sich hierbei um ein multivesikuläres Kompartiment (Tse, Mo et al. 2004). Die sogenannten multivesikulären Körperchen (multivesicular bodies, MVBs) entstehen dadurch, dass sich nach innen interne Vesikel (intraluminal vesicles, ILVs) abschnüren. Dadurch wird es möglich, dass Membranproteine, die zum Abbau bestimmt sind, in die Lysosomen/Vakuolen transportiert werden. Sie befinden sich in der Membran der nach innen abgeschnürten Vesikel und fusionieren die MVBs nun mit den Lysosomen/Vakuolen, dann werden die internen Vesikel in das Lumen der Vakuole entlassen und können abgebaut werden (Otegui and Spitzer 2008). LEs/MVBs entstehen durch Reifung aus den EEs/TGN (Scheuring, Viotti et al. 2011).

Bei dem vakuolären Kompartiment der Pflanzen handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte Vesikel, die Vakuolen genannt werden. Diese sind den tierischen Lysosomen sehr ähnlich. Sie enthalten, wie diese, hydrolytische Enzyme und sind am Abbau von Proteinen beteiligt. Allerdings haben Vakuolen weitere Aufgaben. Sie fungieren als Speicherort für Nährstoffe und Abfallprodukte, sind an der Zellgröße beteiligt und kontrollieren den sogenannten Turgordruck (Innendruck der Pflanzenzelle). Eine Pflanzenzelle kann mehrere Vakuolen mit unterschiedlichen Aufgaben haben (Alberts, Johnson et al. 2007).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neue Komponenten der Signaltransduktion in pflanzlichen Organellen zu identifizieren. Von besonderem Interesse waren hierbei Calmodulin-ähnliche Proteine (CML), die an der Weiterverarbeitung von Kalziumsignalen beteiligt sind. Eine Reihe solcher CMLs sollten auf ihre sub-zelluläre Lokalisierung hin untersucht werden, um zu überprüfen, ob einige von ihnen in Zellkompartimenten wie dem Endomembransystem zu finden sind. Hierfür wurden Fusionsproteine der CMLs mit YFP erstellt und transient in Mesophyllzellen von *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Anschließend wurde die

Lokalisierung der YPF Fusionsproteine anhand der Fluoreszenzsignale in den Zellen bestimmt. Nach Identifizierung möglicher Kandidaten sollte deren Lokalisierung dann durch weitere zellbiologische und biochemische Untersuchungen bestätigt und die Funktion der Proteine für die pflanzliche Signaltransduktion geklärt werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Alle Chemikalien wurden in höchstmöglicher Qualität von namenhaften Herstellern bezogen. Spezielle Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Complete Protease Inhibitor Cocktail von Roche (Mannheim, Deutschland), Mitotracker® CMX Ros und Brefeldin A von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland), die Quervernetzungsreagenzien EDC (1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid) und S-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) von Thermo Scientific (Rockford, IL USA)

#### **2.1.2 Enzyme und Kits**

Die, für die Klonierungen verwendeten Restriktionsenzyme und DNA-Polymerasen, wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland) und New England Biolabs (Boston, USA) bezogen. Für die Isolation von DNA aus *E.coli*-Zellen wurde das Nucleobond AX Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Nucleospin Extract II Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Die Isolation von RNA aus Pflanzen erfolgte mit dem Maxwell®16 System und dem Tissue LEV Total RNA Purification Kit von Promega (Mannheim, Deutschland). Die Synthese von cDNA erfolgte mit M-MLV reverse Transkriptase von Promega.

#### **2.1.3 Bakterienstämme und Saatgut**

Zur Vervielfältigung von DNA wurden die *E.coli* Stämme XL10-Gold von Stratagene (La Jolla, USA) und DH5alpha verwendet. Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden *E. coli*-Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL von Stratagene verwendet. Für die transiente Transformation von *N. benthamiana* wurden Agrobakterien des Stammes LBA 1334 verwendet.

Die verwendete T-DNA Insertionslinie GABI-Kat 703E02 wurde über GABI-Kat (Bielefeld, Deutschland) bezogen. Bei der stabilen Pflanzenlinie handelt es sich um GK-061E12.13, die



mit CML5-YFP unter Kontrolle eines Ubi10-Promotors stabil transformiert wurden (bereitgestellt von Claudia Sippel, AG Vothknecht).

#### 2.1.4 Vektoren

pET21b, pET21d von Stratagene (La Jolla, USA)

pBIN19 AN YFP bereitgestellt von Dr. Norbert Mehlmer (Mehlmer, Parvin et al. 2012)

pURT bereitgestellt von Prof. Dr. Schumacher (Scheuring, Viotti et al. 2011)

pGEX4T-3 von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

pOL-LP (C-terminaler GFP-Anhang) bereitgestellt von Dr. J. Meurer (Mollier, Hoffmann et al. 2002)

#### 2.1.5 Verwendete Konstrukte und Primer

**Tabelle 1:** Liste der in dieser Arbeit verwendete Konstrukte. AS: Aminosäure, VL: Volllängeprotein; für die Klonierung wurde CDS (codierende DNS Sequenz) verwendet, bp: Basenpaare, nicht mit \* gekennzeichnete Konstrukte bereitgestellt von AG Vothknecht oder vermerkttem Donor

Bezeichnung	Vektor	Verwendung	Beschreibung	Verwendete Restriktions-schnittstellen (oder Donor)	Selektions-marker
CML5-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL CML5, bzw At2g43290 1-645 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
CML5 <sub>1-29</sub> -YFP*	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	AS 1-29 von CML5 1-87 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
CML5 <sub>Δ1-27</sub> -YFP*	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	CML5 ab 28. AS bis C-terminus 82-645 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
CML5 pOL	pPOL-LP	Expression in <i>A. thaliana</i> Protoplasten	VL CML5 1-645 bp	KpnI, SpeI	Ampicillin
CML5 <sub>Δ1-27</sub> -His*	pET21b	Expression in <i>E. coli</i>	CML5 ab 28 AS bis C-terminus 82-645 bp	NdeI, XhoI	Ampicillin
PATL1-GST	pGEX4T-3	Expression in <i>E. coli</i>	VL At1g72150 1-1719 bp	BamHI, NotI	Ampicillin
Ara6-mRFP	pURT	Expression in <i>A. thaliana</i>	VL At3g54840.1	AG Schumacher,	Spectinomycin

		Protoplasten		Heiderlberg	
Ara6-mCherry*	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At3g54840.1 1-606 bp	Apal, NotI	Kanamycin
GmMan1-mCherry	pBIN	Expression in <i>N. benthamiana</i>		(Nelson, Cai et al. 2007)	
CML3-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL CML3 bzw. At3g07490 1-459 bp	Apal, NotI	Kanamycin
YFP-CML3 <sub>ΔSNL</sub>	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	CML3 ohne AS SNL am C-terminus 1-450 bp	Apal, NotI	Kanamycin
YFP-SNL	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	AS SNL	Apal, NotI	Kanamycin
mCherry-SKL	pBIN	Expression in <i>N. benthamiana</i>		(Nelson, Cai et al. 2007)	
CML4-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL CML4 bzw. At3g59440 1-585 bp	Apal, NotI	Kanamycin
CML30-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL CML30 bzw. At2g15680 1-561 bp	Apal, NotI	Kanamycin
CML30 <sub>ΔM2/M3</sub> -YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL CML30 Methionin 2 und 3 ausgetauscht gegen Isoleucin	Apal, NotI	Kanamycin
CML30 <sub>Δ1-24</sub> -YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	CML30 ab AS 25 bis C-terminus 73-561 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At1g73440-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At1g73440 1-762 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At2g36180-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At2g36180 1-432 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At2g41110-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At2g41110.1 1-447 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At1g66410-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At1g66410.1 1-447 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At1g05990-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At1g05990.1 1-450 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At2g41090-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At2g41090.1 1-573 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At1g18530-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At1g18530 1-471 bp	Apal, NotI	Kanamycin
At1g32250-	pBIN19 AN	Expression in	VL At1g32250	Apal, NotI	Kanamycin

YFP	YFP	<i>N. benthamiana</i>	1-498 bp		
At4g37010-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At4g37010.1? 1-501 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
At3g50360-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At3g50360 1-507 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
At1g66400-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At1g66400 1-471 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
At5g17470-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At5g17470 1-438 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
At3g10190-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	VL At3g10190 1-627 bp	ApaI, NotI	Kanamycin
OEP7-YFP	pBIN19 AN YFP	Expression in <i>N. benthamiana</i>	(Mehlmer, Parvin et al. 2012)	ApaI, NotI	Kanamycin

**Tabelle 2: Verwendete Primer.** Bei Klonierungsprimern sind die verwendeten Schnittstellen angegeben. Fw: Vorwärtsprimer, rv: Rückwärtsprimer, AS: Aminosäure

Oligoname	Sequenz (5' -> 3')
CML5 <sub>AS1-29</sub> NotI rv	AATGCGGCCCGCCAAGAGGGAAAAGAGTTCCG
CML5 <sub>Δ1-27</sub> ApaI fw	ATGGGCCCATGCCTCTTTCTTGGTTTCGAC
CML5 ApaI fw	CAGGGCCCATGGTGAGAATATTCCTTCTC
CML5 NotI rv	TTAGCGGCCCGCCATTACTGCTGCTAAAG
CML5 <sub>Δ1-27</sub> NdeI fw	CATCATATGCCTCTTTCTTGGTTTCGACAAAAC
CML5 XhoI rv	TGTGCTCGAGATTACTGCTGCTAAAGCCACC
ARA6ApaI fw	TGGGCCCATGGGATGTGCTTCTTCTCTTC
ARA6NotI rv	AATGCGGCCCGCCTGACGAAGGAGCAGGACG
08409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
CML5 3UTR	GGAAAAACAAGAAAAACAAACCAA
CML5mRNA fw	GGGCCATGGTGAGAATATTCCTTC
CML5mRNA rv	TGTGCTCGAGTCAATTACTGCTGCTAAAG
HSP70 fw	GTTCTAAGGAACTTGTGGATGATG

HSP70 rv	CTCATATTTGTCTGAGTCAGTGAAG
----------	---------------------------

### 2.1.6 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial

Die Nitrozellulose-Membranen (Protran BA 83; 0.2  $\mu\text{m}$ ) wurden von Schleicher und Schüll (Dassel, Deutschland), PVDF-Membranen (Polyvinylfluorid; Hybond-PVDF) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) und Blotpapier von Macherey-Nagel bezogen. Für die Größenbestimmung der Proteine in der SDS-PAGE wurde der „Low Molecular Weight“-Marker von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und der „Page Ruler Plus prestained Protein ladder“ von New England Biolabs verwendet. Um die Größe von DNA Fragmenten in den Agarosegelen zu bestimmen, wurde  $\lambda$ -Phagen DNA von Fermentas mit EcoRI und HindIII verdaut. YFP getagte Proteine wurden mit der GFP-Trap A von Chromotek (Martinsried, Deutschland) aufgereinigt. Calmodulin-ähnliche Proteine wurden über Phenylsepharose CL-4B von Sigma-Aldrich, Proteine mit GST-Tag wurden über Glutathion-Sepharose 4B von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) aufgereinigt. Kopplung und Anbindungsversuche wurden mit der CNBr-aktivierten Sepharose 4B von GE Healthcare durchgeführt. Kalziumabhängige Anbindungsversuche an Calmodulin wurden mit Calmodulin-Agarose von Sigma-Aldrich durchgeführt.

### 2.1.7 Antiseren

Der primäre monoklonale Antikörper  $\alpha$ -GFP 3H9 stammt von Chromotek (Martinsried, Deutschland), der primäre Antikörper  $\alpha$ -AEQ stammt von Abcam (Cambridge, UK). Der sekundäre Antikörper Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG+IgM stammte von Jackson ImmunoResearch (PA, USA). Die polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -Arf1 und  $\alpha$ -SMT1 stammten von Agrisera (Vännäs, Schweden). Hierfür wurde ein sekundärer Antikörper gegen Kaninchen mit Meerrettich-Peroxidase (HRP-Konjugat) von Sigma-Aldrich verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Die für diese Arbeit angewendeten, allgemeinen, molekularbiologischen Methoden, wie die Anzucht von Bakterienkulturen, die Extraktion von DNA durch alkalische Lyse und die Bestimmung der Konzentration der isolierten DNA wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Die Herstellung von chemisch-kompetenten *E.coli*-Zellen erfolgte nach Hanahan (1983). Die *E.coli* Zellen wurden mit Plasmiden nach Pope und Kent (1996) transformiert. Elektrokompetente *A. tumefaciens* wurden hergestellt und transformiert nach der Anleitung aus dem „Micropulser™ Electroporation Apparatus Operation Instructions and Application Guide“ von Bio-Rad.

Für Klonierungen, Restriktionsverdau, Aufreinigung von PCR-Produkten oder Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen, wurden die Herstellerangaben der verwendeten Enzyme und Kits beachtet.

#### **2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie**

Um DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewandt. Sie wurde nach Sambrook und Russel (2001) und nach Angabe der Enzymhersteller durchgeführt. Zu Beginn wurde ein 2minütiger Denaturierungsschritt bei 96°C durchgeführt. Anschließend wurde ein sich 25 bis 30mal wiederholender Zyklus begonnen. Dieser startete mit einem Denaturierungsschritt bei 96°C für 15 Sekunden. Anschließend folgte ein Hybridisierungsschritt für 30 Sekunden bei einer Temperatur, die 5°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide lag. Abgeschlossen wurden die Zyklen mit einem Elongationsschritt für 1 Minute. Nach den Zyklen wurde noch ein finaler Elongationsschritt für 7 Minuten durchgeführt. Als Template wurde cDNA aus *A. thaliana* verwendet, die wie unter 2.2.1.4, beschrieben, hergestellt wurde. Für die Klonierungen wurden PCR-Produkte mit den für die Klonierungen verwendeten Restriktionsschnittstellen hergestellt. In Tabelle 2 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Das entstandene PCR-Produkt wurde mit dem Nucleospin Extract II Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Anschließend wurde das PCR-Produkt und der Zielvektor mit den entsprechenden

Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben inkubiert. Zur Isolation der benötigten Fragmente wurde eine Agarosegelelextraktion mit dem Nucleospin Extract II Kit durchgeführt. Danach wurden Vektor und PCR-Produkt im molaren Verhältnis 1:4 in einem Ligationsansatz eingesetzt. Dieser wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hiervon wurden 10 µl in *E. coli* Zellen transformiert. Anschließend wurden die entstandenen Klone mittels Sequenzierung durch den Sequencing Service der Fakultät für Biologie (LMU München, [http://www.gi.bio.lmu.de/sequencing/index\\_html](http://www.gi.bio.lmu.de/sequencing/index_html)) auf ihre Richtigkeit überprüft. Alle verwendeten Konstrukte sind unter 2.1.5 aufgelistet.

### **2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana***

Um genomische DNA aus *A. thaliana* zu isolieren und so die verwendeten Pflanzen genotypisieren zu können, wurde jeweils ein Blatt mit 410 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,5 % SDS) versetzt. Anschließend wurde das Blatt in der Kugelmühle TissueLyser II (Quiagen, hergestellt von Retsch) zerkleinert und dann für 10 Minuten bei 17000 g zentrifugiert. Danach wurden 300 µl des Überstandes mit 300 µl Isopropanol versetzt und gut gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten bei 17000 g wurde der Überstand verworfen und das DNA Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.1.4 Isolierung von RNA aus *A. thaliana* und Herstellung von cDNA**

Für die Isolierung von RNA aus *A. thaliana* wurden 50 -100 µg Pflanzenmaterial in 2 ml Reaktionsgefäßen mit jeweils einem 5 mm „Stainless Steel Beat“ (Qiagen) in flüssigen N<sub>2</sub> eingefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial für 1 min in der Kugelmühle TissueLyser II (Quiagen, hergestellt von Retsch) zerkleinert und dann mit 700 µl RNA-Lysepuffer aus dem Total RNA Kit (Promega) versetzt und für weitere 2 min in der Kugelmühle homogenisiert. Um die nicht löslichen Bestandteile zu entfernen, wurde der Ansatz für 10 min bei 17000 g zentrifugiert. War der Ansatz klar, wurden 500 µl des Überstandes in eine RNA-Kartusche gegeben. War der Überstand noch trüb, wurde er in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl RNA Dilutionbuffer versetzt. Anschließend wurde wieder bei 17000 g für 10 min zentrifugiert. Dann wurde der, nun klare, Überstand in die RNA-Kartusche überführt. Die Extraktionskartusche und der Roboter wurden nach den Herstellerangaben von Promega vorbereitet und bedient. Zur Herstellung von cDNA wurde 1

µg gesamt RNA mit „Random Hexamer Primers“ nach Anleitung von Promega umgeschrieben.

## **2.2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden nach der Methode von Laemmli (1970) über SDS-Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE) mit 8%-12,5% Acrylamid aufgetrennt. Proben wurden vor dem Auftrag für 2 min bei 96°C erhitzt, nachdem sie mit SDS-Solubilisierungspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS und 0,01% (w/v) Bromphenol-Blau) versetzt wurden.

### **2.2.2.2 Coomassie- und Silberfärbung**

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15-20 min in einer Färbelösung (20% Isopropanol, 20% Essigsäure, 0,3% Coomassie R, 0,06% Coomassie G) gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit einer Entfärberlösung (40% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure, und 3% (v/v) Glycerin) entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

Die Silberfärbung wurde nach Blum *et al.* (1987) durchgeführt.

### **2.2.2.3 Western Blot und Immunodekoration**

Der Transfer von Proteinen, die zuvor über SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) erfolgte nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984). Die PVDF-Membran wurde zuvor nach Herstellerangabe aktiviert. Der Transfer wurde für eine Stunde bei 0,8 mA cm<sup>-2</sup> Gelfläche durchgeführt. Damit die Größenstandards nach dem Transfer auf der Membran sichtbar waren, wurde ein „Prestained Marker“ verwendet. Für die spezifische Identifizierung eines Antigens wurde die Membran für 30 min in 3% Magermilchpuffer (3% w/v) Magermilchpulver, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,01 % (v/v) Tween 20) abgesättigt und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen primären Antikörper (1:1000 verdünnt in 3% Magermilchpuffer) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde dann durch 3maliges Waschen für 10 min mit 3%

Magermilchpuffer entfernt. Anschließend wurde die Membran mit sekundärem Antikörper, der an Meerrettich-Peroxidase (HRP) (siehe 2.1.7) gekoppelt war und 1:10000 in Magermilchpuffer verdünnt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum überschüssiger Antikörper durch 3maliges Waschen für jeweils 10 min mit Magermilchpuffer entfernt. Das Entwickeln mit des HRP- gekoppelten sekundären Antikörper wurde mit dem „Enhanced chemiluminescence“ (ECL) – Kit von GE Healthcare nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.2.4 Affinitätschromatographien**

##### **Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose**

Die Aufreinigung von Calmodulin mittels Phenylsepharose erfolgte direkt aus Lysat von Bakterien, welche das Protein rekombinant exprimiert haben. Dazu wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 1 min bei 6000 g pelletiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 50 mM HEPES pH 8,0 resuspendiert und anschließend wurden die Zellen mittels einer „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen, wurde das Lysat für 30 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Danach wurde der Überstand auf eine Endkonzentration von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 100 mM NaCl adjustiert und mit 300  $\mu\text{l}$  Phenylsepharose versetzt, die zuvor nach Herstellerangaben gewaschen und mit Waschpuffer (50mM HEPES pH8,0 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 100mM NaCl) äquilibriert worden war. Zur Anbindung wurde das Säulenmaterial mit dem Bakterienlysats für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Anbindung wurde das Säulenmaterial auf Gravitationssäulchen gegeben und mit 25ml Waschpuffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen. Gebundene Proteine wurden durch Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer (50 mM HEPES pH 8,0, 5 mM EDTA/EGTA) eluiert. Dieser Schritt wurde 6x wiederholt. Die einzelnen Fraktionen der Chromatographie wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

##### **Affinitätschromatographie an GFP-Trap**

Für die Aufreinigung von GFP-gekoppelten Proteinen aus Pflanzenmaterial mittels der GFP-Trap wurde das Blattmaterial erst in flüssigen  $\text{N}_2$  und anschließend in GFP-Trap Puffer I (100 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, je 5 mM EDTA und EGTA, 0,1% Triton-X100, 10% Glycerin), mit complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche), gemörst.



Anschließend wurde das Homogenisat für 30 min bei 21000 g zentrifugiert und der Überstand danach durch Watte gefiltert, um verbliebene feste Bestandteile zu entfernen. Dann wurde zu dem Überstand GFP-Trap A Matrix (Chromotek) gegeben und für 2 Stunden bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Vor der Verwendung wurde die GFP-Trap Matrix nach Herstellerangaben 2mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und 3mal mit GFP-Trap Puffer I äquilibriert. Nach der Inkubationszeit wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation pelletiert und anschließend ca. 4mal mit GFP-Trap Puffer I gewaschen. Das gebundenes Protein wurde von der GFP-Trap durch Inkubation bei 96°C mit SDS-Solubilisierungspuffer eluiert und die Fraktionen der Chromatographie anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die Aufreinigung von GFP-getaggtten Proteinen aus *E.coli* Zellen wurden die Bakterienzellen nach der Überexpression durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 g pelletiert und anschließend in GFP-Trap Puffer II (10mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl und 0,5 mM EDTA) resuspendiert. Aufgeschlossen wurden die Zellen mittels einer „French Pressure Cell“ und anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation für 15 min bei 16000 g entfernt. Danach wurde das Lysat mit 50 µl GFP-Trap A Matrix (Chromotek) gemischt, die zuvor nach Herstellerangaben gewaschen und mit GFP-Trap Puffer II äquilibriert worden war. Nach einer Inkubation für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler wurde die Aufreinigung nach dem Protokoll für die Aufreinigung von Protein aus Pflanzenmaterial fortgesetzt (siehe oben).

### **Affinitätschromatographie an Glutathion Sepharose**

Für die Aufreinigung von Protein mit GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) wurden, wie bei den anderen Affinitätsaufreinigungen, nach der Überexpression die *E. coli* –Zellen bei 6000 g für 10 min bei 4°C pelletiert und das entstandene Pellet in GST-Puffer (50mM Tris pH 8, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, 5 mM EDTA, complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels einer „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Bevor durch Zentrifugation für 30 min bei 17000 g und 4°C die festen Zellbestandteile entfernt wurden, wurde dem Bakterienlysat Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% zugegeben und 3 min auf Eis inkubiert. Das Säulenmaterial wurde vor der Verwendung 3mal mit ddH<sub>2</sub>O und 3mal mit GST-Puffer nach Herstellerangaben gewaschen und äquilibriert. Dann wurde der Überstand in einem 50 ml Röhrchen mit 300 µl Glutathion Sepharose 4B Matrix (GE Healthcare) versetzt und für 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation für 5 min

bei 1000 g und 4°C gesammelt und mit 20 ml GST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 300 µl GST-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend 5mal mit 150 µl Elutionspuffer (50 mM Tris pH 8, 10 mM reduziertes Glutathion) durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g eluiert. Der Überstand wurde gesammelt (Eluat). Anschließend wurden alle Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert.

### **Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose**

Für die Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose wurden 65 mg eines Bakterienpellets aus einer 250 ml Kultur *E. coli* Zellen, die das zu testende Protein rekombinant exprimierten (siehe 2.2.3.1), in 2 ml Bindungspuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, , complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 3mal 20 sec sonifiziert und danach 20 min bei 9300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgeteilt und der eine Ansatz mit 5 mM EDTA/EGTA und der andere mit 100 µM CaCl<sub>2</sub> versetzt. Beide Ansätze wurden dann mit jeweils 60 µl Calmodulin-Agarose Matrix, die vorher 3mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit Bindungspuffer mit CaCl<sub>2</sub> bzw. EDTA/EGTA äquilibriert worden war, gemischt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden beide Versuchsansätze für 1 min bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Calmodulin-Agarose Matrix beider Ansätze wurde nun 5mal mit jeweils 500 µl Puffer gewaschen. Hierbei wurde der Bindungspuffer, jedoch ohne complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail, verwendet und für den Versuchsansatz, der die Bindung in Anwesenheit von Kalzium untersucht, mit 100 µM CaCl<sub>2</sub> und für den Versuchsansatz, der die Bindung in Abwesenheit von Kalzium untersucht, mit 5 mM EDTA/EGTA versetzt. Anschließend wurde bei beiden Versuchsansätzen 3mal mit jeweils 30 µl des jeweiligen Puffers, der mit 10 µM Rinderhirn-Calmodulin versetzt wurde, eluiert. Die Fraktionen wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.2.5 Kopplung von Protein an CNBr-aktivierte Sepharose und Anbindungsversuche**

Die Kopplung von rekombinant exprimiertem und aufgereinigtem CML5<sub>Δ1-27</sub>-His (Expression siehe 2.2.3.1, Aufreinigung mittels Phenylsepharose siehe 2.2.2.4) an CNBr-aktivierte Sepharose 4B von GE Healthcare wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde das aufgereinigte Protein in den Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) überführt und auf eine Konzentration von 5 bis 10 mg/ml aufkonzentriert, durch die

Verwendung von Amicon<sup>®</sup>Ultra Ultracel<sup>®</sup>-3K (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland). Für 500 µl Proteinlösung wurde 100 mg CNBr-Sepharose eingewogen und in 1 mM HCL resuspendiert. Anschließend wurden die Sepharose mit 60 ml 1 mM HCL gewaschen und dann in 500 µl Kopplungspuffer äquilibriert. Nach Pelletierung der Matrix durch Zentrifugation für 1 min bei 1000 g wurde die Proteinlösung zur Sepharosematrix gegeben und über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Wiederum wurde die Sepharosematrix bei 1000 g für 1 min pelletiert, 5mal in 1 ml Kopplungspuffer gewaschen und anschließend in 1,5 ml 1 M Ethanolamin pH 8,0 resuspendiert und über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert um freie Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Sepharosematrix wiederum 5mal mit 1 ml 1 M NaCl gewaschen.

Für die Anbindungsversuche wurde die, mit CML5<sub>Δ1-27</sub>-His gekoppelte, CNBr-Sepharose mit pflanzlichen Mikrosomenlysat in Anwesenheit und Abwesenheit von Kalzium inkubiert. Um Mikrosomen zu lysieren, wurden pflanzliche Mikrosomen wie unter 2.2.3.3 beschrieben isoliert. Diese wurden dann in Mikrosomen Lysis Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 15% Glycerin, 1 mM DTT, 1% Triton X 100) resuspendiert. Ein Ansatz wurde hierbei mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> der andere mit 5 mM EDTA/EGTA versetzt. Anschließend wurden die Mikrosomen für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler lysiert und danach wurden durch 10 min Zentrifugation bei 50000g und 4°C die festen Bestandteile entfernt. Zu dem Überstand wurde dann mit CML5<sub>Δ1-27</sub>-His gekoppelte CNBr-Sepharose gegeben, die zuvor durch 3maliges waschen mit Mikrosomen Lysis Puffer äquilibriert worden war. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 4°C wurde die Sepharosematrix mit dem entsprechenden Mikrosomem Lysis Puffer 5mal gewaschen und anschließend mit 100 µl eluiert. Die Elution erfolgte beim Ansatz mit Kalzium mit Mikrosomen Lysis Puffer der EDTA/EGTA (jeweils 5 mM) enthielt und bei dem Ansatz mit EDTA/EGTA mit Mikrosomen Lysis Puffer der Kalzium (1mM) enthielt. Die Elution erfolgte nach Inkubation für 45 min bei 4°C im Überkopfschüttler. Die einzelnen Fraktionen des Versuches wurden mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert.

#### **2.2.2.6 Kalzium-abhängige Mobilität von Calmodulin in der SDS-PAGE**

Für die Untersuchung der kalzium-abhängigen Mobilität von CML5 wurde über Phenylsepharose aufgereinigtes CML5<sub>Δ1-27</sub>-His (siehe 2.2.2.4) verwendet. Durch Verwendung eines Amicon<sup>®</sup>Ultra Zentrifugalfilter Ultracel<sup>®</sup>- 3K wurde das aufgereinigte Protein in

durchgeführt 50 mM HEPES pH 8,0 überführt. Anschließend wurden zwei Versuchansätze verwendet. Diese wurden auf eine Endkonzentration von 1 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 5 mM EDTA/EGTA eingestellt und anschließend für 1 h auf Eis inkubiert. Zu den Proben wurde SDS-Gelladepuffer gegeben und der Versuch mittels SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.2.7 Quervernetzungsversuche**

Die Quervernetzungsversuche in dieser Arbeit wurden nach Arazi, Baum et al. (1995) durchgeführt. Dafür wurden für einen 60 µl Ansatz 15 µg rekombinant hergestelltes Patellin1 (Expression siehe 2.2.3.1, Aufreinigung mit Glutathion-Sepharose siehe 2.2.2.4) mit 5 µg Schweinehirn-Calmodulin versetzt und je nach Versuchsbedingungen mit 100 µM Kalzium bzw. 5 mM EDTA/EGTA versetzt. Anschließend wurden die verschiedenen Versuchansätze für 45 min auf Eis inkubiert und danach aufgeteilt. Die nun 30 µl großen Ansätze wurden mit 15 mM HEPES-NaOH pH7, 5 bzw. mit einem 0Å Quervernetzungsgemisch aus EDC (2 mM Endkonzentration) und S-NHS (5 mM Endkonzentration) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von SDS-Gelladepuffer wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurde der Versuch mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

### **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Heterologe Expression von rekombinanten Protein**

Die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen wurde in *E. coli* Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL durchgeführt. Die mit den Plasmiden (CML5<sub>Δ1-27</sub>-His oder PATL1-GST) transformierten Zellen wurden unter Antibiotikaselektion (Ampicillin) bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 in LB-Medium (Bertani 1951) angezogen. Die Induktion der Expression der Proteine wurde durch Zugabe von 1mM IPTG gestartet und anschließend erfolgte die Expression für 4-5 Stunden bei 37°C. Danach wurden die *E. coli* Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 g gesammelt, der Überstand verworfen und das Zellpellet entsprechend des jeweiligen Versuches weiterverwendet (siehe 2.2.2.4).

#### **2.2.3.2 Pflanzenanzucht**

Um Pflanzen auf Erde anzuziehen, wurden Samen direkt auf Erde ausgelegt und im Gewächshaus angezogen. Für die Kultivierung von Pflanzen auf Nährstoffplatten (1%

Saccharose; 0,5 g/l MES pH 5,8; 2,37 g/l Murashige+Skoog-Salze; 0,3% Gelrite®) wurden die Samen zuerst mit 70% Ethanol gespült, mit 50% Chlorbleiche sterilisiert, anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann auf den Nährstoffplatten ausgelegt. Die Samen wurden anschließend für 3 Tage im Dunkeln bei 4°C vernalisiert und dann in einen Lichtschrank überführt der einen Licht-Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Temperatur von 21° C bei Licht und 18° C bei Dunkelheit und eine Lichtstärke von 110-130  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  hatte.

#### **2.2.3.3 Isolation einer mikrosomalen Fraktion aus *A. thaliana***

Zur Isolation einer mikrosomalen Fraktion wurden die Blätter von 3 Wochen alten, auf Erde angezogenen *A. thaliana* Pflanzen in Mikrosomen-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 0,5 M Saccharose, 1 mM EDTA) der „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ von Roche enthält, gemörsert. Anschließend wurde das Lysat filtriert und 10 min bei 4200 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand ein weiteres Mal für 10 min bei 10000 g zentrifugiert, wodurch Thylakoide, Chloroplasten und Mitochondrien entfernt wurden. Der Überstand wurde anschließend 1 h bei 100000 g zentrifugiert, um die mikrosomalen Bestandteile zu pelletieren. Die so isolierte mikrosomale Fraktion wurde anschließend in Puffer resuspendiert. Sollten die mikrosomalen Organellen intakt weiterverwendet werden, wurden sie in einem Mikrosomen Resuspensions Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 8,5% Saccharose) resuspendiert, um sie zu lysieren wurde Mikrosomen Lysis Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 15% Glycerin, 1 mM DTT, 1% Triton X 100) verwendet.

#### **2.2.3.4 Fraktionierung der mikrosomalen Fraktion durch Saccharosegradienten**

Um die verschiedenen Bestandteile (ER, Golgi, etc., siehe 1.3), die in der mikrosomalen Fraktion enthalten sind, aufzutrennen, wurden sie in 500  $\mu\text{l}$  Mikrosomen Resuspensions Puffer (siehe 2.2.3.3) resuspendiert und auf 10 ml umfassende, lineare Saccharosegradienten (10 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA und 20%-50% Saccharose) aufgetragen. Diese wurden in 25PC Zentrifugationsgefäßen (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokio, Japan) angefertigt. Anschließend wurden die Gradienten in einem Ausschwingrotor (SIGMA Nr. 11390, SciQuip Ltd. Newtown, Wem, GB), bei 100000 g für 12 h zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt und direkt mittels SDS-Gel und Western Blots analysiert.

### **2.2.3.5 Isolation von Chloroplasten**

Für die Isolation wurde 10 g Blattmaterial in 150 ml Isolationpuffer (330 mM Sorbitol, 20 mM MOPS, 13 mM Tris, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 % BSA, pH 7,9) in einem Mixer (Braun MX32, Braun, Kronberg-Taunus, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat durch ein Nylonnetz (30  $\mu\text{m}$  Porengröße) gefiltert und 10 min bei 2000g bei 4°C zentrifugiert. Die Chloroplastenfraction wurde in Resuspensionspuffer (330 mM Sorbitol, 50 mM HEPES-KOH, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,6) resuspendiert und weiterverwendet (siehe 2.2.3.6).

### **2.2.3.6 Membranextraktion von Proteinen**

Die Membranextraktion von Proteinen aus Mikrosomenpräparationen (siehe 2.2.3.3) oder isolierten Chloroplasten (siehe 2.2.3.5) erfolgte auf drei unterschiedliche Arten. Schwach mit der Membran assoziierte Proteine wurden durch Waschen der Membran mit NaCl bzw.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst, stärker gebundene durch Waschen mit einer Harnstofflösung (genauere Beschreibung siehe 3.1.3.2). Für alle drei Versuchsansätze wurden 10  $\mu\text{l}$  Mikrosomen bzw. Chloroplasten verwendet. Diese wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 100000 g (Mikrosomen) bzw. 2000 g (Chloroplasten) pelletiert und der Überstand verworfen. Für die Behandlung mit NaCl wurde das entstandene Pellet in 200  $\mu\text{l}$  0,5 M NaCl-Lösung resuspendiert. Von diesem Ansatz wurden 50  $\mu\text{l}$  entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer sofort gestoppt. Die restlichen 150  $\mu\text{l}$  wurden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend die Membranen durch Zentrifugation bei 100000 g für 10 min pelletiert. Der Überstand und das Pellet wurden jeweils mit SDS-Gelladepuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Behandlung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  erfolgte ähnlich. Das entstandene Pellet (Mikrosomen bzw. Chloroplasten) wurde in 200  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  resuspendiert, anschließend wurden wieder 50  $\mu\text{l}$  sofort entnommen und die Reaktion gestoppt. Die verbliebenen 150  $\mu\text{l}$  wurden für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend die Membranen wie oben pelletiert und der Versuch analysiert. Für das Waschen mit der Harnstofflösung wurden die jeweiligen Pellets in 200  $\mu\text{l}$  6 M Harnstofflösung resuspendiert, wieder 50  $\mu\text{l}$  entnommen und die Reaktion sofort gestoppt. Die restlichen 150  $\mu\text{l}$  wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Membranen wie oben pelletiert und der Versuch analysiert.

### **2.2.3.7 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern**

Mit verschiedenen YFP-Konstrukten transformierte *A. tumefaciens* LBA1334 wurden über Nacht in LB-Medium (Bertani 1951) bei 28°C unter Selektion durch Kanamycin angezogen. Anschließend wurden die Agrobakterien für 15 min bei 3000 g pelletiert und in Agromix (10mM MES-KOH pH 5,6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 150µM Acetosyringon) auf eine OD<sub>600</sub>=0,5 eingestellt. Für Doppeltransformationen wurden Zellen aus beiden Proben auf OD<sub>600</sub>=1 eingestellt und anschließend gemischt. Dann wurden die Bakterien für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert und anschließend in Blätter von 3-4 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Hierfür wurde die Bakteriensuspension mittels einer Injekt<sup>®</sup>-F Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an der apaxialen Blattseite appliziert. Die behandelten Pflanzen wurden gut befeuchtet und über Nacht im Dunkeln stehen gelassen. Danach wurden sie für 36 h unter normalen Lichtbedingungen im Gewächshaus gelassen. Anschließend wurden aus den Blättern Protoplasten nach Koop et al. (1996) isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zur Überprüfung einer mitochondrielle Lokalisation wurden die Proben zusätzlich 30 min mit dem Mitotracker(R) CMX Ros (Endkonzentration 125 nM, Stock gelöst in DMSO) gefärbt. Um die Lokalisation von Proteinen im Golgi Apparat zu überprüfen, wurde eine Doppeltransformation mit GmMan1-mCherry (Nelson, Cai et al. 2007) durchgeführt. Für die Behandlung mit Brefeldin A wurden die Protoplasten mit 50 µM Brefeldin A (Endkonzentration in ddH<sub>2</sub>O, 3,75 mM Stock gelöst in DMSO) für 2 Stunden inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

### **2.2.3.8 Transiente Transformation von isolierten Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana***

Für die Isolation von Protoplasten aus *A. thaliana* wurden ungefähr 2 bis 3 Gramm Blattmaterial von 3 bis 4 Wochen alten, auf Erde angezogenen Pflanzen in 10 ml Enzym-Lösung (1% Cellulase R10, 0,3% Macerozym R10 in 400 mM Mannitol, 20 mM KCL, 20 mM MES pH 5,7, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 01% BSA; 10 min bei 55°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt) mit einer Rasierklinge in sehr kleine Stückchen geschnitten. Danach wurden die Pflanzen für 90 min bei 40 rpm abgedunkelt auf einem Schüttler inkubiert. Zum Freisetzen der Protoplasten wurde die Proben für 1 min bei 90 rpm geschüttelt und anschließend durch ein 100 µm Nylon-Netz filtriert. Danach wurden die Protoplasten bei 100 g für 2 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl MMG-Puffer

(0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MES pH 5,7, Osmolarität: 540 mOsm) resuspendiert und auf einen Gradienten aufgetragen, der aus 9 ml MSC (10 mM MES, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 120 g/L Saccharose, pH 5,8, Osmolarität: 550 mOsm) und 2 ml MMG-Puffer bestand. Dieser Gradient wurde dann bei 70 g für 10 min zentrifugiert. An der Trennschicht zwischen MMG und MSC sammelten sich die intakten Protoplasten, die abgenommen und mit 5 ml W5-Puffer (150 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 2 mM MES pH 5,7, Osmolarität: 550-580 mOsm) verdünnt wurden, um dann bei 100 g für 2 min zentrifugiert zu werden. Das Protoplastenpellet wurde anschließend vorsichtig in MMG resuspendiert. Von diesen Protoplasten wurden 100 µl genommen und mit 10 bis 20 µg Plasmid-DNA vermischt. Zu diesem Ansatz wurde dann 110 µl PEG-Lösung (2g PEG 4000, 1,75 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 1 M Mannitol, 0,5 ml 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) gegeben, gut gemischt und anschließend für 10 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 500 µl W5-Puffer verdünnt und für 1 min bei 100 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und das Protoplastenpellet in 1 ml W5-Puffer resuspendiert und in eine kleine Petrischale überführt. Die Protoplasten wurden zur Expression über Nacht im Dunkeln bei 25°C inkubiert. Die Analyse erfolgte am nächsten Tag mittels Fluoreszenzmikroskopie. Für Ko-Lokalisationsstudien wurden die Plasmid-DNA vor der Transformation gemischt.

### **2.2.3.9 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS-SP5 von Leica (Wetzlar, Deutschland) und die Auswertung der Bilder erfolgte mit der integrierten Analysesoftware LAS AF Lite. Für die Anregung von YFP und GFP wurde der Argon Laser bei 488 nm verwendet. Für die Anregung von mCherry, RFP und den Mitotracker wurde der Laser DPSS 561 (Diode-pumped solid-state continuous wave laser) bei 561 nm verwendet. Als Detektoren wurden die HyD<sup>TM</sup> Detektoren von Leica verwendet. YFP wurde zwischen 500-550 nm detektiert, mCherry und RFP zwischen 595-620 nm und das Mitotracker Signal zwischen 600-613 nm. Chlorophyll wurde mit einem PMT (Photomultiplier Tubes) Detektor zwischen 650-750 nm detektiert.



## 2.2.4 Bioinformatische Methoden

### 2.2.4.1 Erstellung von Sequenz-Alignments

Die Sequenzen, die für die Erstellung der Sequenz-Alignments und des phylogenetischen Baumes verwendet wurden, stammen aus der MIPS-Datenbank (Spannagl, Noubibou et al. 2007) und sind in der Tabelle 3 gelistet. Basierend auf diesen Sequenzen wurde mit MAFFT (Katoh, Misawa et al. 2002, Katoh, Kuma et al. 2005) die Alignments erstellt. Für das Alignment wurde der Algorithmus MAFFT-L-INS-i mit der Scoring Matrix Blosum62 verwendet.

**Tabelle 3:** Liste der Aminosäuresequenzen, die für die bioinformatische Analyse verwendet wurden. Die Sequenzen stammen aus der MIPS-Datenbank (Spannagl, Noubibou et al. 2007).

Bezeichnung	Sequenz
At1g66410 CaM 4	MADQLTDEQISEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDA DGNGTIDFPEFLNLMAKKMKDTSSEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEK LTDEEVEEMIREADVDDGGQINYEYFVKIMMAK
At4g12860 CML2	MDRGELSRVFQMFDKNGDGKIAKNEKDFKSVGIMVPENEINEMIAKMDVNGDGA MDIDFEGSLYQEMVEEKEEEEDMREAFRVFDQNGDGFITDEELRSVLASMGLKQGRTL EDCKKMISKVDVDGDGMVNFKEFKQMMRGGGFAALSSN
At3g07490 CML3	MDQAEARIFQMFDNRNGDGKITKQELNDSLENLGIYPDKDLVQMIEKIDLNGDGYVDI EEFGGLYQTIMEERDEEEDMREAFNVFDQNRDGFITVEELRSVLASLGLKQGRITLED KRMISKVDVDGDGMVNFKEFKQMMKGGGFAALGSNL
At3g59440 CML4	MVRVFLLYNLFNSFLLCLVPKKLRVFFPPSWYIDDKNPPPPDESETESPVDLKRVFQMF KNGDGRITKEELNDSLENLGIYMPDKDLIQMIQKMDANGDGCVDINEFESLYGSIVEEK EEGDMRDAFNVFDQDGDGFITVEELNSVMTSLGLKQGKTLECKEMIMQVDEDDGDR VNYKEFLQMMKSGDFSNS
At2g43290 CML5	MVRIFLLYNILNSFLLSLVPKKLRTLFPLSWFDKTLHKNSPSPSTMLPSPSSSAPT KRIDPSELKRVFQMFDKNGDGRITKEELNDSLENLGIYPDKDLTQMIHKIDANGDGCVD IDIEFESLYSSIVDEHHNDGETEEEDMKDAFNVFDQDGDGFITVEELKSVMASLGLKQ GKTLDGCKKMIMQVDADGDGRVNYKEFLQMMKGGGFSSN
At4g03290 CML6	MDSTELNRVFQMFDKDGDGKITTKELNESFKNLGIPEDELTQIIQKIDVNGDGCVD IDIEFGELYKTIMVEDEDEVGEEDMKEAFNVFDRNGDGFITVDELKAVLSSLGLKQ GKTLCECRKMIMQVDVDGDGRVNYMEFRQMMKKGRFFSSLS
At1g05990 CML7	MDPTELKRVFQMFDKNGDGTITGKELSETLRSLGIYPDKELTQMIKIDVNGDGCVD IDIEFGELYKTIMDEEEDMKEAFNVFDQNGDGFITVDELKAVLSSLGLKQGKTLD DCKKMIKKVDVDGDGRVNYKEFRQMMKGGGFNSL

### 2.2.4.2 Berechnung der prozentualen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen

Um die prozentuale Übereinstimmung der analysierten CMLs und CaM4 zu berechnen, wurde zuerst mit MAFFT ein Alignment erstellt (siehe 2.2.4.1). Die übereinstimmenden Aminosäuren wurden gezählt und anschließend durch die Länge des kürzeren Proteins des

analysierten Paares geteilt. So erhält man die prozentuale Ähnlichkeit der analysierten Paare (McCormack and Braam 2003).

### 3. Ergebnisse

Die häufigsten sekundären Botenstoffe in Pflanzen sind zyklisches AMP oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Sie sind bei der Signaltransduktion daran beteiligt, äußere Reize in zelluläre Signale umzuwandeln. Meist steigt die Konzentration des sekundären Botenstoffes in der Zelle an, nachdem ein primärer Botenstoff einen Rezeptor aktiviert hat. Handelt es sich bei dem sekundären Botenstoff um Kalzium, wird dieses Signal häufig durch Calmodulin (CaM) aufgenommen. CaM ist ein kalziumbindendes Protein, das durch diese Bindung seine Konformation ändert und dadurch in der Lage ist, mit seinen Zielproteinen zu interagieren und so eine Zellantwort auszulösen.

Eine Analyse des Genoms von *A. thaliana* hat 6 klassische CaMs und etwa 50 CMLs identifiziert (McCormack and Braam 2003). Diese hohe Anzahl zeigt, wie wichtig Kalziumsignale in Pflanzen sind. Es gibt Hinweise darauf, dass in Pflanzenzellen CaMs und CMLs nicht nur im Zytosol vorkommen (siehe 1.2). Die genaue Lokalisierung und Funktion der meisten CMLs ist jedoch noch nicht untersucht.

#### 3.1 Lokalisierung und Charakterisierung von CML5

##### 3.1.1 Bioinformatische Analyse von CML4 und CML5

Zu Beginn wurden die Sequenzen von CML2, 3, 4, 5, 6 und CML7 und CaM4 miteinander verglichen. Diese Auswahl wurde getroffen, da es sich bei diesen CMLs nach McCormack and Braam (2003) um eine nah-verwandte Unterfamilie der CMLs und CaMs aus *A. thaliana* handelt, welche im phylogenetischen Baum auf einer gemeinsamen Verzweigung liegen. CaM4 zählt zu den klassischen CaMs aus *A. thaliana* und wurde zum Vergleich hinzugefügt.

In Abbildung 1 ist zu erkennen, dass Aminosäuresequenzen aller CMLs eine hohe Konservierung aufweisen. Diese Konservierung befindet sich vorwiegend in den Sequenzbereichen, die die EF-Hand Motive bilden. Hierbei handelt es sich um ein Helix-Loop-Helix-Motiv, welches für die Kalziumbindung der CaMs und CMLs verantwortlich ist. In diesen Bereichen unterscheiden sich CML2-7 kaum voneinander und sind auch dem klassischen CaM sehr ähnlich. Insbesondere sind für die Kalziumbindung wichtige Positionen wie D1, G6 und E12 durchgehend konserviert (McCormack and Braam 2003). Alle in

Abbildung 1 gezeigten CMLs und CaM4 haben 4 EF-Hand-Motive und es konnten keine weiteren funktionellen Domänen identifiziert werden.

Auffallend ist, dass CML4 und CML5 beide am N-terminus eine verlängerte Sequenz aufweisen, die weder das CaM4 noch die anderen CMLs dieser Unterfamilie aufweisen.

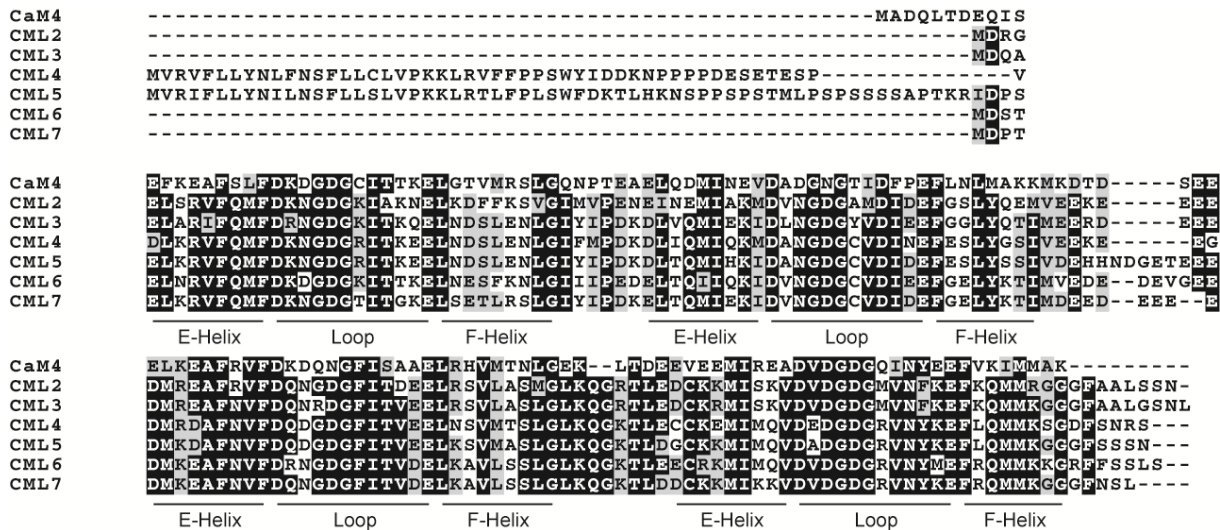


Abbildung 1.: Sequenzalignment von CML2, 3, 4, 5, 6 und CML7 und CaM4 aus *Arabidopsis thaliana*.

In diesem Sequenzalignment, das mit MAFFT (Katoh, Misawa et al. 2002, Katoh, Kuma et al. 2005) erstellt wurde, ist die große Ähnlichkeit innerhalb der EF-Hand Domäne zu erkennen. Schwarze Kästchen kennzeichnen große Ähnlichkeit (mindestens fünf Proteine haben identische Aminosäuren an dieser Stelle), graue Kästchen kennzeichnen eine Konservierung durch chemisch ähnliche Aminosäuren. Querstriche kennzeichnen Positionen, an denen vom Programm für ein bestmögliches Alignment Leerstellen in die Sequenzen eingefügt wurden. Die Domänen der kalziumbindenden EF-Hand Motive sind gekennzeichnet.

Eine Analyse der prozentualen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen zeigt, dass diese zwischen 36,9 und 78,7 % liegt (Tabelle 4). Die geringste Übereinstimmung gab es zwischen den CMLs und CaM4 (36,9 % - 42,3 %). Bei CML6 und CML7 sind 78,7 % der Aminosäuren identisch und bei CML4 und CML5 stimmen 75,9 % überein. Die geringste Übereinstimmung innerhalb der analysierten CMLs findet sich zwischen CML2 und CML4 (61,2 %).

**Tabelle 4:** Prozentuale Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von CML2, 3, 4, 5, 6 und CML7 und CaM4.. Die Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe von MAFFT untereinander verglichen. Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um den Anteil der identischen Aminosäuren in Prozent im analysierten Paar. Modifiziert nach McCormack and Braam (2003)

CML2	37,6					
CML3	37,6	72,4				
CML4	36,9	61,2	66,7			
CML5	38,9	61,8	71,9	75,9		
CML6	42,3	61,8	66,0	63,0	67,5	
CML7	41,6	65,3	72,7	64,7	76,7	78,7
	CaM4	CML2	CML3	CML4	CML5	CML6

Detaillierte Analysen in McCormack and Braam (2003), zeigen die deutliche Abtrennung von CML2-7 von CaM1-5 und CaM7. Es kann vermutet werden, dass sich ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren verschiedene CML Paare entwickelt zu haben, welche jeweils CML6 und 7, CML2 und 3 bzw. CML4 und 5 einschließen. Es ist deutlich zu erkennen, dass CML4 und 5 deutlich auf einer gemeinsamen Verzweigung liegen (McCormack and Braam 2003).

Die große Ähnlichkeit von CML4 und CML5 zeigt sich auch in der bereits erwähnten N-terminalen Verlängerung der Sequenz in diesen beiden Proteinen. In Abbildung 2 ist zu erkennen, dass diese mögliche Präsequenz im Bereich zwischen der ersten und der 31. Aminosäure stark konserviert ist. In diesem Bereich weisen nur die Positionen 11, 17, 25, 26 und 29 nicht identische oder chemisch ähnliche Aminosäuren auf. Ab der 33. Position bis zum Beginn der ersten EF-Hand Domäne unterscheiden sich die Sequenzen der beiden Proteine jedoch deutlich. Bei dieser N-terminalen Verlängerung könnte es sich um eine sogenannte Präsequenz handeln. Bei Präsequenzen handelt es sich um Signalpeptidsequenzen, die für die korrekte Lokalisierung des Proteins mitverantwortlich sind.

CaM4	-----MADQLTDEQIS
CML2	-----MDRG
CML3	-----MDQA
CML4	MVRVFLLYNLNSFLLCLVPKKLRVFFPPSWYIDDKNPPPEDESETESP-----V
CML5	MVRIFLLYNLNSFLLSLVPKKLRTLFPLSWFDKTLHKNSPPSPSTMLPSPSSSSAPTAKRIDPS
CML6	-----MDST
CML7	-----MDPT

**Abbildung 2: Sequenzvergleich der Präsequenz von CML4 und CML5.**

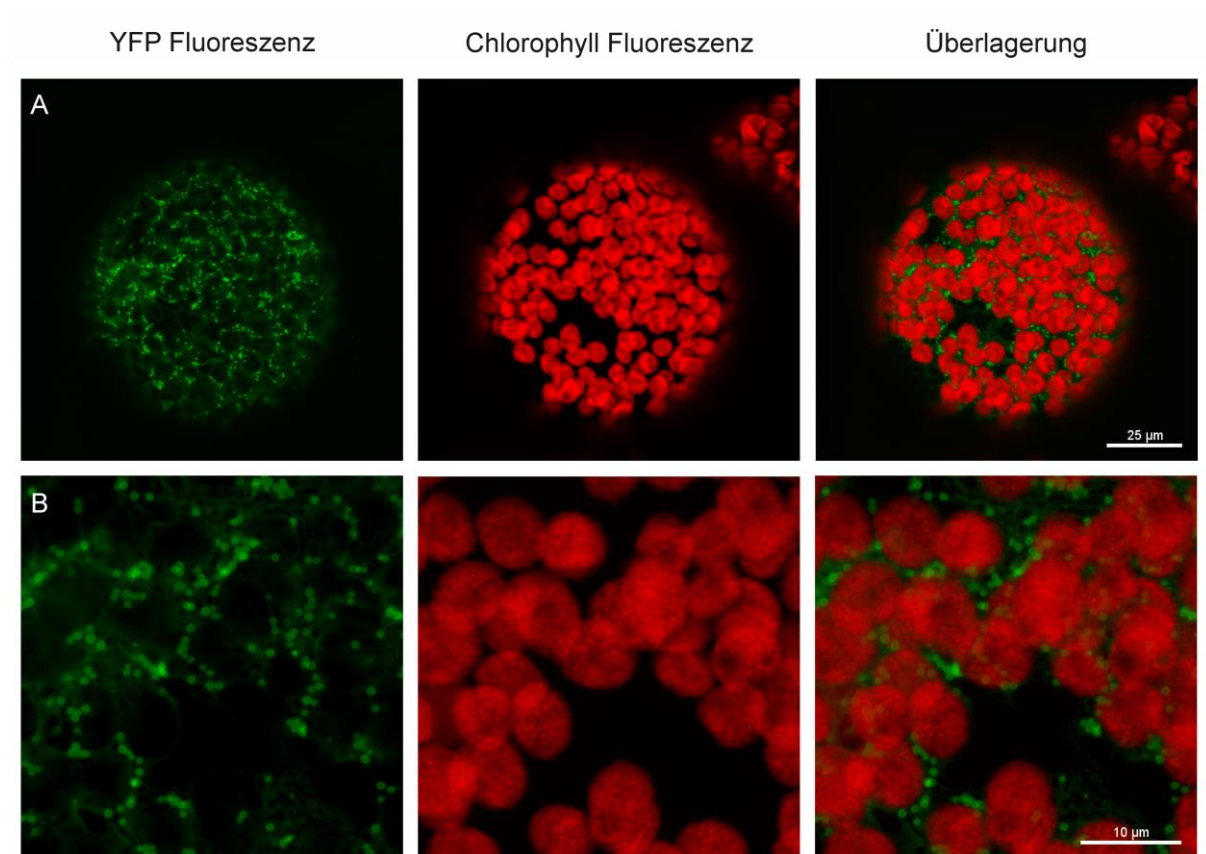
In diesem Sequenzvergleich ist die große Ähnlichkeit der N-terminalen Verlängerung von CML4 und CML5 zu erkennen. Schwarze Kästchen kennzeichnen identische Aminosäuren, graue Kästchen kennzeichnen chemisch ähnliche Aminosäuren. Querstriche kennzeichnen Positionen, an denen vom Programm für ein best-mögliches Alignment Leerstellen in die Sequenzen eingefügt wurden.

### 3.1.2 Lokalisierung

#### 3.1.2.1 *In vivo* Lokalisierungsanalyse in *N. benthamiana*.

Bei der N-terminalen Verlängerung von CML4 und 5 könnte es sich möglicherweise um eine Präsequenz handeln, die die Lokalisierung der Proteine bestimmen könnte. Diese Sequenzen unterliegen häufig einer gewissen Konservierung und mögliche Lokalisierungen können daher über bioinformatische Analysen vorhergesagt werden. Eine solche Analyse der Proteinsequenz von CML5 ergab allerdings verschiedene mögliche Lokalisierungen (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>). So wurde durch einige Vorhersageprogramme eine chloroplastidäre Lokalisierung (ChloroP\_v1.1, iPSort, PCLR\_v0.9, Wolf\_PSort) vorhergesagt. Andere Programme wie Mitopred und MitoProt\_v2 prognostizierten eine mitochondrielle Lokalisierung, wohingegen unter anderem MultiLoc, Predotar\_v1, PProWler\_v1.1 und SignalP\_v4.1 eine Lokalisierung im biosynthetischen-sekretorischen Weg (Endoplasmatisches Reticulum, Golgi Apparat, frühe und späte Endosomen (Alberts, Johnson et al. 2007)) vorhersagten.

Um die Lokalisierung *in vivo* zu überprüfen, wurde ein Fusionskonstrukt zwischen der vollständigen Gensequenz von CML5 mit der Gensequenz des Gelb-fluoreszierenden-Proteins (YFP) im binären Vektor pBIN19 hergestellt (pBIN-CML5-YFP). Um die mögliche Präsequenz nicht zu verdecken, erfolgte die Fusion von YFP am C-terminus von CML5. Anschließend wurde das CML5-YFP Fusionsprotein in Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* transient exprimiert und anhand des Fluoreszenzsignals die Lokalisierung des Proteins in den Zellen bestimmt. Zur besseren Analyse wurden nach erfolgreicher Expression aus den transformierten Blättern Protoplasten isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Fluoreszenzanalyse von CML5-YFP in Protoplasten von *N. benthamiana*.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit pBIN-CML5-YFP transformiert. Nach 36 Stunden wurden Protoplasten isoliert und mittels Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-YFP. Zweite Spalte: Fluoreszenz von Chlorophyll. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale. (A) Aufnahme eines Protoplasten; (B) Ausschnitt aus einem Protoplasten.

In Abbildung 3A ist zu erkennen, dass das YFP-Signal von CML5-YFP nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt ist. Es handelt sich eher um eine punktuelle Verteilung. Diese scheint sich im Bereich des Zytosols zu befinden, da sie weder im Bereich von Kern und Vakuole zu finden ist (hier nicht gezeigt) noch mit der Fluoreszenz des Chlorophylls überlagert (Abbildung 3A). Somit kann auch eine chloroplastidäre Lokalisierung des Fusionsproteins ausgeschlossen werden. In Abbildung 3B ist bei genauerer Betrachtung weiterhin zu erkennen, dass das YFP-Signal nicht in punktueller Form, sondern eher in kleinen, ringförmigen Strukturen vorliegt. Diese sind zwischen 550 und 850 nm groß. Die punkt- bzw. ringförmige Struktur des Signals legt nahe, dass CML5-YFP nicht löslich im Zytosol verteilt vorliegt.

Eine mögliche Lokalisierung wäre in den Mitochondrien, da diese größenmäßig recht gut zu den punktförmigen Strukturen passen würden. Um dies zu überprüfen, wurde CML5-YFP in *N. benthamiana* Blättern exprimiert und anschließend die isolierten Protoplasten mit Mitotracker®CMX Ros behandelt, ein Farbstoff der spezifisch Mitochondrien anfärbt. In Abbildung 4 ist sowohl das CML5-YFP Signal als auch das Signal des Mitotracker zu erkennen. Diese ergeben ein unterschiedliches Muster und zeigen dabei keine Überlagerung, so dass damit eine mitochondriale Lokalisierung von CML5 ausgeschlossen werden kann.



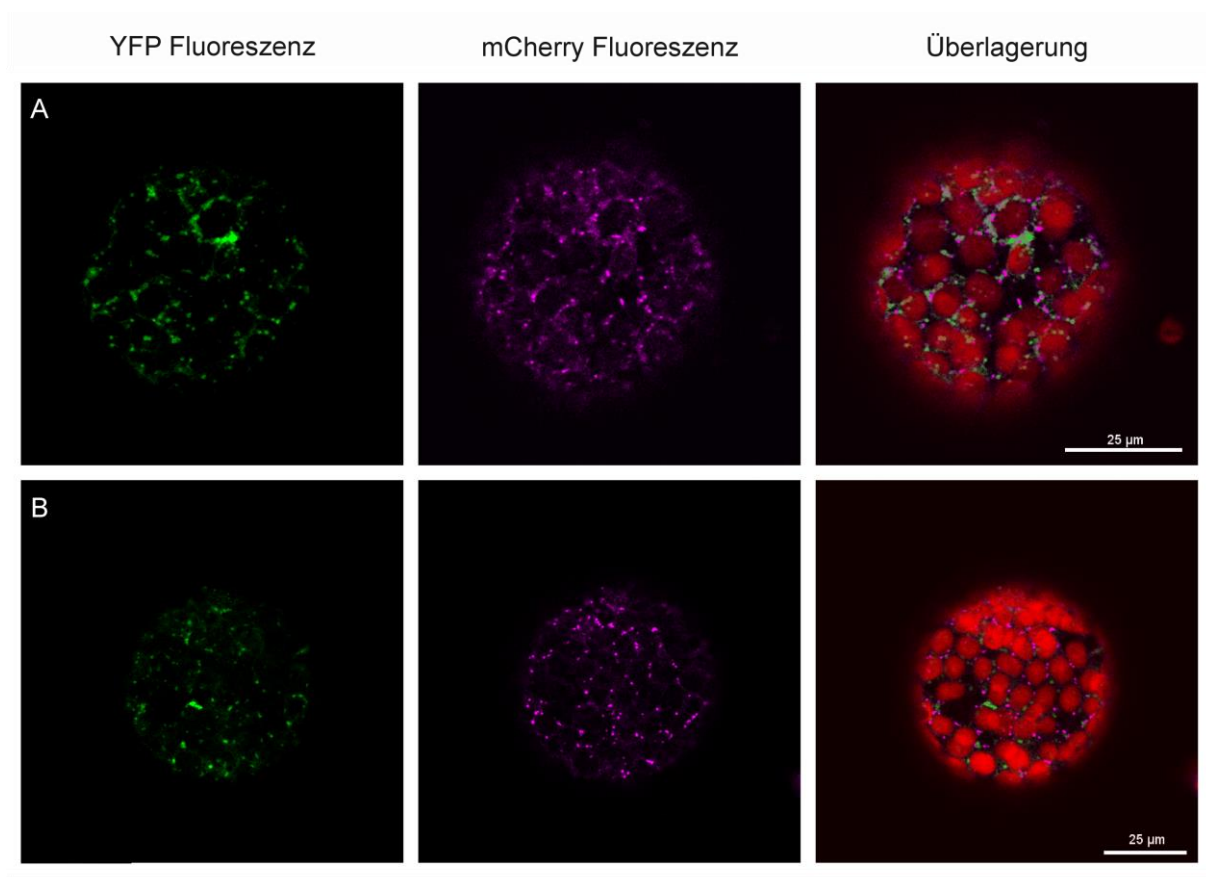
**Abbildung 4: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die CML5-YFP exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker® gefärbt wurden.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden, wie unter Abbildung 3 beschrieben, mit pBIN-CML5-YFP transformiert und Protoplasten isoliert. Diese wurden anschließend mit Mitotracker gefärbt und analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins von CML5-YFP. Zweite Spalte: Fluoreszenz des Mitotrackers. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

Nachdem eine zytosolische, chloroplastidäre und mitochondriale Lokalisierung ausgeschlossen wurde, wäre eine weitere potentielle Lokalisierung im Golgi-Apparat, da es sich hierbei um ein Kompartiment aus dem biosynthetischen-sekretorischen Weg handelt, das sich durch größenmäßig passende Strukturen auszeichnet. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde CML5-YFP zeitgleich mit einem Marker für den Golgi-Apparat, GmMan1-mCherry (Nelson, Cai et al. 2007), transient in *N. benthamiana* exprimiert. Abbildung 5 zeigt, dass Signale von YFP und mCherry sichtbar sind, was zeigt, dass beide Proteine gleichzeitig in den Tabakzellen exprimiert wurden (Abbildung 5, erste und zweite Spalte). Die Analyse ergab jedoch kein eindeutiges Bild, da sich unerwarteter Weise das Fluoreszenzmuster beider Fluoreszenzproteine zwischen verschiedenen Zellen unterschied.



Abbildung 5A zeigt ein Beispiel einer Zelle, in der an vielen Stellen eine Überlagerung zwischen dem CML5-YFP Signal und dem GmMan1-mCherry Signal zu erkennen ist (Abbildung 5A, drittes Bild), was darauf hindeutet, dass CML5-YFP im Golgi-Apparat lokalisiert sein könnte. Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 5B eine Zelle, in der sich die Signale nicht überlagern (Abbildung 5B, drittes Bild). Nun stellt sich die Frage, wie das zustande kommen kann. Wie schon unter 1.3 erwähnt, durchlaufen viele Proteine den Golgi-Apparat und werden anschließend weitertransportiert. So gelangen Proteine aus dem Golgi-Apparat in frühe und späte Endosomen, sekretorische Vesikel, zur Plasmamembran, in die Vakuole oder sogar durch Exozytose aus der Zelle heraus. So wäre es möglich, dass CML5 durch den Golgi-Apparat transportiert wird, aber der Golgi Apparat nicht der finale Lokalisierungsort ist.

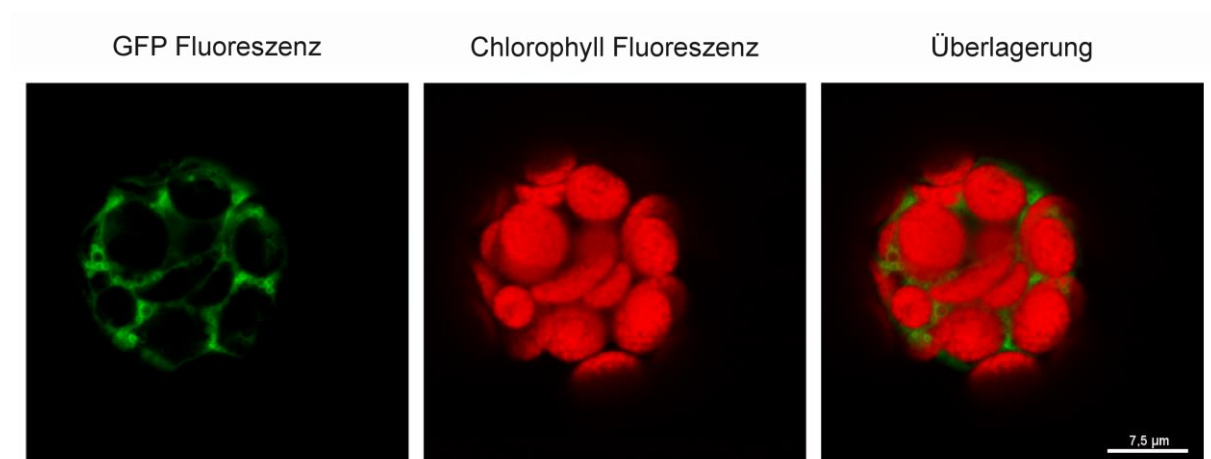


**Abbildung 5: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die CML5-YFP und GmMan1-mCherry koexprimieren.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit pBIN-CML5-YFP und pBIN-GmMan1-mCherry, ein Marker für den Golgi-Apparat, kotransformiert. Nach 36 Stunden Inkubation wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-YFP. Zweite Spalte: mCherry-Fluoreszenz des Fusionsproteins GmMan1-mCherry. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

### 3.1.2.2 *In vivo* Lokalisierungsanalyse in *A. thaliana*

Nachdem die Lokalisierung von CML5 in *N. benthamiana* untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob sich diese Lokalisierung auch in *A. thaliana*, dem Organismus aus, dem CML5 ursprünglich stammt, bestätigen lässt. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus CML5-GFP transient in zuvor isolierte Protoplasten von *A. thaliana* exprimiert. Bei der Analyse des Fluoreszenzsignals (Abbildung 6) ergab sich ein ähnliches Bild wie zuvor bei der Expression in *N. benthamiana*. Auch hier waren ringförmige Strukturen mit einem Durchmesser zwischen 600 und 1300 nm zu sehen, die nicht mit Kern, Vakuole bzw. mit der Fluoreszenz des Chlorophylls überlappen. Dadurch, dass die Expression in *N. benthamiana* und in *A. thaliana* beides ringförmige Strukturen in der gleichen Größenordnung zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass CML5 in beiden Pflanzen im gleichen Zellkompartiment lokalisiert ist und somit die Tabaktransformation als Grundlage für Untersuchungen verwendet werden kann.



**Abbildung 6: Fluoreszenzanalyse von *A. thaliana* Protoplasten die CML5-GFP exprimieren.**

Aus *A. thaliana* Blättern wurden Protoplasten isoliert und anschließend mit pOL-CML5-GFP transformiert. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde die Expression durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) untersucht. Erstes Bild: GFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-GFP. Zweites Bild: Fluoreszenz von Chlorophyll. Drittes Bild: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

### 3.1.2.3 Fraktionierung durch Saccharose-Gradienten

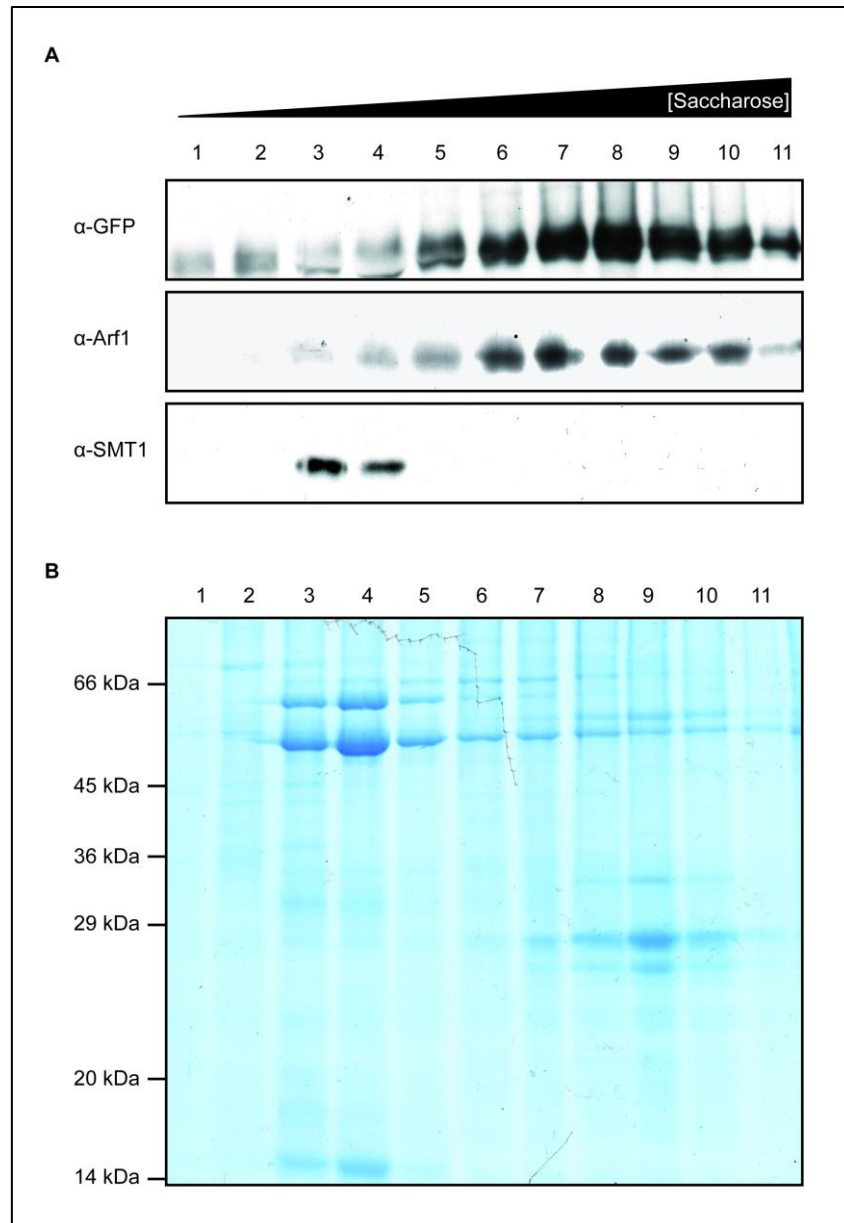
Um die Lokalisierung von CML5 im Endomembransystem zu überprüfen, wurde CML5-YFP in *N. benthamiana* transient exprimiert und aus den transformierten Blättern anschließend

Mikrosomen isoliert. Mikrosomen sind keine einheitliche Organellenfraktion, sondern ein Gemisch aus Membranvesikeln, welche bei der Zerstörung der Zelle aus Fragmenten der Mitochondrien, der Plasmamembran, des ER, dem Golgi und dem Rest des Endomembransystems hervorgeht (Beaufay, Amar-Costesec et al. 1974). Die verschiedenen Membranvesikel der Mikrosomen wurden danach durch Dichtegradienten-Zentrifugation voneinander getrennt. Nach der Zentrifugation wurden 1 ml Fraktionen von oben (Fraktion 1) bis unten (Fraktion 11) entlang des Gradienten entnommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 7).

Abbildung 7 B zeigt die Coomassiefärbung des SDS-Gels mit den Fraktionen 1-11 des Saccharosegradienten. An dem unterschiedlichen Proteinmuster der einzelnen Fraktionen ist zu erkennen, dass die Auftrennung der Mikrosomenfraktion in verschiedene Membranvesikel erfolgreich war.

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen wurden anschließend durch Western-Blot und Immunodekoration analysiert. Dazu wurden Antikörper verwendet, die gegen verschiedene Bestandteile der Mikrosomen gerichtet sind. Bei der Verwendung eines GFP-Antikörpers, der auch das YPF-Protein erkennt, ist zu erkennen, dass CML5-YFP in allen Fraktionen detektierbar war (Abbildung 7 A,  $\alpha$ -GFP). Allerdings gibt es eine deutliche Anreicherung mit der höchsten Konzentration in den Fraktionen 7 bis 9. Eine deutlich engere Verteilung zeigte der Western-Blot, der mit einem Antikörper gegen den ADP-Ribosylierungs Faktor1 ( $\alpha$ -Arf1) behandelt wurde (Abbildung 7 A,  $\alpha$ -ARF1). Das Protein ARF1 ist im Golgi-Apparat lokalisiert und spielt eine Rolle beim intra-Golgi Vesikeltransport (Donaldson and Honda 2005). Während in Fraktion 1 und 2 kein Signal für  $\alpha$ -Arf1 zu detektieren ist, zeigt sich ab Fraktion 3 ein Anstieg der Signalstärke, die dann ab Fraktion 9 wieder abnimmt. Das stärkste Signal ist, anders als bei  $\alpha$ -GFP, in den Fraktionen 6 und 7 zu erkennen. Während also eine teilweise Überlappung der Signale vorliegt, ist die Lokalisierung von CML5-YFP im Vergleich zu Arf1 in Richtung der leichteren Fraktionen verschoben. Eine ganz andere Verteilung ist zu beobachten, wenn ein Antikörper gegen Sterol Methyltransferase 1 ( $\alpha$ -SMT1) benutzt wurde (Abbildung 7 A,  $\alpha$ -SMT1). SMT1 ist ein Protein, das an der Steroidbiosynthese beteiligt ist und ausschließlich im ER lokalisiert ist (Boutté and Grebe 2009). Die Membranen des ER scheinen spezifisch in den Fraktionen 3 und 4 angereichert zu sein. Es liegt also keine Kollokalisierung zwischen CML5 und dem ER vor. Diese Analyse bestätigt die Ergebnisse der Fluoreszenz-Analyse. Eine Lokalisierung von CML5 im ER kann

ausgeschlossen werden. Die nur teilweise Überlappung mit Arf1 verstärkt hingegen die Vermutung, dass sich CML5 auch im Golgi-Apparat befindet, aber es sich nicht um den finalen Lokalisationsort des Proteins handelt.



**Abbildung 7: Fraktionen eines Saccharose-Gradienten über den Mikrosomen aus Pflanzen, die CML5-YFP exprimieren, aufgetrennt wurden.**

*N. benthamiana* Blätter wurden mit pBIN-CML5-YFP transformiert und nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden aus diesen Blättern Mikrosomen isoliert. Diese Mikrosomen wurden über einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (20-50%) aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen analysiert. Durch anschließenden Western Transfer konnten die jeweiligen Proteine mit Antikörpern nachgewiesen werden. (A) oberes Bild: CML5-YFP nachgewiesen mit  $\alpha$ -GFP, mittleres Bild: Golgi-Apparat Membranen nachgewiesen mit  $\alpha$ -Arf1, unteres Bild: ER-Membranen nachgewiesen durch  $\alpha$ -SMT1. (B) SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen.

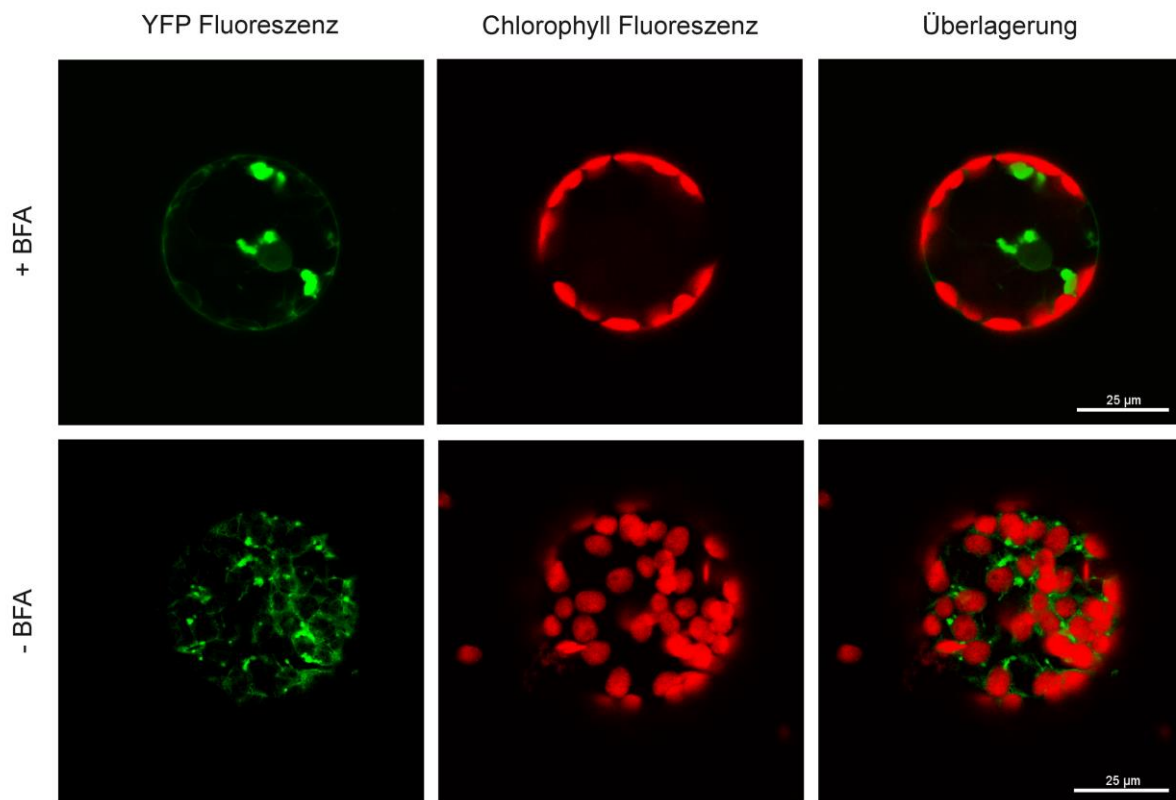
Die Western Blot Analyse ergab ebenfalls Hinweise darauf, dass CML5 eventuell in zwei unterschiedlichen Größen vorliegt. So sind vor allem in den Fraktionen 2 bis 5 zwei dicht übereinander laufende Banden zu erkennen (Abbildung 7 A,  $\alpha$ -GFP). In den Fraktionen 6 bis 11 ist die Konzentration von CML5-YFP so hoch, dass die Signalstärke des Antikörpers keine Unterscheidung der zwei Banden zulässt. Die unterschiedliche Größe könnte ein Indiz dafür sein, dass das Protein nach seiner Synthese post-translationalen Modifizierungen unterliegt. Mögliche Modifizierungen wären zum Beispiel das Anhängen von Fettsäuren oder eine Glykolysierung.

### 3.1.2.4 Behandlung mit Brefeldin A

Der Golgi-Apparat ist in zwei Sub-Kompartimente unterteilt. Die dem ER zugewandte Seite wird als cis-Golgi-Apparat bezeichnet. An dieser Seite erreichen die Vesikel vom ER den Golgi-Apparat (Alberts, Johnson et al. 2007). Bei ihrem Transport durch den Golgi gelangen sie vom cis-Golgi-Apparat zum trans-Golgi-Apparat. So wird die Seite bezeichnet, die dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zugewandt ist. Beim TGN handelt es sich um ein tubuläres Netzwerk an der trans-Seite des Golgi-Apparates, an der Proteine in verschiedene Transportvesikel verpackt werden (Nebenführ and Staehelin 2001). Bei Pflanzen lässt sich nicht zwischen TGN und frühen Endosomen („early Endosomes“, EEs) unterscheiden (Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. 2006). An das TGN/EEs schließen sich noch verschiedene Vesikelfraktionen an, welche späte Endosomen (LEs) oder auch prävakuoläres Kompartiment (PVC) oder Multivesikuläre Körperchen (MVBs) genannt werden.

Eine Möglichkeit, die Lokalisierung eines Proteins im Golgi und dem anschließenden Endomembransystem genauer zu bestimmen, ist die Behandlung mit Brefeldin A (BFA). Bei BFA handelt es sich um ein makrozyklisches Lacton aus Pilzen, das als Inhibitor des Proteintransports im Endomembransystem eingesetzt wird (Nebenführ, Ritzenthaler et al. 2002). Eine Behandlung mit BFA bewirkt, dass der Golgi Apparat zerfällt und der cis-Golgi mit dem ER fusioniert. Proteine, die sich im cis-Golgi befinden, zeigen daher nach BFA Behandlung eine dem ER entsprechende Lokalisierung. Zusätzlich bilden sich sogenannte BFA-Kompartimente (Nebenführ, Ritzenthaler et al. 2002). Dabei handelt es sich um große Agglomerate, die durch die Fusion von sekretorischen Vesikeln, endozytischen Vesikeln und trans-Golgi Stapeln entstehen (Molendijk, Ruperti et al. 2004). Im folgenden Versuch wurden daher CML5-YFP exprimierende, isolierte Protoplasten von *N. benthamiana* mit BFA (in

DMSO gelöst) behandelt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 8, +BFA). Zum Vergleich wurden Protoplasten analysiert, die nicht mit BFA, sondern nur mit der gleichen Menge DMSO behandelt wurden. Die Kontroll-Protoplasten zeigen die typischen Punktstrukturen des YFP-Signals, die über die gesamte Zelle verteilt sind (Abbildung 8, -BFA), was zeigt, dass DMSO alleine keinen Einfluss auf die Lokalisierung von CML5-YFP nimmt. Nach Behandlung mit BFA ändert sich jedoch das Verteilungsmuster. Es ist zu erkennen, dass sich CML5-YFP in einer Art großer Vesikeln an wenigen Stellen in der Zelle akkumuliert. Ein Vergleich mit den Darstellungen zur BFA Behandlungen in Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. (2006) legt nahe, dass es sich hierbei um die sogenannten BFA-Kompartimente handelt.



**Abbildung 8: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten, die CML5-YFP exprimieren und mit Brefeldin A (BFA) behandelt wurden.**

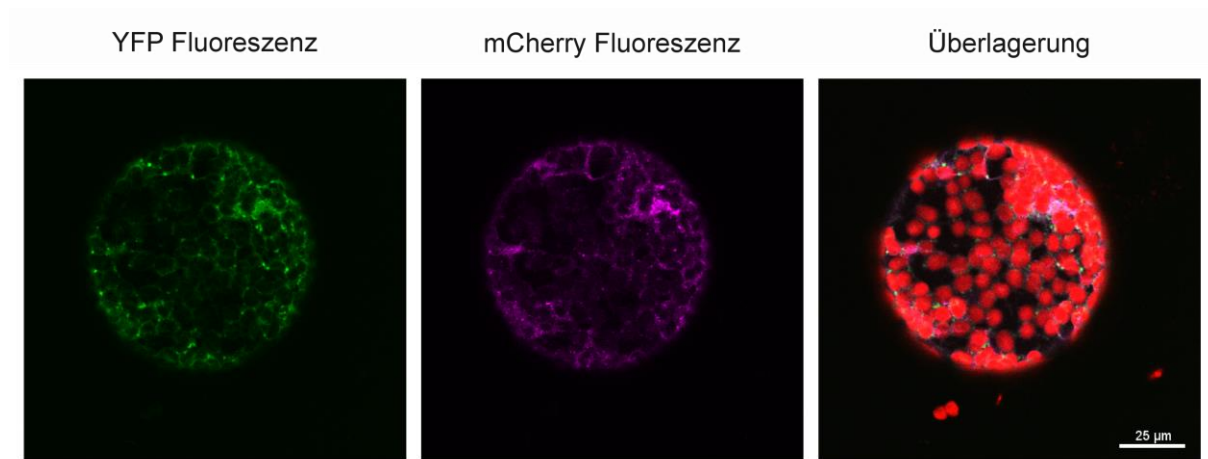
*N. benthamiana* Blattmesophyllzellen wurden mit pBIN-CML5-YFP transformiert und nach 36 Stunden wurden Protoplasten isoliert. 250 µl Protoplasten wurden mit 50 µM BFA (gelöst in DMSO) für 2 Stunden inkubiert und anschließend durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Obere Reihe: Versuchsansatz unter Einfluss von BFA. Untere Reihe: Kontrollansatz ohne Einfluss von BFA, aber mit Zugabe von DMSO. Jeweils erstes Bild: Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-YFP; zweites Bild: Fluoreszenz von Chlorophyll; drittes Bild: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich CML5 in Organellen befindet, die durch BFA Behandlung beeinflusst werden, was wiederum für eine Lokalisierung im Endomembransystem spricht. Weiterhin legt das Signal nach BFA Behandlung die Schlussfolgerung nahe, dass sich das Protein im trans-Golgi oder den danach angeschlossenen Vesikelfraktionen, wie dem TGN oder den LEs, befindet.

### 3.1.2.5 Kolokalisierungsanalysen mit Ara6

Um die Lokalisierung von CML5 im Endomembransystem genauer zu bestimmen, wurden weitere Kolokalisierungsanalysen mit verschiedenen Markerproteinen durchgeführt. So wird zum Beispiel das Protein Ara6 als ein Markerprotein für die LEs eingesetzt (Samaj, Read et al. 2005). Ara6 zeigt sehr viele Homologien zu der Rab5 GTPase von Säugern, die eine Rolle in der homotypischen Endosomenfusion spielt (Ueda, Yamaguchi et al. 2001). Um zu untersuchen, ob CML5 in den LEs lokalisiert ist, wurden in Tabakpflanzen gleichzeitig CML5-YFP und Ara6-mCherry exprimiert und anschließend überprüft, ob eine Kolokalisierung der Fluoreszenzsignale auftritt.

Die Versuche wurden zuerst in *N. benthamiana* durchgeführt (Abbildung 9). Dabei wurde eine Ko-Transformation durchgeführt. Die Lokalisierung von CML5-YFP ist im Falle der Doppeltransformation mit Ara6-mCherry nicht so eindeutig wie bei der Einzeltransformation (Abbildung 9 und Abbildung 3). Das Signal von CML5-YFP ist zwar in Form eines punktförmigen Musters zu erkennen, aber es fällt auf, dass ein signifikanter Anteil von CML5-YFP auch im Zytosol vorhanden ist. Die gleiche Verteilung zeigt sich unerwarteter Weise auch für Ara6-mCherry und dies entspricht nicht der bekannten Lokalisierung von Ara6. Ara6 sollte überwiegend in Endosomen lokalisiert sein und deswegen, wie CML5, in einer punktuellen und ringförmigen Struktur auftreten (Ueda, Yamaguchi et al. 2001). Trotzdem ist im dritten Bild (Abbildung 9) deutlich zu erkennen, dass CML5-YFP und Ara6-mCherry kolokalisieren. Vor allem die punktuellen Strukturen, die bei beiden Signalen zu erkennen sind, scheinen gleich lokalisiert zu sein. Da die Signale sowohl von CML5-YFP als auch von Ara6-mCherry bei der Doppeltransformation in *N. benthamiana* ein ähnlich verändertes und von den Einzeltransformationen abweichendes Muster zeigen, lässt sich vermuten, dass sich die beiden Proteine bei gemeinsamer Expression gegenseitig in der Lokalisierung beeinflussen.



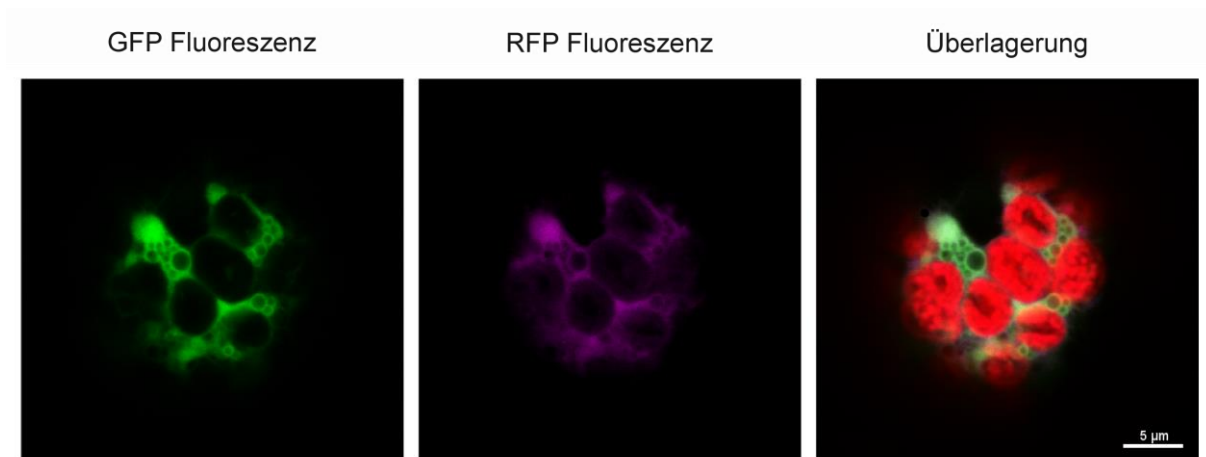
**Abbildung 9: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die CML5-YFP und Ara6-mCherry koexprimieren.**

*N. benthamiana* Blattmesophyllzellen wurden mit pBIN-CML5-YFP und pBIN-Ara6-mCherry kotransformiert. Wie unter Abbildung 3 beschrieben, wurden anschließend Protoplasten isoliert und analysiert. Erstes Bild: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-YFP. Zweites Bild: mCherry Fluoreszenz des Fusionsproteins Ara6-mCherry. Drittes Bild: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

Da beide Proteine ursprünglich aus *A. thaliana* stammen, wurde die Doppeltransformation in *A. thaliana* Protoplasten wiederholt um zu überprüfen, ob in diesen Zellen eine korrekte Lokalisierung beider Proteine auch bei einer Doppeltransformation möglich ist.

In Abbildung 10 ist zu sehen, dass sowohl das CML5-GFP Signal sowie auch das Ara6-RFP Signal in ringförmigen Strukturen lokalisiert sind und kaum ein zytosolisches Signal aufweisen. Die Überlagerung der Signale zeigt wiederum, dass diese Strukturen deutlich kolokalisieren. Somit bestätigt die Analyse in *A. thaliana* Protoplasten, dass CML5-GFP und Ara6-RFP kolokalisieren. Dies würde bedeuten, dass CML5 in den LEs lokalisiert ist (Ueda, Yamaguchi et al. 2001).





**Abbildung 10: Fluoreszenzanalyse von *A. thaliana* Protoplasten die CML5-GFP und Ara6-RFP koexprimieren.**

Wie unter Abbildung 6 beschrieben wurden aus *A. thaliana* Pflanzen Protoplasten isoliert und diese mit pOL-CML5-GFP und pURT-Ara6-RFP kotransformiert. Nach der Expression für 18 Stunden wurde die Lokalisierung durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) überprüft. Erstes Bild: GFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-GFP. Zweites Bild: RFP Fluoreszenz des Fusionsproteins Ara6-RFP. Drittes Bild: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

### 3.1.3 Topologie

Durch die Kolokalisierungsversuche konnte eine Lokalisierung von CML5 in den LEs festgestellt werden. Diese Lokalisierung wirft jedoch eine Reihe von weiteren Fragen auf. Wie gelangt CML5-YFP in oder an die Endosomen? Befindet sich CML5-YFP im Inneren der Endosomenvesikel oder ist es womöglich in der Membran verankert? Wenn letzteres, zu welcher Seite der LE-Membran ist die Calmodulin-Domäne gerichtet? Um diese Fragen zu beantworten, wurden weitere Versuche zur Lokalisierung und Topologie von CML5 durchgeführt.

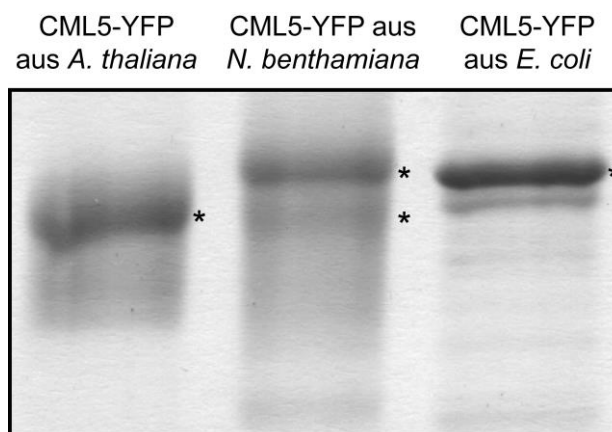
#### 3.1.3.1 Biochemische Identifikation einer möglichen Präsequenz

Wird CML5-YFP in Tabakpflanzen überexprimiert und werden anschließend aus diesen Pflanzen Mikrosomen isoliert, so lässt sich im Western Bot feststellen, dass das Protein in zwei unterschiedlichen Größen vorliegt (Abbildung 7 A,  $\alpha$ -GFP). Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine abspaltbare Präsequenz vorliegt, dieser Prozess jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht vollständig abläuft. Die Ergebnisse aus 3.1.2.5 zeigen, dass CML5-YFP in Endosomen lokalisiert ist. Der gängigste Weg, um in die Endosomen zu

gelangen, führt über das ER. Proteinen, die in das ER importiert werden, weisen häufig eine Signalsequenz auf, die im Zuge der Translokation abgespalten wird. So entsteht aus dem Präprotein ein kleineres, matures Protein (Alberts, Johnson et al. 2007).

Um zu überprüfen, ob das kleinere der beiden Proteine dadurch entsteht, dass das Volllängeprotein prozessiert wird, wurde CML5-YFP in verschiedenen Systemen überexprimiert und über den YFP-Tag aufgereinigt. Hierfür wurde eine Affinitätschromatographie an GFP-Trap durchgeführt (siehe 2.2.2.4). In der ersten Spur in Abbildung 11 wurde CML5-YFP aus stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen (siehe 2.1.3) aufgereinigt. Durch die große Proteinmenge lässt sich nicht eindeutig feststellen, ob CML5-YFP auch in dieser Aufreinigung in beiden Größen auftritt. Es scheint allerdings eindeutig mehr des kleineren Proteins vorhanden zu sein. Dies wurde später zur N-terminalen Sequenzierung genutzt (siehe unten).

Die anderen beiden Spuren in Abbildung 11 zeigen einen Vergleich des aufgereinigten CML5-YFP Proteins aus transient transformierten *N. benthamiana* Pflanzen und aus *E. coli* Zellen. Da es sich bei *E. coli* Zellen um Prokaryoten handelt, die kein ER besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass eine zum Import bestimmte Signalsequenz nicht abgespalten wird. Die gleiche Größe des aus Pflanzen und *E. coli* aufgereinigten Proteins legt nahe, dass die zweite, in Pflanzen sichtbare Bande nicht durch die Prozessierung einer Präsequenz entsteht.



**Abbildung 11:** SDS-Gelelektrophoretische Analyse durch GFP-Trap aufgereinigtem CML5-YFP aus *A. thaliana*, *N. benthamiana* und *E. coli*.

In *A. thaliana* und *N. benthamiana* Blättern bzw. *E. coli* exprimiertes CML5-YFP wurde über GFP-Trap Agarose aufgereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert. Erste Spur: CML5-YFP aus stabil transformierten *A. thaliana* Blättern. Zweite Spur: CML5-YFP aus transient transformierten *N. benthamiana* Blättern. Dritte Spur: CML5-YFP aus *E. coli* Zellen.

Dies wurde weiterhin dadurch untersucht, dass aus stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen, aufgereinigtes CML5-YFP (Abbildung 11 Spur 1) durch Edman-Abbau N-terminal sequenziert wurde (durchgeführt von TOPLAB Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, Martinsried, Deutschland). Die N-terminale Sequenzierung durch den Edman-Abbau ergab jedoch kein eindeutiges Ergebnis, da für jede sequenzierte Position vier mögliche Aminosäuren ermittelt werden konnten (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Liste der möglichen Aminosäuren an den Positionen 1-5 am N-terminus von CML5, die durch den Edman-Abbau ermittelt wurden.

Position	Mögliche Aminosäuren
1	Q ,G ,K ,S
2	P, G , L, A
3	V, I, E, D
4	G, N, V, T
5	D, P, K, L

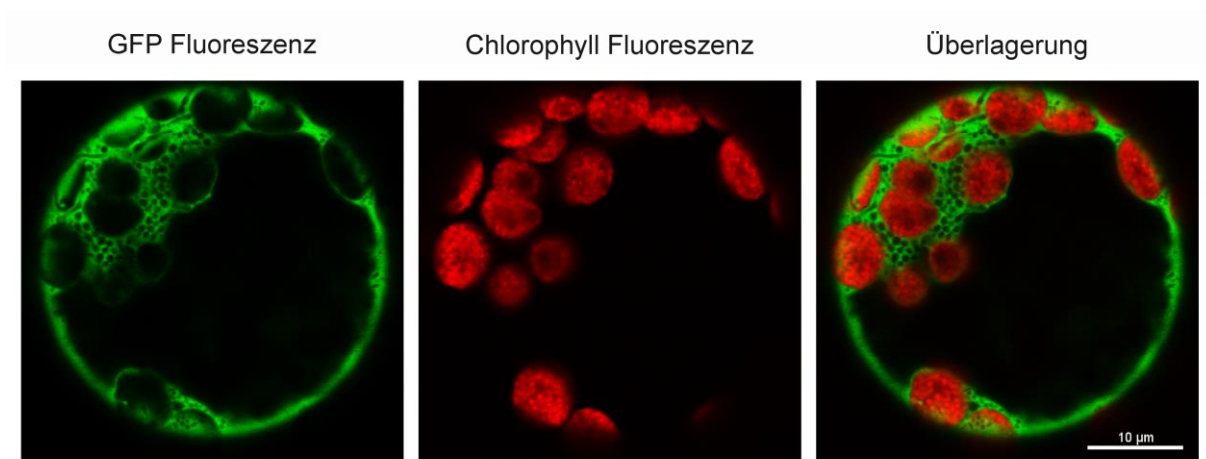
Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, gibt es in der Aminosäuresequenz von CML5 keine eindeutige Position, die zu den ermittelten Aminosäuren passt. Ab der 17. Aminosäure gibt es eine Sequenz, die in vier von fünf Positionen mit den ermittelten Aminosäuren übereinstimmt (Abbildung 12 rote Kennzeichnung). In diesem Fall würde das sequenzierte Protein bei der 17. Aminosäure des Proteins beginnen. Hier würde es sich um ein Serin handeln. Bei dieser Sequenz stimmt nur die 20. Aminosäure nicht mit den sequenzierten Aminosäuren überein. Hier müsste ein Prolin sequenziert werden, was nicht der Fall war. Eine genauere Analyse der Sequenzierungsdaten zeigte allerdings, dass ein Prolin an dieser Position nicht ausgeschlossen werden kann. So wäre es möglich, dass das sequenzierte, verkürzte CML5 Protein an der 17. Aminosäure des Volllänge Proteins beginnt. Das hieße, dass die Aminosäuren 1-16 von CML5 an dem sequenzierten Protein fehlen.

```
MVRIFLLYNILNSFLLSLVPKLRTLFPLSWFDKTLHKNSPPS
PSTMLPSPSSSSAPTQRIDPSELKRVFQMFQKNGDGRIITKEEL
NDSLENLGIYIPDKDLTQMIHKIDANGDGCVDIDEFESLYSSI
VDEHHNDGETEEEDMKDAFNVFDQDGDGFITVEELKSVMASLG
LKQGKTLDGCKKMIMQVDADGDGRVNYKEFLQMMKGGGFSSN
```

**Abbildung 12: Aminosäuresequenz von CML5.**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von CML5. In Rot hervorgehoben sind die Aminosäuren, die möglicherweise durch den Edman-Abbau sequenziert wurden.

Das Protein, das für die N-terminale Sequenzierung verwendet wurde, stammt aus einer mit CML5-YFP stabil transformierten *A. thaliana* Linie. Hierfür wurde CML5-YFP mit Hilfe von Agrobakterien in das Genom der Pflanzen eingebaut. Um zu überprüfen, ob CML5-YFP in dieser Pflanze korrekt lokalisiert ist, wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass eine große Menge von CML5-YFP im Zytosol auftritt. Durch die Stärke des Signals ist nicht zu erkennen, welcher Anteil des Proteins eventuell in den LEs lokalisiert ist. Diese Fehllokalisierung könnte durch die durchgehende, starke Expression des Konstruktes verursacht sein. Bei dem sequenzierten Protein könnte es sich auch um ein verkürztes Konstrukt handeln. Dies würde die Lokalisierung im Zytosol zwar erklären, aber nicht, wieso es zu einem falschen Expressionsbeginn kommt.



**Abbildung 13: Fluoreszenzanalyse von Protoplasten aus stabil mit CML5-YFP transformierten *A. thaliana* Pflanzen.**

Aus *A. thaliana* Pflanzen, die stabil mit pBIN-CML5-YFP transformiert wurden, wurden Protoplasten isoliert und die Lokalisierung von CML5-YFP durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) überprüft. Erstes Bild: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5-YFP. Zweites Bild: Fluoreszenz von Chlorophyll. Drittes Bild: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

Dadurch, dass zumindest ein Großteil des in der stabilen Pflanzen Linie exprimierten CML5-YFP nicht richtig lokalisiert ist, können die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung nicht als Hinweis für die Abspaltung einer Präsequenz angesehen werden.

### 3.1.3.2 Untersuchung zur Membranassoziation

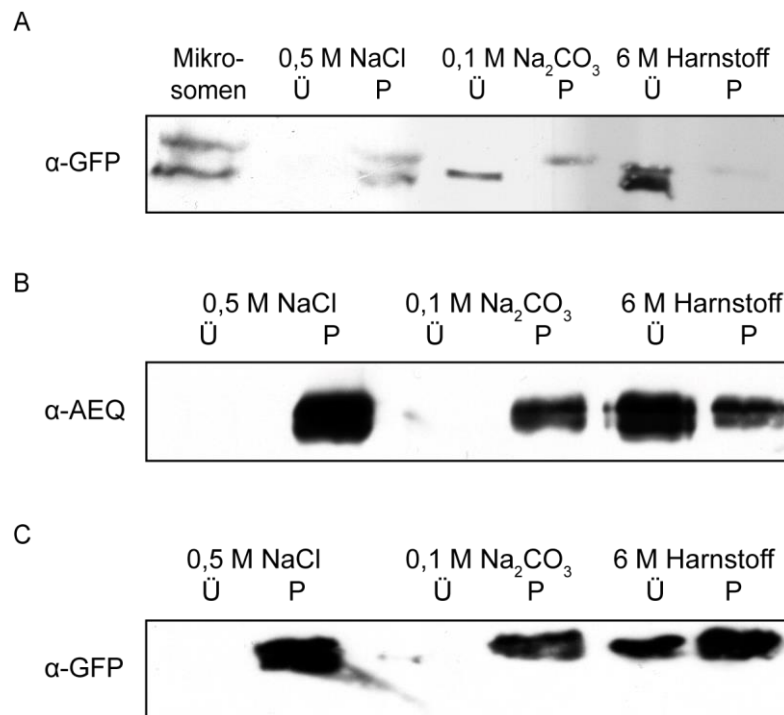
Hier nicht dokumentierte Vorversuche hatten Hinweise auf eine mögliche Membranverankerung von CML5 ergeben. Dies kann durch Anhängen eines hydrophoben Membranankers oder durch die Präsenz einer Transmembran-Domäne erfolgen. Da der CaM-ähnliche Bereich von CML5 eine solche Domäne nicht zulässt, müsste eine solche Domäne im N-terminalen Bereich des Proteins liegen.

Um eine mögliche Membranassoziation von CML5-YFP zu untersuchen, wurde das Protein transient in *N. benthamiana* Mesophyllzellen exprimiert und die Membranproteine daraus isolierter Mikrosomen durch Waschen der Membranen mit verschiedenen Chemikalien nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften getrennt (Rolland, Ferro et al. 2006). Das Waschen der Membranen erfolgte mit 0,5 M NaCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bzw. mit 6 M Harnstoff. Dabei gilt im Allgemeinen, dass Proteine, die sich durch Waschen der Membran mit einer NaCl oder einer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung von den Membranen lösen lassen, eher schwach mit den

behandelten Membranen assoziiert sind. So zerstört die Behandlung mit einer NaCl-Lösung die elektrostatischen Interaktionen von peripheren Membranproteinen mit integralen Membranproteinen oder den polaren Köpfen von Lipiden. Deswegen werden vor allem peripher assoziierte Membranproteine gelöst (Rolland, Ferro et al. 2006). Die pH-abhängige Behandlung, wie zum Beispiel mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , löst nicht nur periphere Membranproteine, sondern auch Proteine, die durch einen Fettsäureanker an die Membran gebunden sind sowie Proteine, die durch hydrophobe Wechselwirkungen mit integralen Membranproteinen interagieren oder in den Membranmonolayer „eintauchen“ (Rolland, Ferro et al. 2006). Des Weiteren werden durch die Behandlung von Mikrosomen mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auch die geschlossenen Vesikel geöffnet und dadurch die in den Vesikeln enthaltenen Proteine entfernt.

Nach diesen Behandlungen sollten daher integrale Membranproteine weiterhin in den Membranfraktionen vorzufinden sein. Die meisten dieser Membranproteine wiederum können durch eine Behandlung mit einer Harnstoff-Lösung aus der Membran gelöst werden, da Harnstoff in hoher Konzentration die Sekundärstruktur vieler Proteine und Membranen zerstört (Juliano and Rothstein 1971).

Für die Durchführung des Versuchs wurden die isolierten Mikrosomen, die aus Pflanzen, die CML5-YFP exprimierten, isoliert wurden, in 0,5 M NaCl-, 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - bzw. 6 M Harnstoff-Lösung resuspendiert und inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen von den löslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe 2.2.3.6). In der ersten Spur der Abbildung 14A ist zu erkennen, dass CML5 in den Mikrosomen, wie schon unter 3.1.2.3 beobachtet, in zwei unterschiedlichen Größen auftritt. Nach der Behandlung der Mikrosomen mit NaCl sind beide Proteine noch vollständig in der Membranfraktion zu finden. Das ist daran zu erkennen, dass im Überstand keines der beiden Proteine nachgewiesen werden kann. Nach Behandlung der Mikrosomen mit einer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung lässt sich das kleinere der beiden Proteine im Überstand nachweisen. Im Membranpellet ist nur noch das größere der beiden Proteine nachweisbar. Werden die Mikrosomen allerdings mit einer Harnstoff-Lösung behandelt, so werden beide Proteine aus der Membran gelöst und sind im Überstand zu finden. Es bleibt nur ein sehr geringer Teil des größeren Proteins im Pellet nachweisbar.



**Abbildung 14: Western Blot Analyse der Untersuchung zur Membranassoziation von CML5 (A), OEP7-YFP-AEQ (B) und CML5<sub>1-29</sub>-YFP (C).**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit pBIN-CML5-YFP (A), pBIN-OEP7 YFP-AEQ (B) oder pBIN-CML5<sub>1-29</sub>-YFP (C) transformiert und nach 36 Stunden wurden Mikrosomen bzw. Chloroplasten isoliert. Diese wurden anschließend mit 0,5 M NaCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH11, 5 (4°C, 10 min) oder 6 M Harnstoff (Urea) (Raumtemperatur, 20 min) behandelt. Anschließend wurde durch Zentrifugation die Membran (P) von löslichen Bestandteilen (Ü) getrennt und alle Fraktionen durch SDS-PAGE, Western Transfer und Detektion durch die Antikörper  $\alpha$ -GFP bzw.  $\alpha$ -AEQ, analysiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass zumindest das größere der beiden Proteine in der Membran der Endosomen verankert ist, da es sich auch nicht mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aus dem Pellet lösen lässt und selbst mit Harnstoff noch teilweise im Pellet zu finden ist. Das kleinere der beiden CML5 Proteine befindet sich entweder in den Mikrosomen oder ist schwächer mit der Membran assoziiert, da es sich mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aus dem Pellet lösen lässt und im Überstand nachweisbar ist. Das kann entweder daran liegen, dass das Protein in den Mikrosomen war und diese jetzt geöffnet wurden oder die Verankerung an der Membran nicht so stark war, dass sie der Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Behandlung standgehalten hätte.

Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit OEP7 (outer envelope protein 7) durchgeführt. Dieses Protein ist in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert und mit einer membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helix, die am N-terminus des Proteins lokalisiert ist, in der Membran verankert (Schleiff, Tien et al. 2001) Da dieses Protein in den Chloroplasten

lokalisiert ist, wurden diese aus Tabakpflanzen, die OEP7-YFP-AEQ transient überexprimierten, isoliert und anschließend der gleichen Behandlung unterzogen wie die Mikrosomen. Auch OEP7-YFP lässt sich weder durch das Waschen mit NaCl- oder Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung aus der Membran lösen. In Abbildung 14B ist das daran zu erkennen, dass bei beiden Behandlungen OEP7 im Pellet vorzufinden ist. Bei der Behandlung mit Harnstoff-Lösung löst sich allerdings ein Großteil des Proteins von den Membranen und ist im Überstand nachweisbar. Dieses Experiment zeigt, dass sich das größere der beiden CML5 Varianten ähnlich verhält wie OEP7, was nahe legt, dass CML5 in ähnlicher Form wie OEP7 in der Membran verankert ist.

Wie unter 3.1.1 beschrieben, unterscheidet sich CML5 von anderen CMLs durch eine N-terminale Verlängerung. Teile dieser Sequenz könnten also für die Membranverankerung verantwortlich sein, sofern es sich nicht um eine Signalsequenz handelt, die abgespalten wird. Dass die Größere der beiden CML5 Formen stärker an die Membran gebunden ist, deutet daraufhin, dass es sich nicht um eine abspaltbare Signalsequenz, sondern um die für die Membranverankerung verantwortliche Sequenz handelt. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde der gesamte Versuch mit einem Konstrukt wiederholt, bei dem die ersten 29 Aminosäuren von CML5 mit YFP fusioniert waren (CML5<sub>1-29</sub>-YFP. Für dieses kurze Teilstück des Proteins erhält man die gleichen Ergebnisse wie für das größere der beiden CML5-YFP Proteine. Mit NaCl und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung lässt sich CML5<sub>1-29</sub>-YFP nicht von den Membranen lösen (Abbildung 14C). Erst durch die Behandlung mit Harnstoff-Lösung lässt sich ein Teil des Proteins von den Membranen lösen und ist im Überstand nachweisbar (Abbildung 14C, Spur 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass die ersten 29 Aminosäuren von CML5 für die Membranverankerung verantwortlich sind. Dies legt nahe, dass es sich nicht um eine abspaltbare Signalsequenz handelt.

### 3.1.3.3 Fluoreszenzuntersuchungen zur Membranverankerung

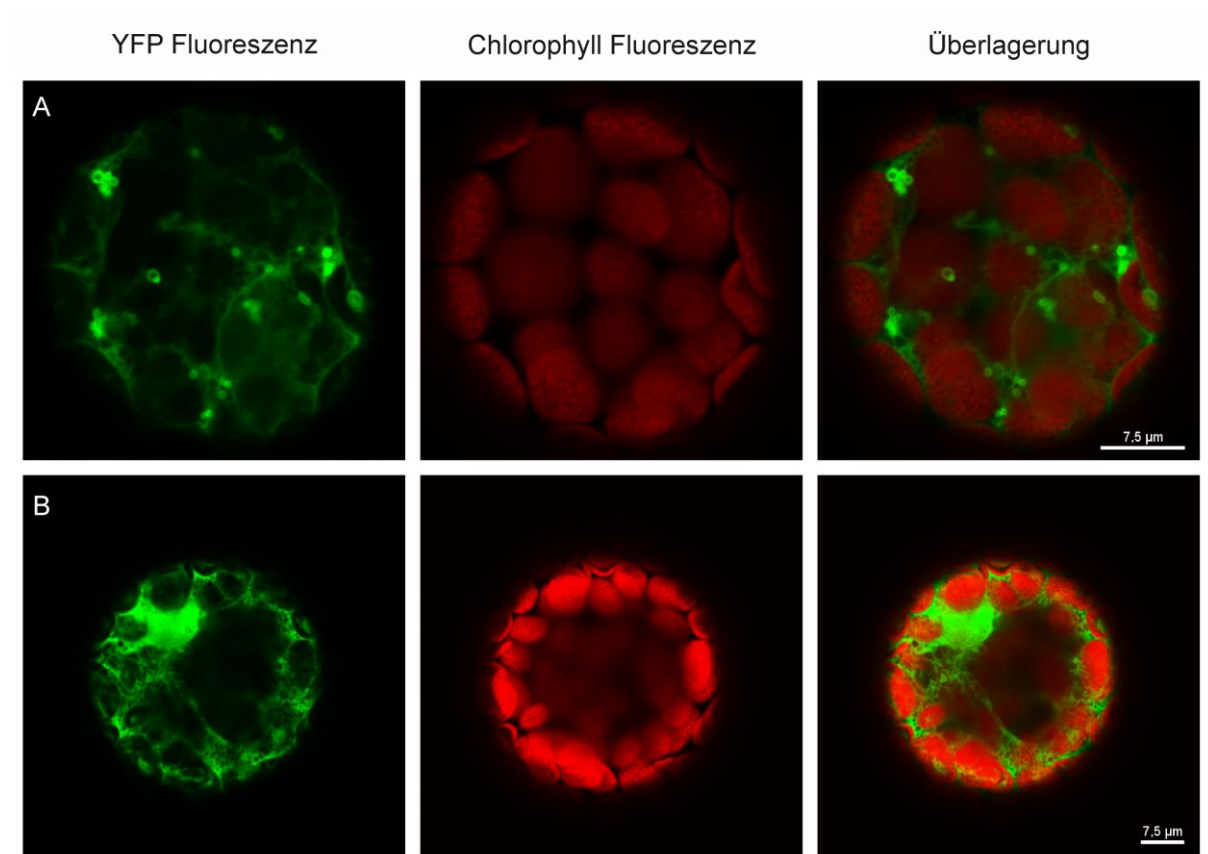
Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass CML5 in der Membran der Endosomen verankert ist. Zudem legen die Versuche nahe, dass hieran zumindest ein Teil der ersten 29 Aminosäuren des Proteins beteiligt ist, da dieser allein YFP in der Membran verankern kann. Um zu überprüfen, ob das kurze Teilstück aus den Aminosäuren 1-29 von CML5 ausreicht, um das Protein korrekt in den Endosomen zu lokalisieren, wurden CML5<sub>1-29</sub>-YFP und auch CML5<sub>Δ1-27</sub>-YFP exprimierende *N. benthamiana* Zellen auch fluoreszenzmikroskopisch



analysiert. Bei CML5 $\Delta$ 1-27-YFP handelt es sich um ein verkürztes Konstrukt, bei dem die ersten 27 Aminosäuren fehlen, die wahrscheinlich für die Membranverankerung verantwortlich sind.

In Abbildung 15A ist zu erkennen, dass das YFP-Signal von CML5<sub>1-29</sub>-YFP ähnlich dem Signal des Volllänge Proteins in kleinen Kringeln auftritt (Abbildung 3). Dieses Ergebnis zeigt, dass die N-terminale Verlängerung von CML5 (AS 1-29) tatsächlich für die korrekte Lokalisierung des Proteins ausreicht.

Im Falle von CML5 $\Delta$ 1-27-YFP ist das Fluoreszenzsignal gleichmäßig im Zytosol verteilt (Abbildung 15B). Dies deutet eindeutig darauf hin, dass das Protein nicht in die Endosomen gelangen kann, und legt nahe, dass die Lokalisierung von CML5 in den Endosomen exklusiv durch die ersten 29 Aminosäuren bestimmt wird.



**Abbildung 15: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten, die CML5<sub>1-29</sub>-YFP bzw. CML5 $\Delta$ 1-27-YFP exprimieren.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit pBIN-CML5<sub>1-29</sub>-YFP (A) bzw. pBIN-CML5 $\Delta$ 1-27-YFP (B) transformiert und nach 36 Stunden Expression anschließend daraus Protoplasten isoliert. Diese wurden mittels Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erstes Bild: YFP

Fluoreszenz der Fusionsproteinen CML5<sub>1-29</sub>-YFP bzw. CML5<sub>Δ1-27</sub>-YFP. Zweites Bild: Fluoreszenz von Chlorophyll. Drittes Bild: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

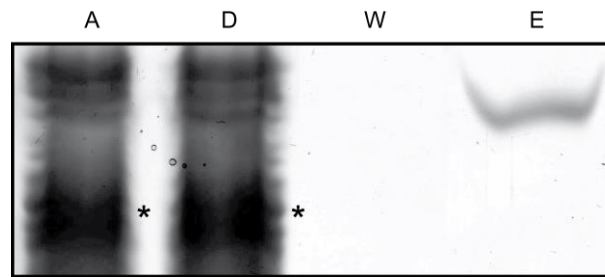
### 3.1.4 *In vitro* Funktionsanalyse

Wie unter 1.2 besprochen, unterscheiden sich CMLs von klassischen CaMs durch eine größere Variabilität der Aminosäuresequenz. So sind die Sequenzen der CMLs mit den Sequenzen der klassischen CaMs höchstens zu 50 % identisch und CML5 weist zum Beispiel nur 38,9 % identische Aminosäuren mit CaM4 auf (siehe Tabelle 4). Andererseits zeigt die Sequenzanalyse von CML5 eine deutliche Konservierung aller beider, durch eine Linkerregion verbundenen EF-Hand Paare in CML5 (Abbildung 1). Um festzustellen, ob CML5 tatsächlich wie ein klassisches CaM funktionieren kann, wurden einige Eigenschaften getestet, die für klassische CaMs bekannt und charakteristisch sind.

#### 3.1.4.1 Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung an Phenylsepharose

Binden klassische CaMs Ca<sup>2+</sup>-Ionen, so ändert sich die Konformation des CaMs und dadurch wird ein hydrophober Proteinbereich im Inneren des gefalteten Proteins zugänglich gemacht (DeFalco, Bender et al. 2010). Durch diesen hydrophoben Proteinbereich ist es möglich, das CaM an eine hydrophobe Matrix, wie zum Beispiel Phenylsepharose, zu binden (Gopalakrishna and Anderson 1982).

Um die Bindung von CML5 an Phenylsepharose zu untersuchen, wurde das Protein zunächst mit einem 6xHistidin-Tag versehen und in *E. coli*-Zellen exprimiert. Da die Expression in dieser Form mit dem Volllänge-Protein nicht funktionierte, wurde das um die Präsequenz verkürzte Konstrukt CML5<sub>Δ1-27</sub>-His verwendet. Nach der Expression wurde ein Zelllysats hergestellt und in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen mit Phenylsepharose inkubiert. Anschließend wurde die Phenylsepharose gewaschen und mit Puffer, der EDTA enthielt, eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass CML5 im Zelllysats vorhanden ist (A, Stern). Auch nach der Inkubation des Zelllysats mit Phenylsepharose ist noch CML5<sub>Δ1-27</sub> im Zelllysats vorhanden, was zeigt, dass nur ein Teil des vorhandenen Proteins an die Phenylsepharose gebunden hat (D, Stern). Das Waschen der Phenylsepharose entfernte nicht gebundene Proteine, was daran zu erkennen ist, dass die dritte Spur leer ist. In der vierten Spur ist zu sehen, dass ein Teil des gebundenen CML5 an die Phenylsepharose gebunden hatte und durch die Zugabe von EDTA eluiert werden konnte.



**Abbildung 16: Affinitätschromatographie von rekombinantem CML5<sub>Δ1-27</sub>-His an Phenylsepharose.**

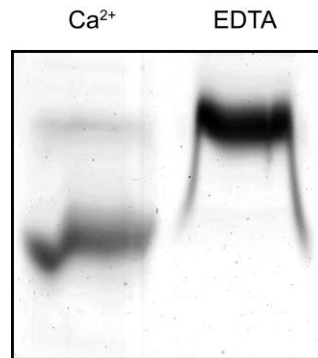
Nach Expression von CML5<sub>Δ1-27</sub> mit einem 6xHistidin Tag (His-Tag) in *E. coli* wurde das Protein über eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose aufgereinigt. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und anschließende Coomassie Färbung. (A) Auftrag auf die Phenylsepharose (D) Durchlauf (W) letzter Waschschritt (E) Eluat (\*) CML5 in A und D.

Es konnte also gezeigt werden, dass CML5, wie ein klassisches Calmodulin, in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an Phenylsepharose binden kann und nach Komplexierung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch EDTA von der Säule eluiert.

### 3.1.4.2 Untersuchung zur veränderten Mobilität durch Ca<sup>2+</sup>-Bindung

Eine weitere Eigenschaft klassischer CaMs ist ein verändertes Laufverhalten auf Polyacrylamidgelen in Anwesenheit von Kalzium (Garrigos, Deschamps et al. 1991).

Um zu überprüfen, ob CML5 durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen seine Mobilität verändert, wurde CML5<sub>Δ1-27</sub>-His in An- und Abwesenheit von Kalzium im Probenpuffer über SDS-PAGE aufgetrennt. In Spur eins von Abbildung 17 ist deutlich zu erkennen, dass CML5<sub>Δ1-27</sub>-His bei Zugabe von Kalzium schneller wandert als in Spur zwei in Abwesenheit von Kalzium.



**Abbildung 17: Untersuchung zum verändertem Laufverhalten von CML5<sub>Δ1-27</sub>-His verursacht durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen.**

In *E. coli* exprimiertes CML5<sub>Δ1-27</sub>-His wurde über hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose aufgereinigt. Anschließend wurde ein Ansatz mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Spur 1, Ca<sup>2+</sup>) versetzt und der andere mit 5 mM EDTA/EGTA (Spur 2, EDTA) und die Mobilität im SDS-PAGE analysiert.

Aus den vorangegangenen Versuchen ist zu erkennen, dass sich CML5<sub>Δ1-27</sub>-His wie ein klassisches Calmodulin verhält. Durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen verändert sich das Laufverhalten auf der SDS-PAGE. Die Funktionsweise der CaM-Domänen von CML5 unterscheidet sich nicht von der Funktionsweise klassischer CaMs.

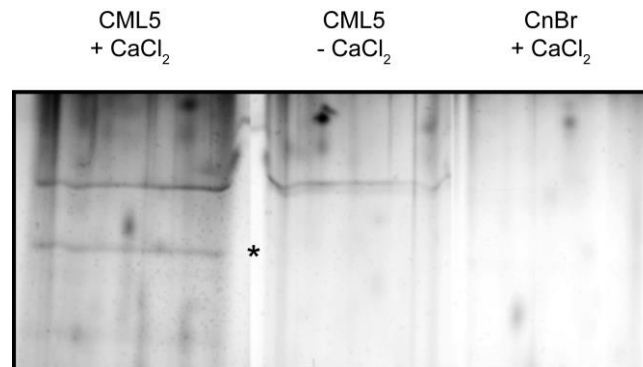
### 3.1.5 Identifikation möglicher Interaktionsproteine

Die Funktion von CML5 ist offensichtlich die eines klassischen CaMs. Um die Frage zu klären, welche Mechanismen in der Zelle durch CML5 beeinflusst werden, sollten mögliche Interaktionsproteine von CML5 identifiziert werden.

Dazu wurde aufgereinigtes CML5<sub>Δ1-27</sub>-His an CnBr-Sepharose gekoppelt. Anschließend wurde diese Matrix für eine Affinitätschromatographie mit löslichem Mikrosomenextrakt aus *A. thaliana* in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium verwendet. So sollten Proteine identifiziert werden, die spezifisch in der Anwesenheit von Kalzium mit CML5 interagieren. Zusätzlich wurde leere CnBr-Sepharose eingesetzt, um so eine unspezifische Bindung von Proteinen an die Matrix selber zu detektieren.

In Abbildung 18 ist zu sehen, dass an die leere CnBr-Sepharose keine Proteine aus dem Mikrosomenextrakt binden (dritte Spur). In der ersten sowie auch in der zweiten Spur sind gebundene Proteine zu erkennen. Proteine, die sowohl in der ersten sowie auch in der zweiten Spur auftauchen, scheinen unabhängig von Kalzium an CML5 zu binden. Allerdings ist auch

ein Protein zu erkennen, das ausschließlich in der ersten Spur in Abbildung 18 auftaucht und somit nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an CML5 bindet. Dieses Protein wurde mittels LC MS/MS als At1g72150 oder auch Patellin1 identifiziert.



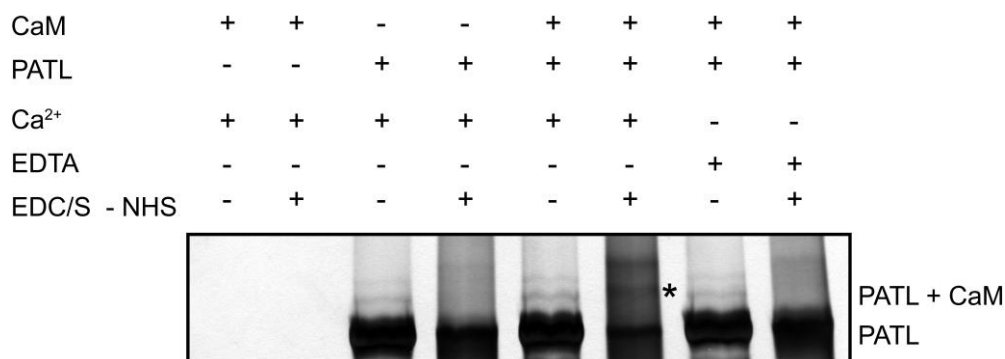
**Abbildung 18. : Isolation möglicher Interaktionsproteinen von CML5 aus *A. thaliana* Mikrosomenextrakt.**

In *E. coli* exprimiertes CML5 $_{\Delta 1-27}$ -His wurde durch eine Interaktionschromatographie an Phenylsepharose aufgereinigt und an CnBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Das an CnBr-Sepharose gekoppelte Protein wurde in An- bzw. Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit Mikrosomenextrakt aus *A. thaliana* inkubiert. Nach der Elution mit EDTA bzw.  $\text{CaCl}_2$  wurde erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung.

### 3.1.5.1 Quervernetzung von Patellin1 und Calmodulin

Nach der Identifikation von Patellin1 (PATL) als mögliches Interaktionsprotein von CML5, stellt sich die Frage, ob das Protein überhaupt eine Calmodulinbindestelle aufweist und dadurch in der Lage ist, an CaM zu binden. Um das zu überprüfen, wurden Quervernetzungsversuche mit Rinderhirn-Calmodulin durchgeführt. Dazu wurde PATL als Fusionsprotein mit GST (PATL-GST) heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Das aufgereinigte PATL-GST wurde anschließend entweder alleine oder in Kombination mit exogenem Rinderhirn-CaM jeweils in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium inkubiert. Nach Teilung des Reaktionsansatzes wurde die eine Hälfte quervernetzt, während die andere unbehandelt blieb. Die Quervernetzung wurde mit dem 0 Å-Quervernetzungsreagenz EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid Hydrochlorid) durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit SDS-Solubilisierungspuffer erfolgte die Analyse der Quervernetzungsreaktion durch SDS-PAGE und anschließende Silber-Färbung.

Wurde rekombinantes PATL zusammen mit CaM in einem Reaktionsansatz in Anwesenheit von Kalzium inkubiert, konnte neben dem monomeren PATL im Vergleich zu der mit EDC-unbehandelten Probe (Abbildung 19, Spur 5+6) noch eine weitere Bande bei ca. 145 kDa detektiert werden. Diese Bande könnte von der Größe her das Quervernetzungsprodukt zwischen PATL-GST und CaM darstellen. Wurde nun rekombinantes PATL-GST alleine in einem Reaktionsansatz in Anwesenheit von Kalzium inkubiert, konnte in mit EDC-behandelten sowie unbehandelten Probe ausschließlich das monomere PATL bei etwa 130 kDa detektiert werden (Abbildung 19, Spur 3+4). Eine weitere Kontrolle war die Inkubation von CaM alleine mit EDC (Abbildung 19, Spur 1+2). Auch hier konnten keine Banden auf der Höhe der PATL-GST-CaM- Quervernetzungsprodukt detektiert wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es zu einer Interaktion zwischen PATL-GST und CaM kommt und dass diese Interaktion spezifisch ist. Anschließend wurde untersucht, ob die Interaktion von PATL-GST und CaM von Kalzium beeinflusst wird. Deshalb wurde das rekombinante PATL-GST und CaM in Abwesenheit von Kalzium mit EDC inkubiert (Abbildung 19, Spur 8). Hierbei war kein Quervernetzungsprodukt zu sehen. Dies lässt den Schluss zu, dass PATL kalziumabhängig an CaM bindet.



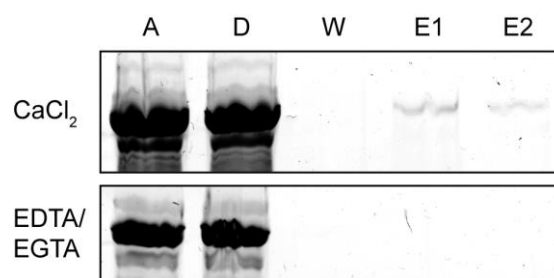
**Abbildung 19: Quervernetzungsversuch zwischen Patellin1 aus *E. coli* und Rinderhirn-Calmodulin.**

Rekombinantes Patellin1 wurde in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium mit Rinderhirn-Calmodulin und dem 0Å Quervernetzungsreagenz EDC/S-NHS versetzt und inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Ladepuffer gestoppt und die Proben durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. CaM: Rinderhirn-Calmodulin, PATL: Patellin1, PATL+CaM: Komplex aus rekombinaten PATL und Rinderhirn-Calmodulin.

### 3.1.5.2 Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose

Um die mögliche kalziumabhängige Interaktion von PATL mit CaM weiter zu überprüfen, wurde eine Affinitätschromatographie von PATL-GST an CaM-Agarose durchgeführt. Hierfür wurde aufgereinigtes PATL-GST für eine Affinitätschromatographie an CaM-Agarose in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium verwendet. Die Elution gebundener Proteine erfolgte dabei durch einen Überschuss exogenen CaMs. Durch diese Art der Elution wird verhindert, dass unspezifisch an die Agarose-Matrix gebundene Proteine eluiert werden.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass sowohl in der Probe mit Kalzium sowie auch in der Probe ohne Kalzium PATL-GST vorhanden ist (Spur A und D). Bei Spur A handelt es sich um lysierte *E. coli* Zellen, die PATL-GST exprimiert haben. Dieses Lysat wurde mit der CaM-Agarose in An-bzw. Abwesenheit von Kalzium inkubiert. Bei Spur D handelt es sich um den Durchlauf nach der Inkubation des Lysats mit der CaM-Agarose. Die Menge von PATL-GST in Spur D unterscheidet sich auch in dem Versuchsansatz in Anwesenheit von Kalzium kaum von dem Ansatz ohne Kalzium. Dies und die Tatsache, dass auch die Eluate 1 und 2 (E1 und E2) nur eine schwache Protein-Bande zeigen, deuten darauf hin, dass die Bindung von PATL-GST an die CaM-Agarose auch in Anwesenheit von Kalzium eher schwach ausgeprägt ist. Bei beiden Versuchsansätzen ist im letzten Waschschrift kein Protein mehr zu sehen, was zeigt, dass Proteine, die jetzt noch an die CaM-Agarose gebunden sind, eine spezifische Bindung aufweisen. Es konnte also gezeigt werden, dass PATL-GST in Anwesenheit von Kalzium an CaM-Agarose bindet, auch wenn diese Bindung eher schwach zu sein scheint.



**Abbildung 20: Affinitätschromatographie von Patellin1 an Calmodulin-Agarose.**

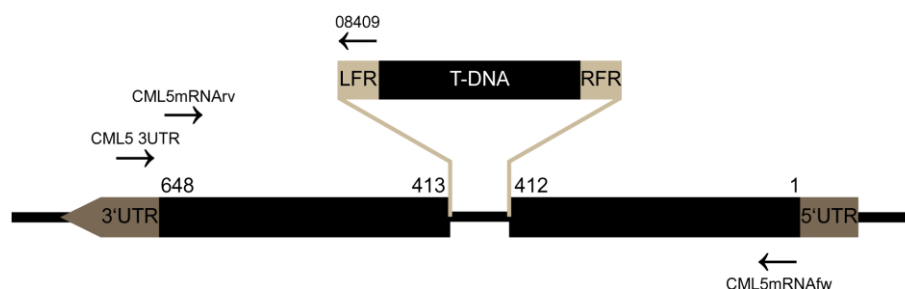
Lysierte *E. coli* Zellen, die PATL-GST exprimierten, wurden in An.-bzw. Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit CaM-Agarose inkubiert. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von Rinderhirn-Calmodulin. Anschließend wurde das Ergebnis durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Die vorhergegangenen Experimente zeigen, dass PATL in der Lage ist, kalziumabhängig CaM zu binden und es sich hierbei um einen möglichen Interaktionspartner von CML5 handelt.

### 3.1.6 *In planta* Untersuchungen zur Funktion von CML5

Eine weitere Methode, mehr über die Funktion von CML5 zu erfahren, ist die Analyse von Pflanzen mit Verlust oder starker Reduktion der CML5 Expression (knock-out bzw. knock-down Mutanten). Häufig zeigen solche Linien einen sichtbaren Phänotyp, der Aufschluss darüber gibt, in welchem Regelkreis das Protein aktiv ist (Kuromori, Takahashi et al. 2009). Erzeugt werden knock-out-Mutanten bei *A. thaliana* durch die Insertion von, einigen tausend Basenpaar langen, DNA-Fragmenten in das Genom der Pflanzen. Dies geschieht mit Hilfe von Agrobakterien, die ein DNA-Fragment (T-DNA) an einem zufälligen Ort in das Genom der Pflanzen inserieren. Dadurch können ggf. einzelne Gene zerstört werden. Da diese Insertion zufällig passiert, muss nach der Insertion der genaue Insertionsort bestimmt und überprüft werden, ob das betroffene Gen tatsächlich inaktiviert wurde. Dazu gibt es eine Anzahl von Mutanten-Kollektionen, in denen Linien mit Informationen über den jeweiligen wahrscheinlichen Insertionsort hinterlegt sind. Dies muss jedoch im Einzelnen immer bestätigt werden.

Für CML5 wurde die Linie GABI-Kat 703E02 verwendet. Bei dieser Linie handelt es sich um den Ökotyp Columbia, der mit einer T-DNA im Vektor pGABI1 transformiert wurde (weitere Informationen zum Plasmid sind über die GABI-Kat Web Seite zu beziehen, <http://www.gabi-kat.de/faq/vector-a-primer-info.html>).

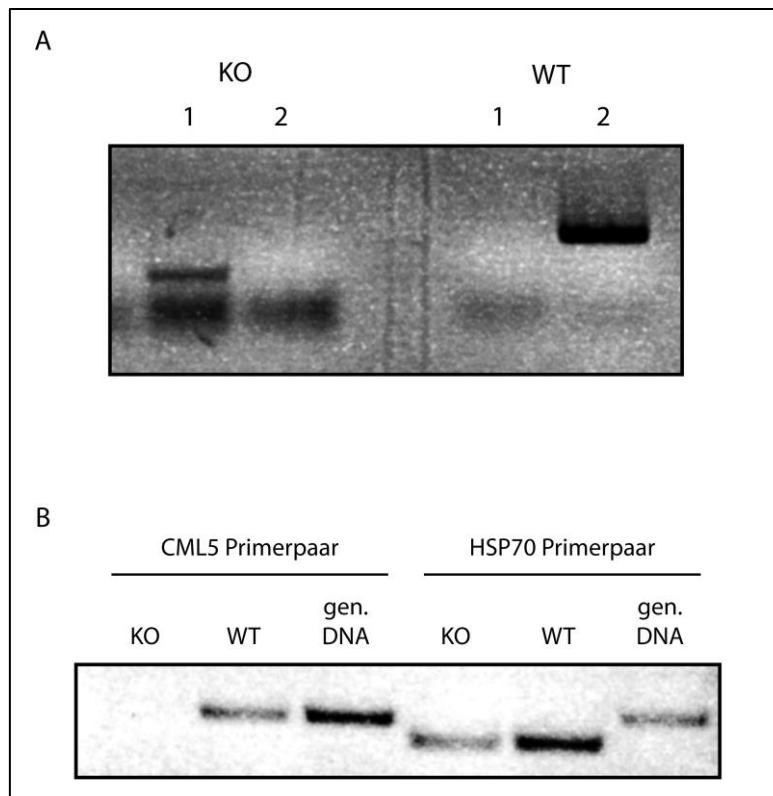


**Abbildung 21: Schematische Darstellung der T-DNA Insertion im Genom der GABI-Kat Linie 703E02 und Bindungsstellen der verwendeten Primer.**

Schematische Darstellung des *CML5* Gens (Protein kodierende Sequenz symbolisiert durch schwarzen Balken), in dunkelgrau sind die 3' UTR und die 5' UTR dargestellt. Bei Basenpaar 412 ist die Insertion der T-DNA eingezeichnet. Die verwendeten Primer (mit Pfeilen dargestellt) sind gemäß ihrer Lage und Orientierung im Gen bzw. auf der T-DNA eingezeichnet.



Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, soll die T-DNA *CML5* an der Stelle des 412. Basenpaares (bp) unterbrechen. Zuerst wurde überprüft, ob bei dieser Linie tatsächlich eine T-DNA im Genom vorhanden ist und ob diese tatsächlich im Genlocus von *CML5* inseriert ist. Hierzu wurden zuerst verschiedene PCRs an genomischer DNA durchgeführt. Um nachzuweisen, ob sich eine T-DNA im Genlocus von *CML5* befindet, wurde ein Primer benutzt, der nach außen weisend auf der T-DNA bindet (08409; siehe Abbildung 21) und ein Primer, der in der 3' UTR von *CML5* liegt (*CML5* 3UTR; Abbildung 21, *CML5* verläuft in Gegenleserichtung). In Abbildung 22 A ist beispielhaft an einer Pflanze dieser Linie zu erkennen, dass diese Primerkombination bei der knock-out Mutante (KO) ein PCR Produkt der erwarteten Größe erzeugt (Abbildung 22, Spur 1). Das zeigt, dass tatsächlich eine T-DNA im Bereich des Genlocus von *CML5* inseriert ist. Eine PCR mit einem vorwärts gerichtetem Primer, der am 5'Ende des *CML5* Gens beginnt (*CML5*mRNAfw; Abbildung 21), und einem rückwärts gerichtetem Primer, der in der 3'UTR von *CML5* liegt (*CML5* 3UTR), ergab mit der genomischen DNA der knock-out Mutante hingegen kein Produkt (Abbildung 22, Spur 2). Dies bestätigt, dass die T-DNA im *CML5* Genlocus liegt und diesen unterbricht. Dass das genspezifische Primerpaar kein Produkt ergab, zeigt darüber hinaus, dass die Insertion homozygot vorliegt. Die PCR mit DNA einer Pflanze des Wildtyps ergab, wie erwartet, ein umgekehrtes Ergebnis. Das genspezifische Primerpaar generierte ein PCR Produkt, das Primerpaar aus dem genspezifischen Primer und dem Primer auf der T-DNA erzeugte kein Produkt. Aus der in Abbildung 22A dargestellten Pflanze wurden durch Selbstung Samen gewonnen. Davon wurden etwa 20 Samen zu Pflanzen herangezogen, ihre DNA isoliert und anschließend auf gleiche Weise genotypisiert (Daten nicht gezeigt). Bei allen handelte es sich, wie erwartet, um Mutanten, die entsprechend der Angaben von GABI-Kat tatsächlich homozygot bezüglich der Insertion sind.



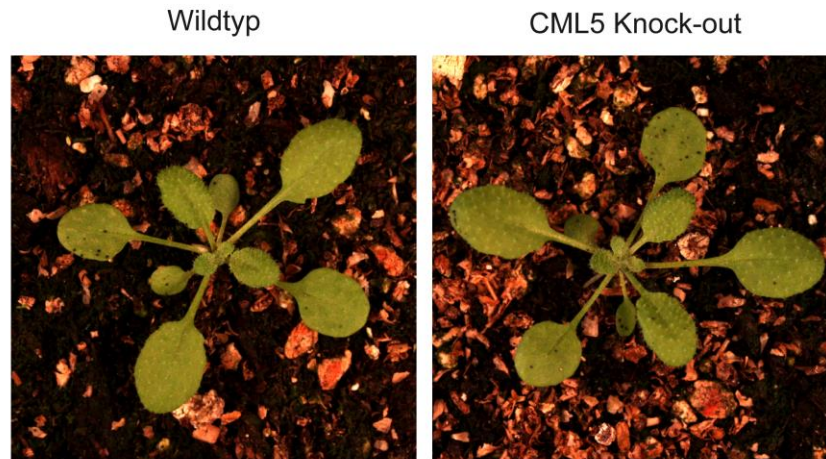
**Abbildung 22: Genotypische Untersuchungen zur T-DNA Insertionslinie GABI-Kat 703E02 .**

(A): PCR mit genomische DNA aus der CML5 knock-out Mutante (KO) bzw. aus einer Wildtyp Pflanze (WT). Die PCR wurde mit genspezifischen Primer (1) und mit einer Kombination aus genspezifischen und auf der T-DNA liegenden Primern (2). (B) PCR mit cDNA aus der knock-out Mutante (KO), aus einer Wildtyp Pflanze (WT) und genomischer DNA als Kontrolle (gen. DNA).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei den Pflanzen der Linie GABI-Kat 703E02 tatsächlich um homozygote knock-out Mutanten von *CML5* (*cml5*) handelte, wurde anschließend überprüft, ob durch die T-DNA Insertion im Genlocus von *CML5*, die Transkription und Translation von *CML5* so gestört wurde, dass keine vollständige mRNA von *CML5* mehr nachzuweisen ist. Dazu wurde aus Mutanten- und Wildtyppflanzen mRNA isoliert und diese revers in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mittels PCR nachgewiesen, ob ein cDNA Produkt für *CML5* vorhanden ist. In Abbildung 22 B ist zu sehen, dass eine PCR mit genspezifischen Primern, wobei der vorwärts-Primer am 5'Ende und der rückwärts-Primer am 3'Ende des *CML5* Gens bindet (*CML5*mRNAfw; *CML5*mRNArv; Abbildung 21), bei der Mutante kein PCR Produkt erzeugt, beim Wildtyp jedoch ein deutliches Amplifikat zu sehen ist (Abbildung 22B, erste und zweite Spur). Um sicherzustellen, dass die cDNA Herstellung auch bei der Mutantepflanze erfolgreich war, wurde an der gleichen DNA eine Kontroll-PCR mit einem Primerpaar, das für das HSP70 Gen

spezifisch ist, durchgeführt. Diese PCR ergab im Wildtyp, als auch in der Mutante, ein Produkt (Abbildung 22B, vierte und fünfte Spur). Es kann vorkommen, dass die cDNA bei der Herstellung durch genomische DNA verunreinigt wird. Dies ist leicht zu erkennen, wenn das zu testende Konstrukt Introns aufweist. In diesem Fall ist das PCR Produkt, welches mit cDNA als Template hergestellt wird, kleiner als ein Produkt, welches an genomischer DNA generiert wird. *CML5* weist jedoch keine Introns auf, so dass anhand der Größe des PCR Produkts nicht festgestellt werden kann, ob die cDNA mit genomischer DNA verunreinigt wurde. Als Kontrolle konnte hier ebenfalls HSP70 verwendet werden, dessen Genlocus Introns aufweist und dessen PCR Produkt auf genomischer DNA größer als das auf cDNA ist (Abbildung 22B, sechste Spur). Da dieses größere Produkt nicht in der PCR an der cDNA auftaucht, kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht durch genomische DNA verunreinigt ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der untersuchten Linie um eine knock-out Mutante handelt, die nicht mehr in der Lage ist, vollständige mRNA von *CML5* herzustellen. Ungefähr 150 dieser Pflanzen wurden anschließend auf Platten und auf Erde ausgesät, um sie phänotypisch zu untersuchen. Hierfür wurden die Pflanzen mit Wildtyp-Pflanzen, die unter den gleichen Bedingungen angezogen wurden, morphologisch verglichen. Exemplarisch ist in Abbildung 23 der Vergleich zwischen einer Wildtyp-Pflanze und einer *cml5* knock-out Pflanze dargestellt. Es waren hierbei keine Unterschiede in der Größe und Anzahl der Blätter, der Länge der Stängel, oder anderweitig auffällige Unterschiede in der Morphologie zu erkennen. Auch die zeitliche Entwicklung schien gleich abzulaufen.



**Abbildung 23: Phänotypische Analyse der CML5 knock-out Mutanten.**

Auf Erde angezogene knock-out Mutanten der Linie GABI-Kat 703E02 zeigen keinen Phänotyp bei morphologischen Vergleichen mit Wildtyp-Pflanzen.

Diese Untersuchungen zeigen zwar, dass die *CML5* knock-out Mutanten keinen auffallenden Phänotyp zeigen, wenn die Pflanzen unter normalen Kultivierungsbedingungen wachsen. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um den Einfluss des Fehlens von CML5 genauer zu analysieren.

### 3.2 Lokalisierung weiterer CMLs

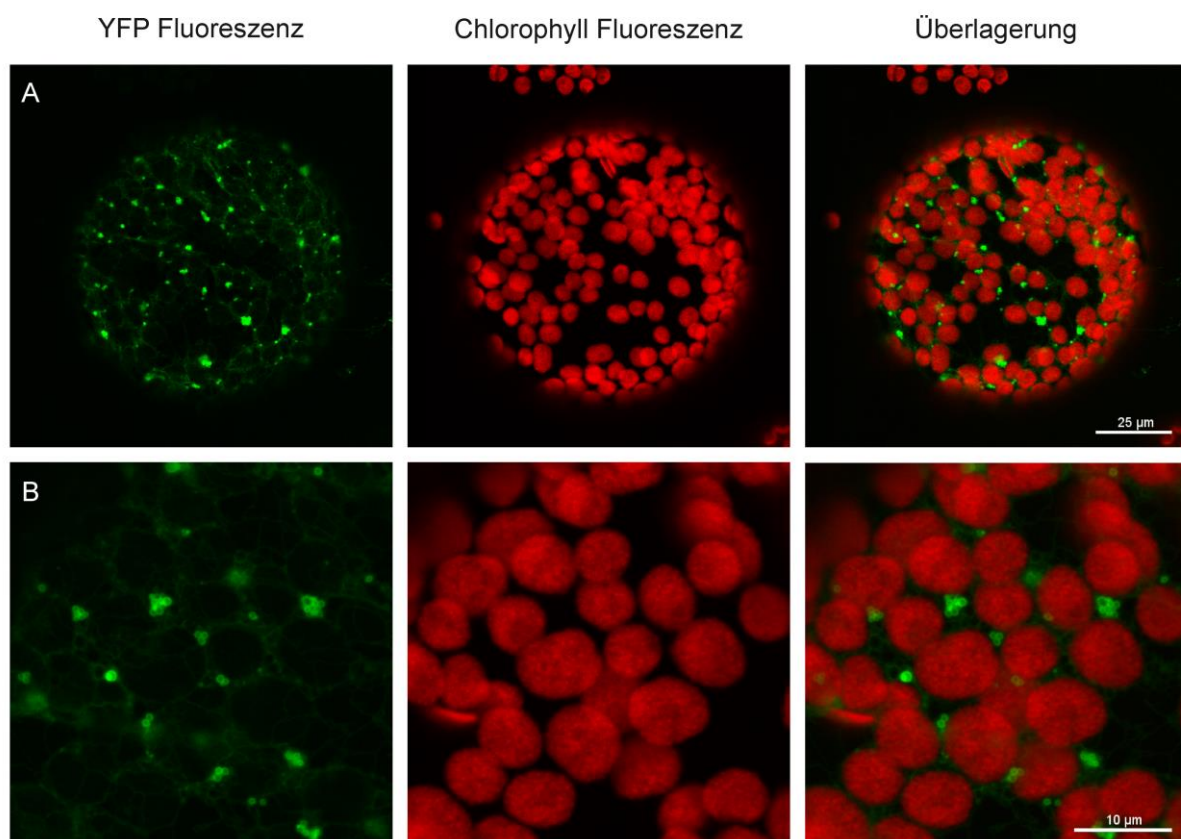
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die intrazelluläre Lokalisierung einer Reihe weiterer CMLs mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Analyse erfolgte wie unter 3.1.2.1 für CML5 beschrieben und in Tabelle 6 sind alle untersuchten CMLs und ihre beobachtete Lokalisierung zusammengefasst. Die Ergebnisse sind im Weiteren im Detail dargestellt.

**Tabelle 6:** Liste der in dieser Arbeit untersuchten CMLs, ihre ATG Nummer und die durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelte mögliche Lokalisierung.

<b>CML</b>	<b>ATG Nummer</b>	<b>Lokalisierung</b>
CAM2	At2g41110	Kern und Zytosol
CAM4	At1g66410	Kern und Zytosol
CML7	At1g05990	Kern und Zytosol
CML10	At2g41090	Kern und Zytosol
CML15	At1g18530	Kern und Zytosol
CML17	At1g32250	Kern und Zytosol
CML19	At4g37010	Kern und Zytosol
CML20	At3g50360	Zytosol und Akkumulationen (Ansammlungen im Zytosol)
CML23	At1g66400	Kern und Zytosol
CML32	At5g17470	Kern und Zytosol
CML36	At3g10190	Kern und Zytosol
	At1g73440	Kern
CML31	At2g36180	Kern
CML3	At3g07490	Peroxisomen
CML4	At3g59440	Endosomen
CML5	At2g43290	Endosomen
CML30	At2g15680	Mitochondrien

### 3.2.1 CML4

Unter 3.1.1 wurde bereits gezeigt, dass CML5 und CML4 einander in Aminosäuresequenz und Aufbau sehr ähnlich sind. Dadurch stellt sich die Frage, ob CML5 und CML4 auch in den gleichen Organellen lokalisiert sind. Um das zu überprüfen, wurde CML4, wie CML5, am C-Terminus mit einem YFP-Tag (pBIN-CML4-YFP) versehen und mit Hilfe von Agrobakterien in *N. benthamiana* transformiert. Aus den Blättern wurden anschließend Protoplasten isoliert und analysiert. In Abbildung 24 ist zu sehen, dass die Lokalisierung von CML4-YFP ein ähnliches Bild zeigt wie die Lokalisierung von CML5-YFP.



**Abbildung 24: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die CML4-YFP exprimieren.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit pBIN-CML4-YFP transformiert. Nach 36 Stunden wurden Protoplasten isoliert und mittels Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CML4-YFP. Zweite Spalte: Fluoreszenz von Chlorophyll. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale. (A) Aufnahme eines Protoplasten; (B) Ausschnitt aus einem Protoplasten.

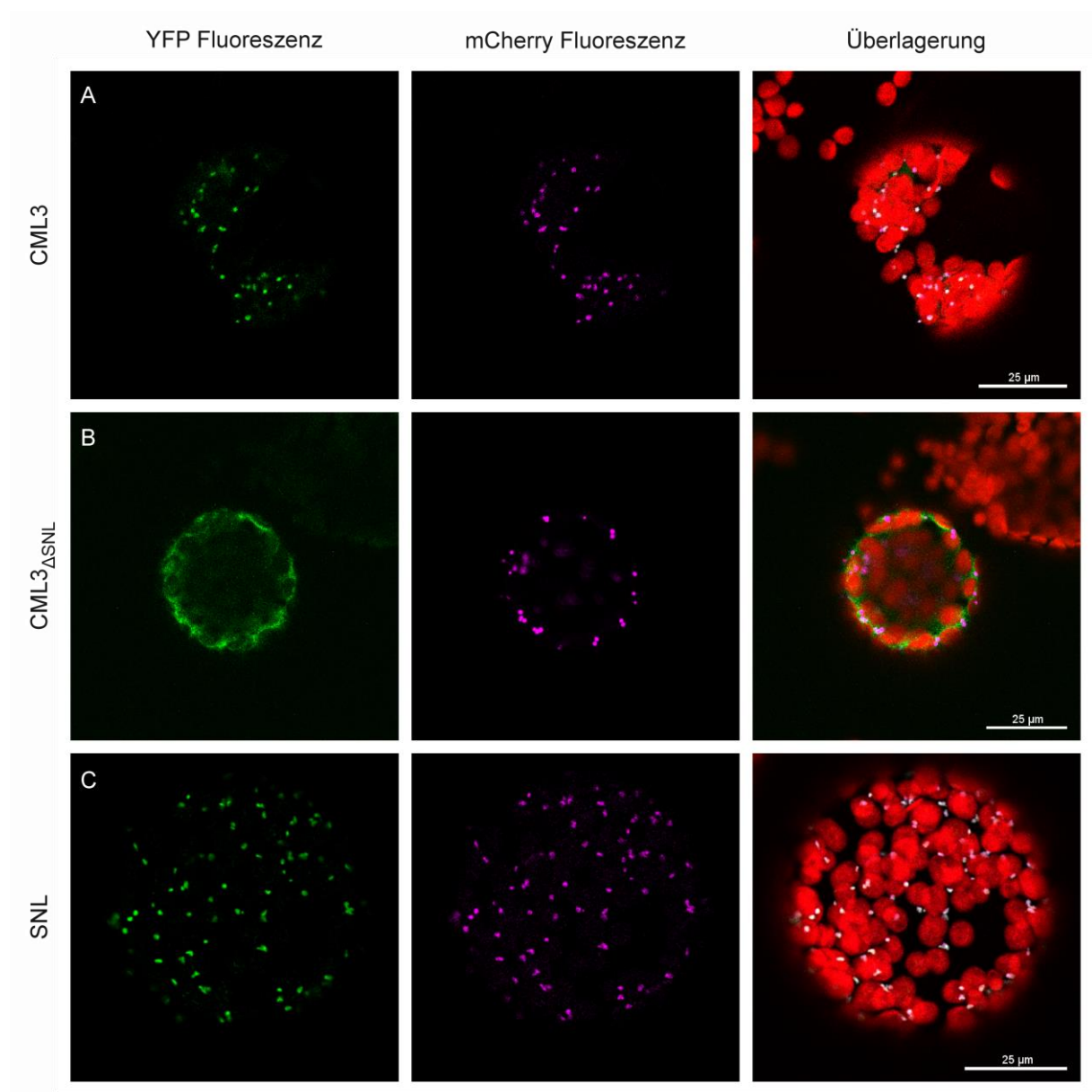
Auch hier ist das Fluoreszenzsignal von CML4-YFP nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt und die Fluoreszenz überlappt sich nicht mit der Fluoreszenz des Chlorophylls (Abbildung 24A). Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass CML4-YFP in den gleichen ringförmigen Strukturen auftritt wie CML5-YFP (Abbildung 24B). Zusammen mit der Ähnlichkeit der Sequenzen, insbesondere der Präsequenz, deutet dies darauf hin, dass CML5 und CML4 in den gleichen Organellen lokalisiert sind.

### 3.2.2 CML3

Ein weiteres CML, bei dem die Lokalisierung untersucht wurde, war CML3. Bei der Sequenzanalyse war auffällig, dass CML3 am C-Terminus die Aminosäuren SNL aufweist. Bei dieser Sequenz handelt es sich um ein peroxisomales Targeting Signal Typ 1 (PTS1) (Mullen, Lee et al. 1997, Neuberger, Maurer-Stroh et al. 2003, Reumann, Ma et al. 2004). Da dieses Motiv dafür verantwortlich ist, dass Proteine aus dem Zytosol in die Peroxisomen transportiert werden, wäre es möglich, dass CML3 dort lokalisiert ist. Da es sich bei PTS1 um eine C-terminal lokalisierte Erkennungssequenz handelt, wurde in diesem Fall das YFP-Protein an den N-Terminus von CML3 fusioniert (pBIN-YFP-CML3) und mit Hilfe von Agrobakterien in Tabakpflanzen transformiert.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal von YFP-CML3 nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt ist, sondern in punktuellen Strukturen auftritt (erste Reihe, erstes Bild). Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Strukturen um Peroxisomen handelt, wurde an das rot fluoreszierende Protein mCherry C-terminal die klassische PTS1 (SKL) kloniert. Bei gleichzeitiger Expression ist zu erkennen, dass sich das mCherry und YFP-Signal deutlich überlagern. Dieses Ergebnis zeigt, dass YFP-CML3 tatsächlich in den Peroxisomen lokalisiert ist. Um zu überprüfen, ob die C-terminale Aminosäuresequenz SNL für die Lokalisierung verantwortlich ist, wurde ein Konstrukt mit CML3 ohne diese Sequenz am C-Terminus erstellt (pBIN- YFP-CML3<sub>ΔSNL</sub>). Es ist deutlich zu erkennen, dass das YFP-Signal dieses Konstruktes nicht mehr in punktuellen Strukturen auftritt, sondern überall im Zytosol verteilt ist (Abbildung 25, zweite Reihe, erstes Bild). Das mCherry-Signal der Sequenz SKL ist jedoch weiterhin in den Peroxisomen lokalisiert (Abbildung 25, zweite Reihe, zweites Bild). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Sequenz SNL für die Lokalisierung von YFP-CML3 in den Peroxisomen verantwortlich ist. Als weitere Kontrolle wurde die Sequenz SNL C-terminal an die Aminosäuresequenz für das YFP-Protein (pBIN-YFP-SNL) kloniert. Hier tritt das YFP-Signal wiederum in punktueller Struktur auf und überlagert deutlich mit

dem mCherry-Signal des Peroxisomenmarkers (Abbildung 25, dritte Reihe, erstes und drittes Bild).



**Abbildung 25: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die YFP-CML3, YFP-CML3 $\Delta$ SNL, YFP-SNL und jeweils mCherry-SKL koexprimieren.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit verschiedenen pBIN-YFP-CML3 Konstrukten und pBIN- mCherry-SKL, ein Marker für den Peroxisomen, kotransformiert. Nach 36 Stunden Inkubation wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert und durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz der Fusionsproteine YFP-CML3, YFP-CML3 $\Delta$ SNL bzw. YFP-SNL. Zweite Spalte: mCherry-Fluoreszenz des Fusionsproteins mCherry-mCherry. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.



Diese Ergebnisse zeigen, dass CML3 in den Peroxisomen lokalisiert ist und dass für diese Lokalisierung die C-terminale Aminosäuresequenz SNL alleine verantwortlich ist. Wird diese Sequenz entfernt, wird CML3 nicht mehr in die Peroxisomen transportiert, sondern bleibt im Zytosol. Werden die drei Aminosäuren aber an ein YFP kloniert, reicht das aus um, das YFP-Protein in die Peroxisomen zu importieren.

### 3.2.3 CML30

CML30 hat, wie viele CMLs, eine N-terminale Verlängerung. Durch diese unterscheidet es sich von den klassischen CaMs. Diese Verlängerung ist 36 Aminosäuren lang und die Mehrzahl der Vorhersageprogramme sagt eine potentielle mitochondrielle Lokalisierung vorher (Chigri, Flosdorff et al. 2012). Allerdings sind die Vorhersagen nicht eindeutig. So gibt es Vorhersageprogramme, die die Lokalisierung von CML30 in Chloroplasten (ChloroP\_v1.1, PCLR\_v0.9, PProWler\_v1.1) oder in Mitochondrien (iPSort, Mitopred, PredSL) vorhersagen.

Um zu überprüfen, ob CML30 tatsächlich in einem der vorhergesagten Organelle lokalisiert ist, wurde die Sequenz von CML30 C-terminal mit einem YFP-Tag versehen (pBIN-CML30-YFP). Das Fusionsprotein CML30-YFP wurde mit Hilfe von Agrobakterien in *N. benthamiana* Blätter transfomiert. Die Analyse der Protoplasten im Fluoreszenzmikroskop zeigt, dass das YFP-Signal von CML30-YFP im Zytosol und in punktuellen Strukturen auftritt (Abbildung 27A, erstes Bild). Die Fluoreszenz überlagerte sich nicht mit der Fluoreszenz des Chlorophylls (Abbildung 27A, drittes Bild), wodurch die chloroplastidäre Lokalisierung unwahrscheinlich erscheint. Um zu überprüfen, ob es sich bei den punktuellen Strukturen möglicherweise um Mitochondrien handelt, wurden CML30-YFP exprimierende Protoplasten mit Mitotracker®CMX Ros angefärbt (Abbildung 27A, zweites Bild). Eine Überlagerung der Signale zeigt, dass sich die punktuellen Strukturen des YFP-Signals mit den angefärbten Mitochondrien überlagern.

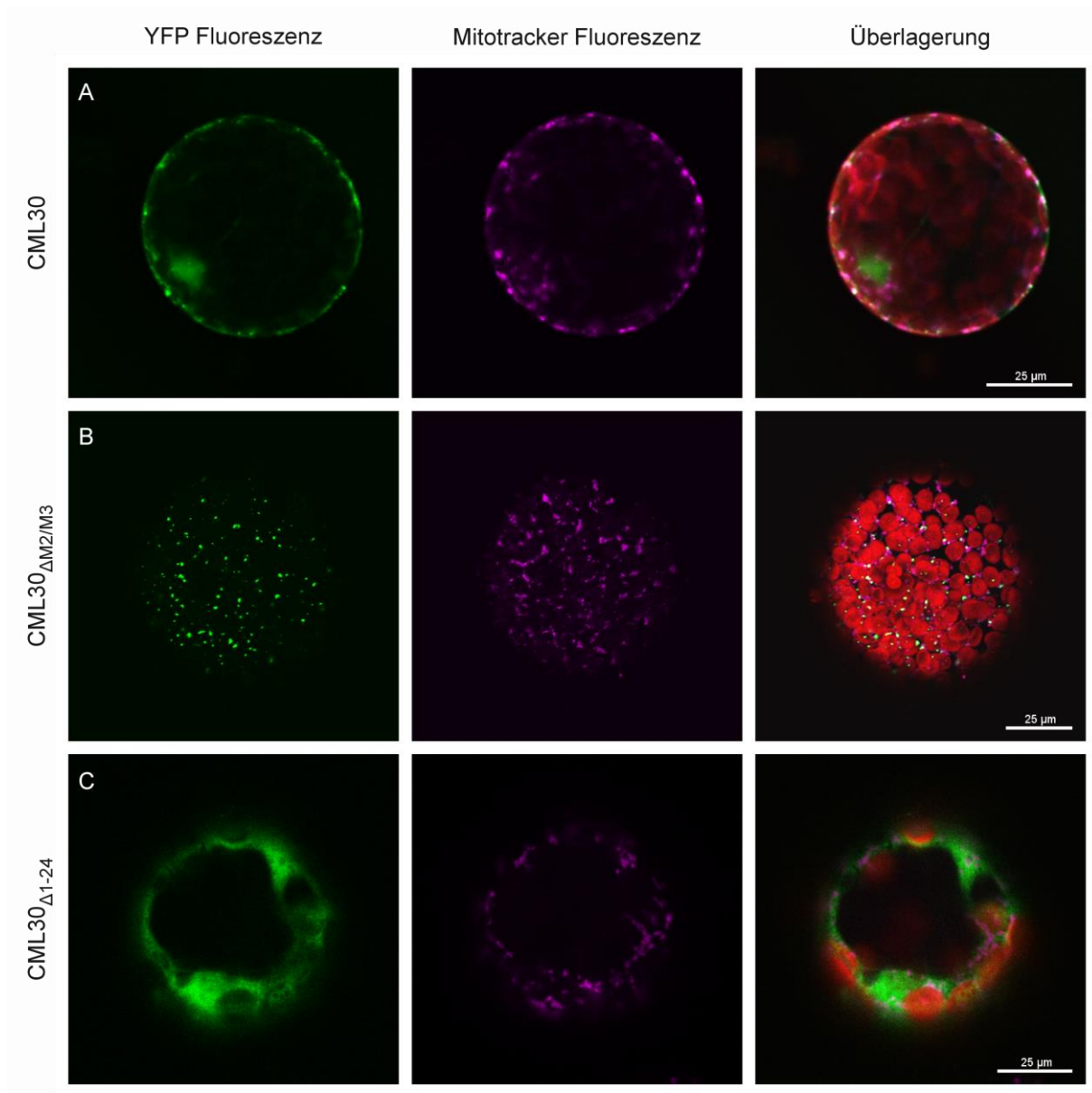
Das starke, zytosolische Signal könnte dadurch zustande kommen, dass die Methionine an Position 18 und 25 als alternativer Translationsstart funktionieren (Abbildung 26 und Abbildung 27). Diese Vermutung wurde durch Versuche mit *in vitro* Translation unterstützt. Hierbei wurde CML30 in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* translatiert, wodurch radioaktiv markiertes CML30 entstand. Hier war zu beobachten, dass CML30 in drei unterschiedlichen Größen auftrat, was einen alternativen Translationsstart wahrscheinlich erscheinen lässt (Chigri, Flosdorff et al. 2012).

MSNVSFLELQYKLSKNK**ML**RKPS**RM**FSRDRQSSGLSSPGPGGFSQPS  
 VNEMRRVFSRFDLDKDGKISQTEYKVVLRALGQERAIEDVPKIFKAV  
 DLDGDGFIDFREFFIDAYKRSGGIRSSDIRNSFWTFDLNGDGKISAAE  
 VMSVLWKLGERCSLED CNRMVRAVDADGDGLVNMEEFIKMMSSNNV

**Abbildung 26: Aminosäuresequenz von CML30**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von CML30. In Rot hervorgehoben sind die Methionine an der 1., 18. und 25. Position.

Um zu überprüfen, ob das zytosolische Signal durch verkürzte CML30 Proteine, die durch die alternativen Translationsstarts entstehen, hervorgerufen wird, wurde ein YFP-Fusionskonstrukt erstellt, in denen die beiden Methionine durch Isoleucine ausgetauscht waren. Das entstandene Konstrukt CML<sub>30ΔM2/M3</sub>-YFP wurde anschließend in Tabakpflanzen exprimiert und analysiert. Auf dem ersten Bild in Abbildung 27B zeigt sich, dass das YFP-Signal nicht länger zytosolisch lokalisiert ist, sondern es nur noch ein punktuell Signal gibt. Eine Färbung mit Mitotracker (Abbildung 27B, zweites und drittes Bild) zeigt wiederum, dass sich dessen Signal mit dem YFP-Signal überlagert. Dies legt nahe, dass CML<sub>30ΔM2/M3</sub>-YFP exklusiv mitochondriell lokalisiert ist. Für die zytosolische Lokalisierung waren also wahrscheinlich tatsächlich alternative Translationsstarts am 2. oder 3. Methionin verantwortlich. Diese Schlussfolgerung konnte durch Verwendung eines Konstrukts (CML<sub>30Δ1-24</sub>-YFP) untermauert werden, welches erst am 3. Methionin beginnt. Die Untersuchung der Expression in Tabakpflanzen ergab ein vollständig zytosolisches Fluoreszenzsignal (Abbildung 27C) und zeigt damit, dass dieses Konstrukt nicht länger in die Mitochondrien transloziert. Unter der Annahme, dass *in vivo* das erste Methionin als Startkodon verwendet wird, ist davon auszugehen, dass CML30 in den Mitochondrien lokalisiert ist.



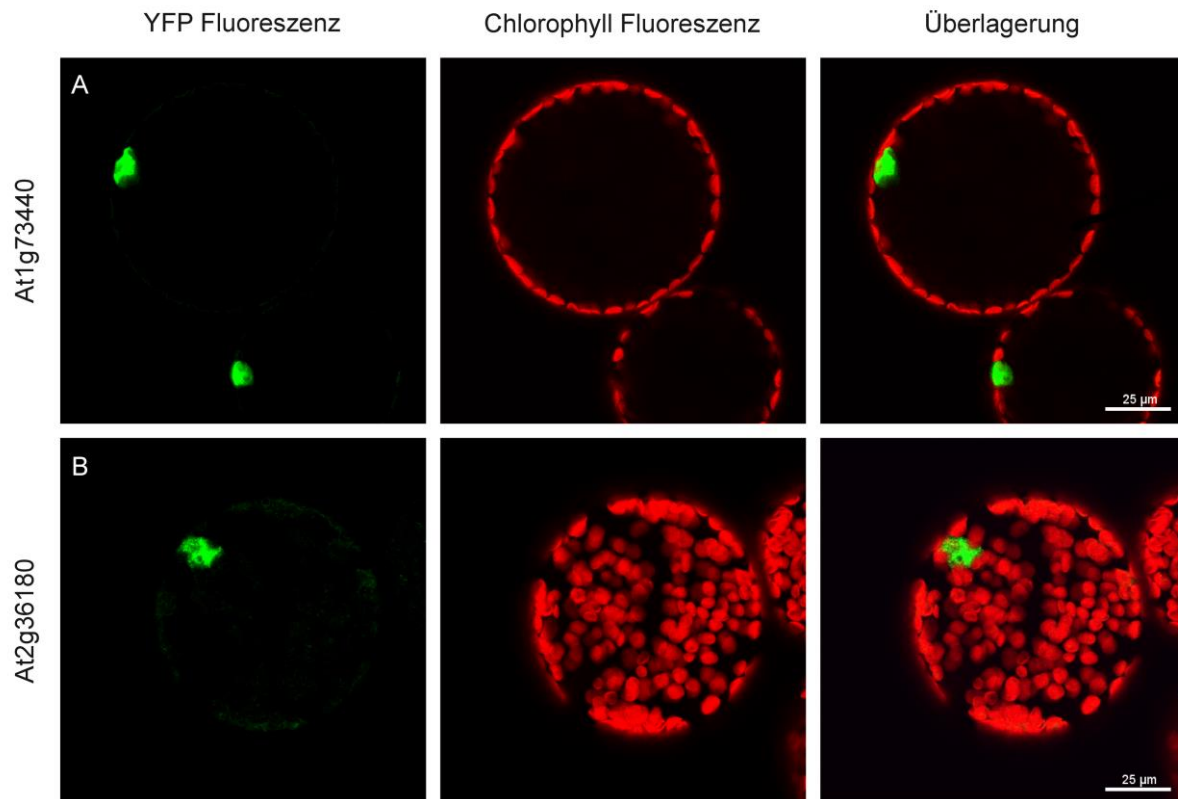
**Abbildung 27: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die CML30-YFP, CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -YFP bzw. CML30 $_{\Delta 1-24}$ -YFP exprimieren und deren Mitochondrien mit Mitotracker® gefärbt wurden.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit verschiedenen pBIN-CML30-YFP Konstrukten transformiert. Nach 36 Stunden Inkubation wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert, die Mitochondrien mit Mitotracker®CMX Ros angefärbt und durch Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz der Fusionsproteine CML30-YFP, CML30 $_{\Delta M2/M3}$ -YFP bzw. CML30 $_{\Delta 1-24}$ -YFP. Zweite Spalte: Fluoreszenz des Mitotrackers. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

### 3.2.4 At1g73440 und At2g36180

Für zwei der untersuchten CMLs, At1g73440 und At2g36180 (CML31), ergab die Analyse der Fluoreszenzbilder, dass beide CMLs an einer Stelle der Pflanzenzelle konzentriert sind. Es

gibt kein zytosolisches Signal und auch keine Überlagerung mit der Fluoreszenz des Chlorophylls (Abbildung 28). Die Form des Signals legt nahe, dass es sich hierbei um den Zellkern handelt und diese beiden CMLs exklusiv in diesem lokalisiert sind.



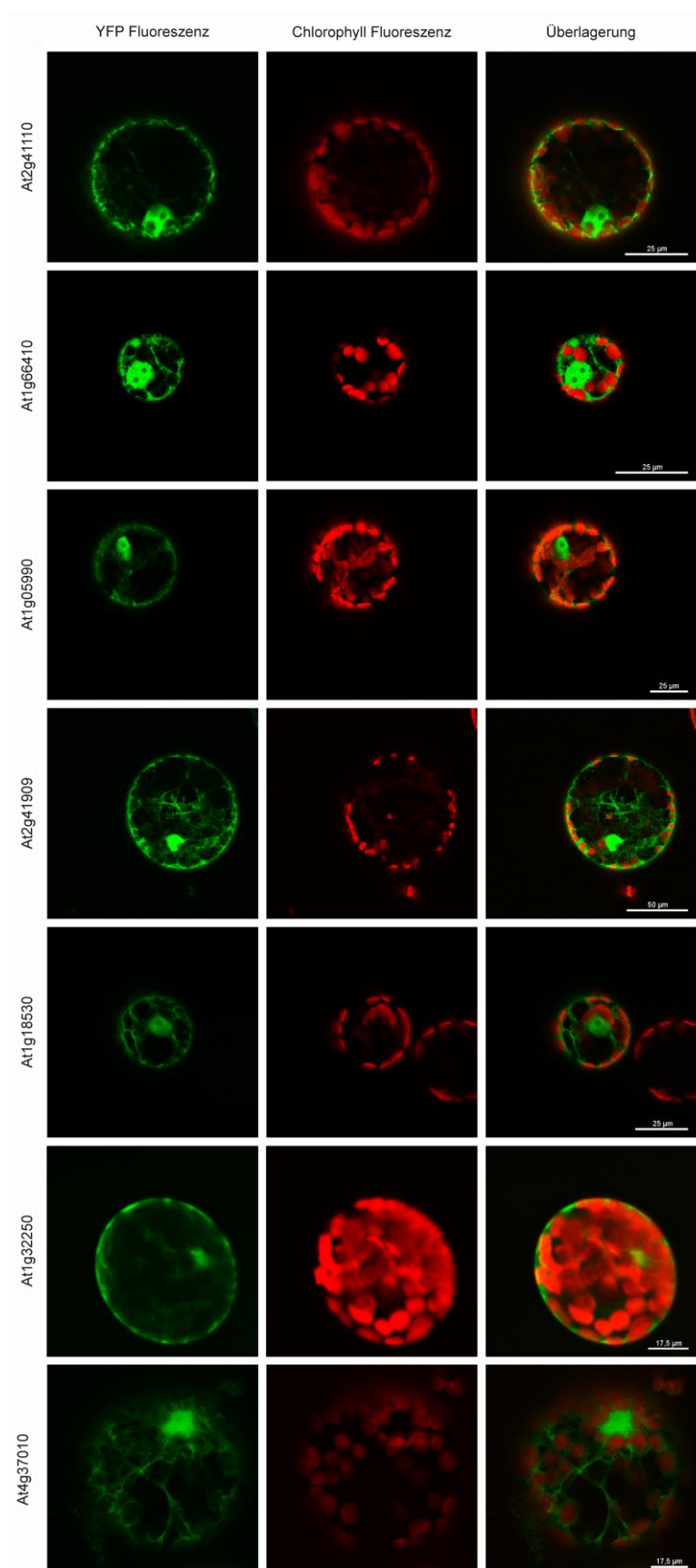
**Abbildung 28:** Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten die At1g73440 bzw. At2g36180 exprimieren.

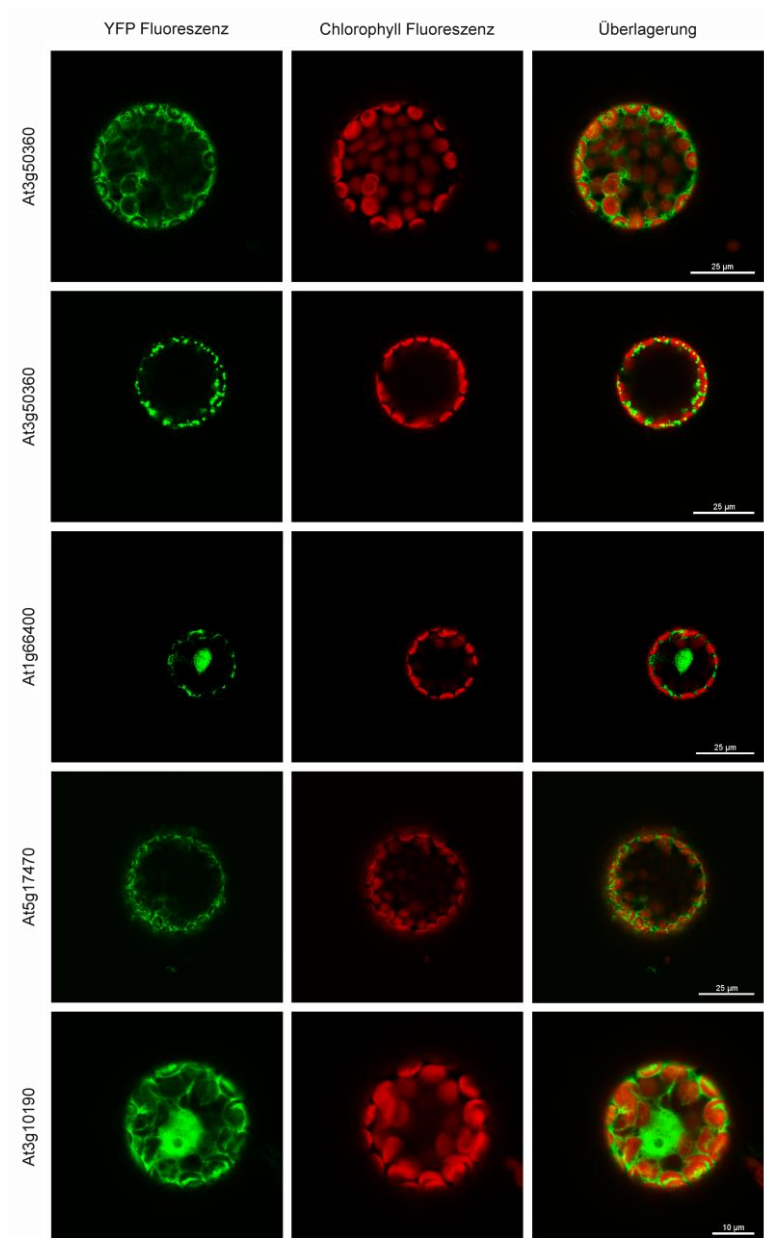
Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit pBIN-At1g73440-YFP bzw. pBIN-At2g36180-YFP transformiert. Nach 36 Stunden wurden Protoplasten isoliert und mittels Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz der Fusionsproteine At1g73440-YFP bzw. At2g36180. Zweite Spalte: Fluoreszenz von Chlorophyll. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

### 3.2.5 Weitere CMLs

Für eine Reihe weiterer CMLs konnte eine Lokalisierung im Kern und im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 29) Dies ist häufig bei kleinen Proteinen ohne Zielsequenz zu beobachten. Diese liegen im Zytosol vor, können jedoch bei starker Expression auch in den Kern gelangen. Im Fall von CML20 fällt auf, dass das YFP-Signal zusätzlich zur zytosolischen Lokalisierung an mehreren Stellen akkumuliert. Aufgrund der Größe und Form

des Signals wird angenommen, dass es sich nicht um Organelle, sondern um Präzipitate handelt.





**Abbildung 29: Fluoreszenzanalyse von *N. benthamiana* Protoplasten, die unterschiedliche CMLs exprimieren.**

Blattmesophyllzellen von *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit verschiedenen pBIN-CMLX-YFP transformiert. Nach 36 Stunden wurden Protoplasten isoliert und mittels Laser Scanning Mikroskopie (Einzelbilder, Schichtdicke 40nm) analysiert. Erste Spalte: YFP Fluoreszenz des Fusionsproteins CMLX-YFP. Zweite Spalte: Fluoreszenz von Chlorophyll. Dritte Spalte: Überlagerung der Fluoreszenzsignale.

## 4. Diskussion

Überall in der Zelle finden sich Hinweise auf Prozesse, die durch Kalzium reguliert werden. Ein Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytosol kann durch unterschiedliche Reize, wie zum Beispiel Licht, abiotischen und biotischen Stress oder Hormonen, ausgelöst werden. Diese Kalziumsignale werden durch kalziumbindende Proteine erkannt, die in den meisten Fällen Kalzium über das sogenannte EF-Hand Motiv binden. Eine Proteinfamilie, die oft an der Signaltransduktion beteiligt ist, ist CaM. Durch die Bindung von Kalzium ändern CaMs und CMLs ihre Konformation und interagieren so mit weiteren Zielproteinen, um eine Weiterverarbeitung des Kalziumsignals zu ermöglichen. Hinweise auf CaMs und CMLs gab es ursprünglich nur in Zytosol und Kern, aber inzwischen gibt es bei Pflanzen Hinweise auf Kalzium-Regulation in vielen Kompartimenten. Es werden immer mehr Proteine identifiziert, die kalziumabhängig an CaMs und CMLs binden können (Yang and Poovaiah 2003, Perochon, Aldon et al. 2011). Ein weiterer Hinweis darauf, wie wichtig CaMs und CMLs für Arabidopsis zu sein scheinen, ist, dass im Genom von Arabidopsis 6 CaMs und 50 CMLs codiert werden. Obwohl so viele CaMs und CMLs in Arabidopsis vorkommen, gibt es nur wenige CMLs mit genau untersuchter Lokalisierung. Allerdings wurden in vielen Organellen Hinweise auf Vorgänge gefunden, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM reguliert werden (Chigri, Soll et al. 2005, Chigri, Hörmann et al. 2006, Bussemer, Chigri et al. 2009, Kuhn, Bussemer et al. 2009).

So wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von CMLs aus *A. thaliana* auf ihre Lokalisierung untersucht. Bei 11 CMLs ergab die Analyse der Protoplasten, die aus Pflanzenzellen hergestellt wurden, die das jeweilige CML-YFP exprimierten, dass die CMLs im Zytosol und im Kern lokalisiert waren (siehe 3.2.5, Abbildung 29). Nach Seibel, Eljouni et al. (2007) ist GFP im Zytosol und im Kern zu finden, wenn es alleine in Zellen exprimiert wird. Die meisten Proteine, die im Kern lokalisiert sind, haben ein Signal zur Kernlokalisierung (nuclear localisation signal; NLS) und werden dadurch in den Kern transportiert. Nur einige wenige Proteine diffundieren passiv durch die Kernporen und sind dadurch im Kern zu finden. Diese Proteine haben eine Masse von kleiner als ca. 50 kDa (Macara 2001). Da in GFP keine NLS gefunden wurde, geht man davon aus, dass es klein genug ist (ca. 27 kDa), um passiv in den Kern zu diffundieren (Seibel, Eljouni et al. 2007). Die Größen der CMLs, die mit YFP exprimiert wurden, bewegen sich zwischen 15 und 21 kDa und somit liegt die Größe der Fusionsproteine bei allen Konstrukten unter 50 kDa. Der Unterschied zwischen

dem verwendeten YFP-Protein zu dem besprochenen GFP-Protein ist sehr gering. Die beiden Proteine unterscheiden sich nur in ein paar Aminosäuren, wie zum Beispiel an Stelle 203 weist GFP ein Threonin auf, YFP hingegen ein Tyrosin (Zimmer 2002). Da sich die Strukturen von GFP und YFP nicht unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass sich beide Proteine bei der Lokalisierung gleich verhalten. GFP und somit auch YFP scheinen zur spezifischen Identifikation einer Lokalisierung von Proteinen im Kern oder im Zytosol nur geeignet zu sein, wenn die zu untersuchenden Proteine ein starkes Kernimport bzw. Kernexportsignal aufweisen (Seibel, Eljouni et al. 2007).

Die Untersuchung des Fusionsproteins CML5-YFP zeigt, dass sich CML5 nicht im Kern, den Chloroplasten oder den Mitochondrien befindet (Abbildung 3 und Abbildung 4). Stattdessen scheint es, dass CML5 in denselben vesikulären Strukturen lokalisiert ist, welche auch durch das Protein Ara6 markiert werden (Abbildung 9 und Abbildung 10). Bei Ara6 handelt es sich um ein, an der homotypischen Vesikelfusion beteiligtes Rab5 GTPase Homolog, welches in den LEs lokalisiert ist (Ueda, Yamaguchi et al. (2001)). Proteine der LEs gelangen in diese durch das ER und den Golgi-Apparat. Die Proteine werden ko- oder posttranslational in das ER importiert und gelangen anschließend durch Vesikeltransport in den Golgi-Apparat. Hier entstehen dann die EEs, aus welchen dann durch Reifung die LEs hervorgehen (siehe 1.3 und Alberts, Johnson et al. (2007), Robinson, Jiang et al. (2008), Scheuring, Viotti et al. (2011)). CML5 scheint über eben diesen Weg in die Endosomen zu gelangen. In ungefähr der Hälfte der untersuchten Protoplasten, die CML5 und den Golgi-Marker GmMan1 exprimieren, kann eine Kolokalisation festgestellt werden (siehe Abbildung 5). Das deutet daraufhin, dass sich ein Teil von CML5 noch auf dem Weg in die Endosomen befindet und deswegen im Golgi-Apparat zu finden ist. Auch die Auftrennung der unterschiedlichen Bestandteile der Mikrosomen, die aus Pflanzen, die CML5-YFP exprimieren, isoliert wurden, zeigt, dass ein Teil von CML5 in den gleichen Fraktionen des Saccharose-Gradienten zu finden ist, wie Arf1 (Abbildung 7). Bei Arf1 handelt es sich um ein Protein, das im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Donaldson and Honda 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass CML5 über das ER in das Endomembransystem gelangt und dort in die LEs transportiert wird. Wahrscheinlich führt die starke Expression unter dem 35S Promotor dazu, dass nicht alles CML5-YFP Protein bis zu seinem endgültigen Zielort gelangt. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass die bisher unbekannte Funktion von CML5 ein kontinuierliches Wandern des Proteins innerhalb dieser Kompartimente bedingt.



Die Analyse der Mikrosomenfraktion aus CML5-YFP exprimierenden Blättern über den Saccharose-Gradienten zeigt auch, dass CML5 in zwei unterschiedlichen Größen auftritt (Abbildung 7). Die Untersuchung durch den Edmann-Abbau zeigt, dass bei dem kleineren Protein wahrscheinlich ein Teil des N-terminus fehlt (siehe 3.1.3.1 und Abbildung 12). Es handelt sich hierbei nicht um eine Präsequenz, die beim Import ins ER abgespalten wird, sondern, wie weitere Untersuchungen zeigen, um die, für die Membranverankerung verantwortlichen, N-terminalen Aminosäuren des Proteins. Untersuchungen zur Membranassoziation zeigen, dass sich das größere und das kleinere der beiden CML5 Proteine unterschiedlich verhalten. Nur das kleinere der beiden lässt sich durch die Behandlung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aus dem Pellet lösen und ist anschließend im Überstand zu finden. Das größere der beiden Proteine lässt sich nur durch die Behandlung mit Harnstoff aus der Membran lösen (siehe 3.1.3.2, Abbildung 14). Das zeigt, dass es sich bei CML5 um ein Membranprotein handelt.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  löst auch Proteine aus der Membran, die durch einen Fettsäureanker oder durch hydrophobe Wechselwirkungen an integrale Membranproteine oder die polaren Köpfe der Lipide gebunden sind (Rolland, Ferro et al. 2006). Nur das kleinere der beiden CML5-Varianten lässt sich aber durch eine Behandlung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aus der Pelletfraktion (beinhaltet die Membranen) lösen. Das heißt, dass die kleine Variante entweder schwächer an die Membran gebunden ist als die größere oder sie sich im Inneren der Vesikel befindet. Diese werden durch die Behandlung nämlich geöffnet und der Inhalt der Vesikel ist dann auch im Überstand zu finden. Das Vorhersageprogramm TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) sagt für CML5 eine Transmembrandomäne voraus, die im Bereich der Aminosäuren 1-19 liegt. Diese Aminosäuren fehlen der kleineren Variante von CML5. Untersuchungen mit CML5<sub>1-29</sub>-YFP (Aminosäuren 1-29 von CML5) zeigen, dass die Transmembrandomäne tatsächlich in diesem Abschnitt des Proteins zu liegen scheint. Dieses kurze Teilstück ließ sich, wie die größere der beiden Varianten von CML5 und wie das Protein OEP7, welches über eine Transmembrandomäne in der Chloroplastenmembran verankert ist (Schleiff, Tien et al. 2001), nur durch die Behandlung mit Harnstoff aus der Membran lösen. Zur Membranverankerung reichen also die ersten 29 Aminosäuren von CML5, was auch durch Untersuchungen der Fluoreszenz des Fusionsproteins CML5<sub>1-29</sub>-YFP bestätigt wurde (Abbildung 15). Die Frage, ob sich das kleinere der beiden CML5 Proteine in den Vesikeln befindet oder nur schwächer an die Membran gebunden ist, lässt sich nicht abschließend klären. Weiterhin stellt sich die Frage, warum CML5 in zwei unterschiedlichen Größen auftritt. Es gibt mehrere denkbare Erklärungen hierfür. Eine mögliche Erklärung wäre ein alternativer Translationsstart des

Proteins. Bei CML30 konnte genau dies beobachtet werden (Chigri, Flosdorff et al. 2012). Hier wurden bei vergleichbaren Experimenten mit CML30-YFP in den Zellen vorwiegend zwei verkürzte Konstrukte translatiert. Diese begannen an zwei Methioninen, welche sich an den Positionen 18 und 25 der Sequenz von CML30 befanden. Bei CML5 befindet sich ein zweites Methionin an der Position 47. Dies würde einen Größenunterschied von ca. 5 kDa ausmachen. Nicht in dieser Arbeit gezeigte Daten zeigen, dass der Größenunterschied zwischen den beiden auftretenden CML5 Proteinen nicht so groß ist und dass ein Protein, welches am zweiten Methionin starten würde, deutlich kleiner wäre. Daher ist ein Expressionsstart an späterer Stelle im Falle von CML5 eher unwahrscheinlich. Es wäre möglich, dass ein Teil des exprimierten Proteins N-terminal degradiert vorliegt. Dies kann in verschiedenen Expressionssystemen immer wieder beobachtet werden. Dadurch würde in diesem Fall die Transmembrandomäne entfernt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass es in den MVBs (LEs mit nach innen abgeschnürten, internen Vesikeln) aktive Proteasen gibt (Otegui, Herder et al. 2006). So wurde festgestellt, dass Speicherproteine, die anschließend in speziellen Speichervakuolen gespeichert werden, in andere Vesikel verpackt werden als die Proteasen, die diese Proteine prozessieren. Diese unterschiedlichen sekretorischen Vesikel fusionieren anschließend und in diesen MVBs startet dann die Prozessierung dieser Proteine (2S Albumine). Befände sich CML5 in den MVBs, dann wäre es möglich, dass durch aktive Proteasen ein Teil des Proteins abgespalten würde.

Diese Überlegung wirft jedoch die Frage auf, ob sich das Protein in oder an den LEs (auch MVBs genannt) befindet und wie es in die Membran inseriert ist. Ein Protein mit einer Transmembrandomäne kann auf zwei Arten in die Membran inseriert sein. Der C-terminus des Proteins kann entweder in das Zytosol oder in das Lumen der Vesikel ragen. TMPred gibt als das wahrscheinlichere Modell an, dass der C-terminus in das Zytosol ragt und nicht ins Innere der MVBs. In diesem Fall wäre es nicht möglich, dass im Inneren der MVBs aktive Proteasen CML5 die Transmembrandomäne abspalten. Das Modell, dass der C-terminus mit dem YFP-Tag in das Zytosol ragt, wird auch dadurch unterstützt, dass eine starke YFP-Fluoreszenz zu beobachten ist. Im Lumen der MVBs herrscht ein niedriger pH-Wert. Es ist bekannt, dass der pH-Wert in den MVBs mit fortschreitender Reifung sinkt. So gibt es zwei in den MVBs aktive Proteasen, die ihr pH Optimum bei pH 5 – 6 bzw. 3 - 4 haben (Otegui, Herder et al. 2006). Der pH-Wert bei tierischen LEs liegt bei ca. pH 6 (Pittman 2012). Die GFP-Fluoreszenz (und auch die YFP Fluoreszenz) sind pH-abhängig. So ist bei einem pH-Wert von 6 nur noch die Hälfte der normalen Fluoreszenz zu beobachten. Sinkt der

pH-Wert weiter, wird die Fluoreszenz noch schwächer (Haupts, Maiti et al. 1998). Das starke Fluoreszenzsignal von CML5-YFP legt nahe, dass sich der C-terminus außerhalb der Endosomen befinden muss. Trotz dieser Erkenntnis lässt sich nicht klären, ob die kleinere der beiden CML5 Varianten durch Fehlen der Transmembran-Domäne schwächer an die Membran gebunden ist oder sich im Inneren der LEs (oder auch MVBs) befindet. Das Protein könnte in die MVBs gelangen, indem es sich in der Membran befindet, die sich bei der Entstehung der ILVs nach innen abschnürt. Entweder könnte CML5 aufgrund der starken Überexpression auch in die ILVs gelangen, oder es wird gerichtet dorthin transportiert. Allerdings scheinen vorwiegend Membranproteine, die zur Degradation bestimmt sind, sich in den ILVs anzureichern. Proteine, die zum Recycling bestimmt sind, verbleiben eher an der äußeren Membran (Contento and Bassham 2012). So scheint es wahrscheinlicher, falls sich CML5 in den ILVs befindet, dass es dort aufgrund der starken Überexpression zu finden ist. Sonst würde sich die Frage stellen, welche Funktion die Kalzium-bindende Domäne in den ILVs erfüllen sollte, da diese Vesikel nur zum Transport von Membranproteinen in die Vakuole zuständig sind.

Unabhängig von der Lokalisierung der kleineren Variante stellt sich auf jeden Fall die Frage nach der Funktion des volllängen CML5, welches sich außen an der Membran der LEs befindet (Henning Ruge, persönliche Kommunikation). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Frage nach der Funktion zu bearbeiten. Eine Möglichkeit ist die Untersuchung von knock-out Mutanten auf einen möglichen Phänotyp. Durch das Fehlen eines Proteins kann es zum Beispiel zu Wachstumsverzögerungen oder anderen leicht sichtbaren Auswirkungen kommen (Bolle 2009). Die Suche nach einem Phänotyp in der knock-out Mutante von *CML5* im Zuge dieser Arbeit blieb allerdings vorerst erfolglos (siehe 3.1.6). Wie unter 3.1.1 in Abbildung 1 gezeigt, sind sich CML5 und CML4 sehr ähnlich. Die Untersuchungen der Fluoreszenz des Fusionsproteins CML4-YFP unter 3.2.1 zeigen, dass CML4 in ähnlichen Strukturen auftritt und anscheinend auch in den LEs lokalisiert ist. Das legt die Vermutung nahe, dass CML4 die Funktion von CML5 substituieren kann und es möglicherweise deswegen nicht zu einem sichtbaren Phänotyp kommt. Die Geneinvestigator-Analyse (Hruz, Laule et al. 2008) von Expressionsdaten zeigen jedoch, dass CML4 und CML5 unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. So ist CML4 viel schwächer exprimiert als CML5. Aber es ist trotzdem möglich, dass ein Fehlen von CML5 durch CML4 kompensiert wird und deswegen kein Phänotyp zu beobachten ist. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wäre die Analyse einer Doppel-knock-out Mutante nötig. Hierbei handelt es sich um eine Pflanze, in der beide Proteine nicht

funktionsfähig vorliegen. Da es für CML4 keine knock-out Mutante gibt, besteht nicht die Möglichkeit, durch Kreuzung eine solche Doppel-knock-out Mutante herzustellen. Ein anderes System, um die Expression beider Proteine zu blockieren, ist die Herstellung einer RNAi-Mutante. Hierbei wird durch siRNAs (small interfering RNA) auf posttranskriptioneller Ebene die Expression des Proteins verhindert (Wielopolska, Townley et al. 2005). Hierdurch könnte in der CML5 knock-out Mutante zusätzlich CML4 ausgeschaltet werden. Anschließend könnte analysiert werden, ob nun ein Phänotyp auftritt.

Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass sich ein Phänotyp erst ausbildet, wenn die Pflanzen dem Reiz ausgesetzt werden, durch den das Kalziumsignal ausgelöst wird, welches durch CML5 decodiert wird. So werden Kalziumsignale in der Zelle durch unterschiedliche Stimuli, wie zum Beispiel rotes Licht, Berührung, Kälte, Hitze und oxidativer Stress, ausgelöst (siehe 1.1). Da die Funktion von CML4 und CML5 unbekannt ist, wären hierfür umfangreiche Stressestudien an Einzel- und Doppel-Knock-out Mutanten notwendig. Letztendlich ist auch nicht auszuschließen, dass bei den knock-out Mutanten ein Phänotyp vorliegt, dieser jedoch nicht besonders auffällig ist. So ist zum Beispiel CML42 an der Entwicklung der Trichome beteiligt. Knock-out Mutanten von CML42 haben Trichome, die verzweigter sind als die Trichome der Wildtyp-Pflanzen (Dobney, Chiasson et al. 2009). Um nicht augenscheinliche Abweichungen im Phänotyp der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zu finden, bedarf es genauerer mikroskopischer Analysen der Pflanzen oder eines Hinweises auf die Funktion von CML5, um so eine gerichtete Suche zu ermöglichen. Letztendlich könnte der Phänotyp auch exklusiv auf der molekularen Ebene vorliegen.

Um dennoch einen Hinweis auf die Funktion von CML5 zu erhalten, wurde versucht, mögliche Interaktionspartner von CML5 zu finden (siehe 3.1.5). Durch Pull-down Experimente mit Mikrosomenextrakten konnte dabei im Rahmen dieser Arbeit PATL1 als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden. Bei PATL1 handelt es sich um ein Protein, das mit der Zellplatte assoziiert ist (Peterman, Ohol et al. 2004). Bei der Zellplatte handelt es sich um ein Netzwerk aus Membranen, aus dem bei der Zellteilung die neue Zellwand entsteht. Von innen nach außen lagern sich hier Vesikel aus dem Golgi-Apparat an, die mit Zellwandmaterial gefüllt sind. Wenn die Zellplatte die seitliche Zellwand der sich teilenden Mutterzelle erreicht, ist die Teilung der Zelle abgeschlossen (Raven, Evert et al. 2006). PATL1 zeichnet sich durch eine variable N-terminale Domäne aus, gefolgt von zwei Domänen, die typisch für Proteine sind, die am Membrantransport beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um eine GOLD Domäne (Golgi dynamics domain) und um eine Sec14 Fettsäure-bindende

Domäne. GOLD Domänen sind wahrscheinlich an Protein-Protein Interaktionen beteiligt und sind bei einer großen Gruppe von Proteinen zu finden, die am Vesikeltransport und Golgi-Funktionen beteiligt sind. Bei Sec14 handelt es sich um ein eukaryotisches Protein, das Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylcholine (PCh) zwischen Doppelmembranen bewegen kann.

PATL1 wird in allen Geweben von *A. thaliana* exprimiert, aber vor allem in wachsenden Blättern und Wurzeln (Peterman, Ohol et al. 2004). Hier wird PATL1 während der Zellteilung aus dem Zytosol rekrutiert und bindet an endosomale Strukturen, die Ähnlichkeit mit durch Ara6 und Ara7 markierte Endosomen haben und in der Teilungszone liegen. PATL1 bindet in der zentralen Region der Zellplatte, wo sich diese verfestigt und reift. Bei PATL1 handelt es sich um ein peripheres Membranprotein, das wahrscheinlich über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Membran assoziiert ist (Peterman, Ohol et al. 2004). Der Theorie nach bindet PATL1 über die Sec14 Domäne an die Zellplattenmembranen und rekrutiert über seine GOLD Domäne und die variablen N-terminalen Domänen weitere Proteine, die für ein spätes Stadium der Zellteilung benötigt werden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass PATL1 an spezielle Phosphatidylinositolphosphate (PI(5)P, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3)P) bindet. Bei PIPs handelt es sich um wichtige Regulatoren des Membrantransports. Sie binden über spezielle PI-binde Domänen an ihre Zielproteine und rekrutieren und assemblieren anschließend Proteinkomplexe an spezielle Mikrodomänen im Lipidbilayer (Alberts, Johnson et al. 2007). Möglicherweise bindet PATL1 über seine Sec14 Domäne an diese PIPs. All diese Ergebnisse legen nahe, dass PATL1 eine Rolle im Membrantransport während der Zellteilung spielt (Peterman, Ohol et al. 2004, Peterman, Sequeira et al. 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PATL1 an Rinderhirn-CaM binden kann (siehe Abbildung 19). Allerdings konnte über den Pull-down hinaus *in vitro* keine Bindung an CML5 beobachtet werden. Um zu zeigen, ob PATL1 tatsächlich ein möglicher Interaktionspartner von CML5 ist, sind daher weitere Untersuchungen notwendig. Ließe sich diese Interaktion bestätigen, dann könnte davon ausgegangen werden, dass auch CML5 in regulatorischer Rolle an der Zellteilung beteiligt ist.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass CML5 an der Vesikelfusion beteiligt ist. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass an der Fusion von Vesikeln Kalziumsignale und CaM beteiligt sind. Wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, tritt CML5 in einer ringförmigen Struktur auf. Ein ähnliches Bild erhält man, wenn Zellen mit Wortmannin behandelt werden. Hierbei handelt es sich um einen Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) Inhibitor. Diese Kinase ist

unter anderem wichtig für die Bildung interner Vesikel und außerdem inhibiert Wortmannin den Transport von Proteinen zur pflanzlichen Vakuole. Ein beobachtbarer Effekt von Wortmannin ist, dass die LEs anschwellen (Robinson, Jiang et al. 2008). Auch bei der Überexpression von CML5 wirken die LEs, als wären sie angeschwollen. Dies könnte durch eine Veränderung bei der Vesikelfusion hervorgerufen werden. Nach Lehrbuch (Alberts, Johnson et al. 2007) unterteilt sich diese in drei Schritte: Das Anbinden, das Andocken und die Fusion. An der Regulation der Anbindung sind sogenannte Rab-GTPasen beteiligt. Diese befinden sich in ihrer aktiven Form an den Vesikel und binden an ihre spezifischen Rab-Effektoren, die an der Ziellmembran gebunden sind. Dadurch wird der Zielort erkannt. Für das Andocken sind sogenannte v- und t-SNAREs verantwortlich. Die v-SNAREs befinden sich auf den Vesikeln, die passenden t-SNAREs an der Membran, mit der der Vesikel fusionieren wird. Die v- und die t-SNAREs verbinden sich zum trans-SNARE Komplex durch Bildung einer coiled-coil Struktur, wodurch die Membranen näher zusammen gebracht werden und fusionieren können. Das Anbinden und das Andocken mit Hilfe der Rab-GTPasen und der SNAREs sind beide sehr spezifische Prozesse. So fusionieren die Vesikel mit den richtigen Ziellmembranen. Da über die Funktion von CML5 noch nichts bekannt ist, gibt es die Möglichkeit, im Folgenden über eine mögliche Beteiligung an der Vesikelfusion zu spekulieren. Hierfür ist eine genauere Betrachtung bekannter Vorgänge nützlich. Genauere Analysen der Membran- und Vesikelfusion zeigten, dass bei Säuger-Zellen auch Kalziumsignale und CaM beteiligt sind. So konnte Pryor, Mullock et al. (2000) zeigen, dass die Fusion von LEs mit Lysosomen ein Kalziumsignal benötigt. Dieses wird durch endozytiertes Kalzium, welches sich im Lumen der Endosomen befindet, generiert. Weiterhin scheint CaM beteiligt zu sein, da die Fusion durch CaM Antagonisten inhibiert werden kann (Pryor, Mullock et al. 2000). Die Autoren vermuten, dass das Kalziumsignal und der Vorgang, der durch CaM reguliert wird, nach der SNARE Komplexbildung ablaufen. Bei Tieren benötigt die homotypische Fusion von EEs den Vesikel-anbinde Faktor EEA1 (Early Endosomal Antigen1). Dieses Protein hat eine Bindedomäne für die Bindung an PI(3)P und auch eine IQ Domäne, um CaM zu binden. Interessant ist, dass PI(3)P in Pflanzen an den LEs, die durch Ara6 markiert werden, lokalisiert ist, in Tieren allerdings an den EEs (Mills, Urbe et al. 2001, Robinson, Jiang et al. 2008). Der Prozess der Fusion von EEs scheint ein intravesikuläres Kalziumsignal, welches durch CaM erkannt wird, zu benötigen. Dies zeigte sich, da die Fusion sich durch Antagonisten inhibieren ließ. EEA1 und auch syntaxin13 (ein t-SNARE) sind beide in der Lage, mit CaM zu interagieren. Weiterhin ist EEA1 auch noch in der Lage, mit rab5-GTP zu interagieren. Der genaue Ablauf der Vesikelfusion bleibt hier noch

unklar, aber die Autoren vermuten, dass EEA1 durch PI(3)P an die Membran der EEs rekrutiert wird und dass CaM für die Fusion der EEs wichtig ist, da EEA1 und syntaxin13 beide in der Lage sind, mit CaM zu interagieren. Weiterhin gehen sie davon aus, dass diese Proteine dafür zuständig sind, CaM an die Membran der EEs zu binden und somit zu ermöglichen, dass CaM das intravesikuläre Kalziumsignal erkennen kann (Mills, Urbe et al. 2001). Lawe, Sitouah et al. (2003) zeigen, dass EEA1 durch PI(3)P und die Rab5-GTPase an die Membran rekrutiert wird. Anders als Mills, Urbe et al. (2001) konnten sie zeigen, dass die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM kein negativer Regulator für die Bindung von EEA1 an die Endosomenmembran ist, sondern dass CaM für die Bindung von EEA1 an die Membran der EEs benötigt wird. Nach Šamaj (2012) gibt es für EEA1 kein Homolog in Pflanzen. Trifft die Vermutung zu, dass EEA1 mit daran beteiligt ist, CaM an die Membran in Säuger-Zellen zu binden und somit in die Nähe des Kalziumsignals aus den Endosomen zu bringen, so ist es möglich, dass in Pflanzen ein membrangebundenes CML das Kalziumsignal erkennt. So ist kein Homolog von EEA1 nötig, um ein zytosolisches CaM an die Membran zu binden, sondern CML5 ist bereits an die Membran gebunden. Da es in tierischen Zellen viele Hinweise darauf gibt, dass Kalziumsignale und CaM an der Vesikelfusion beteiligt sind, liegt die Vermutung nahe, dass dies in Pflanzen ähnlich ist. Um eine Beteiligung von CML5 an der Vesikelfusion zu klären, sind weitere Untersuchungen nötig. So könnte auch in der knock-out Mutante die Anzahl, Größe und Form der Vesikel untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte also die Lokalisierung von CML5, aber nicht die Funktion abschließend geklärt werden. Die Untersuchungen legen aber eine Beteiligung an der Vesikelfusion nahe.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Umwandlung von externen Reizen in interne Reaktionen, spielt das Kalziumsignalnetzwerk der Zelle eine wichtige Rolle. Bestimmte äußere Reize lösen in der Zelle Kalziumsignale aus, die wiederum von Sensorproteinen wie zum Beispiel Calmodulin weiterverarbeitet werden. Bei Calmodulin handelt es sich um einen Sensor, der durch die Bindung von Kalzium seine Konformation ändert und dadurch in der Lage ist, mit Zielproteinen zu interagieren und so zahlreiche Prozesse in der Zelle zu regulieren. In *A. thaliana* wurden bei Analysen des Genoms sechs klassische Calmoduline und ungefähr 50 Calmodulin-ähnliche Proteine (CMLs) entdeckt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisierung einiger dieser CMLs durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestimmt. Hierzu wurden Fusionsproteine der CMLs mit YFP hergestellt und diese transient in Tabakmesophyllzellen exprimiert. Auf diese Weise konnte eine Lokalisierung von CML3 in Peroxisomen und CML30 in Mitochondrien nachgewiesen werden. Für zwei weitere CMLs, CML4 und CML5, konnte eine Lokalisierung in den späten Endosomen festgestellt werden. Die Lokalisierung von CML5 wurde anschließend durch weitere Experimente bestätigt. So wurde u. a. festgestellt, dass CML5 in einem Kompartiment lokalisiert ist, das gegenüber Brefeldin A - einem Inhibitor des Proteintransports im Endomembransystem - sensibel ist. Genauere Analysen zeigten, dass CML5 über eine in den N-terminalen 29 Aminosäuren lokalisierten Transmembrandomäne, verankert ist. Um die Funktion von CML5 in vivo genauer zu untersuchen, wurden *cml5*-Mutanten analysiert, welche jedoch unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Phänotyp aufweisen. Des Weiteren wurde getestet, ob die Calmodulin-Domäne von CML5 funktionsfähig ist. Es konnte festgestellt werden, dass CML5 in der Lage ist,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden und dadurch seine Konformation zu ändern. Diese Konformationsänderung macht eine Interaktion mit anderen Proteinen möglich. So wurde Patellin1, ein Protein welches mit der Zellplatte assoziiert ist und möglicherweise am Membrantransport während der Zellteilung beteiligt ist, als mögliches Interaktionsprotein von Calmodulin identifiziert. Die Interaktion von Patellin1 mit Calmodulin scheint allerdings eher schwach zu sein und konnte *in vitro* bisher mit CML5 konnte noch nicht bestätigt werden. Zusammen genommen legen die Ergebnisse jedoch nahe, dass CML5 –und wahrscheinlich CML4- an der Vesikelfusion beteiligt sein könnte.



## 6. Abstract

The calcium-signaling network plays an essential role in transducing external stimuli into internal responses. Many external stimuli trigger calcium signals within the cell, which are further processed by sensor proteins such as calmodulin. Calmodulin is a sensor protein, which changes its conformation upon calcium binding and can thus interact with respective target proteins and regulate intracellular processes. Six calmodulins and about 50 calmodulin-like proteins (CMLs) were identified in the *A. thaliana* genome and in this work the sub-cellular localization of a set of these CMLs was analyzed. To that end, fusion proteins consisting of the coding sequence of the respective CMLs and YFP were generated and their sub-cellular localization was analysed by fluorescence microscopy after transient expression in tobacco mesophyll cells. Thereby CML3 was found to be localized in peroxisomes, whereas CML30-YFP signals were detected in mitochondria. CML4 and CML5 were found to be localized in late endosomes. This localization was not only determined by microscopic analyses, but was further confirmed by fractionation experiments and western blotting. It was shown that CML5 is localized in Brefeldin A sensitive compartments- a known inhibitor of protein transport in the endomembrane system. Detailed analyses showed that CML5 is anchored in the membrane of the late endosomes – potentially via a transmembrane domain localized within the N-terminal 29 amino acids.

To determine the specific role of CML5 *in vivo*, *cml5* mutants were identified and analysed but did display a visible phenotype when cultivated under standard growth conditions. Furthermore, the calmodulin domain was analysed for its functionality. It was shown that CML5 is capable of binding  $\text{Ca}^{2+}$  ions and in reaction to that, undergo conformational changes. These conformational changes enable the protein to interact with other proteins. Patellin1 – a protein associated with the cell plate and potentially involved in membrane transport during cytokinesis – was identified as a potential interaction partner. The interaction of patellin1 with calmodulin was rather weak and a specific interaction with CML5 could not be confirmed yet. However, based on the hitherto results, an involvement of CML5 in the process of vesicle fusion in the endomembrane system is hypothesized.

## 7. Abkürzungen

BFA	Brefeldin A
CaM	Calmodulin
CBL	Calcineurin B-ähnliche Proteine
CDPK	Kalzium-abhängige Proteinkinase
CML	Calmodulin-ähnliches Protein
EDC	1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid
EEs	frühe Endosomen
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
ILVs	interne Vesikel
KO	knock-out
LEs	späte Endosomen
MVBs	multivesikuläre Körperchen
PCh	Phosphatidylcholine
PI	Phosphatidylinositol
PM	Plasmamembran
PVC	prävakuläres Kompartiment
TGN	trans-Golgi Netzwerk
REs	Recycling Endosomen
S-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
SRP	Signal-Erkennungs Partikel
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein

## 8. Literatur

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2007). Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition, Taylor & Francis Group.

Arazi, T., G. Baum, W. A. Snedden, B. J. Shelp and H. Fromm (1995). "Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase." Plant Physiol **108**(2): 551-561.

Beaufay, H., A. Amar-Costesec, E. Feytmans, D. Thinès-Sempoux, M. Wibo, M. Robbi and J. Berthet (1974). "ANALYTICAL STUDY OF MICROSOMES AND ISOLATED SUBCELLULAR MEMBRANES FROM RAT LIVER: I. Biochemical Methods." The Journal of Cell Biology **61**(1): 188-200.

Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.

Blum, H., H. Beier and H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." ELECTROPHORESIS **8**(2): 93-99.

Bolle, C. (2009). "Phenotyping of Arabidopsis mutants for developmental effects of gene deletions." Methods Mol Biol **479**: 17-34.

Boutté, Y. and M. Grebe (2009). "Cellular processes relying on sterol function in plants." Current Opinion in Plant Biology **12**(6): 705-713.

Bussemer, J., F. Chigri and U. C. Vothknecht (2009). "Arabidopsis ATPase family gene 1-like protein 1 is a calmodulin-binding AAA+-ATPase with a dual localization in chloroplasts and mitochondria." FEBS Journal **276**(14): 3870-3880.

Chigri, F. (2006). "Calcium/Calmodulin Regulation des Proteinimports in Chloroplasten."

Chigri, F., S. Flosdorff, S. Pilz, E. Kölle, E. Dolze, C. Gietl and U. Vothknecht (2012). "The Arabidopsis calmodulin-like proteins AtCML30 and AtCML3 are targeted to mitochondria and peroxisomes, respectively." Plant Molecular Biology **78**(3): 211-222.

Chigri, F., F. Hörmann, A. Stamp, D. K. Stammers, B. Bölter, J. Soll and U. C. Vothknecht (2006). "Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(43): 16051-16056.

Chigri, F., J. Soll and U. C. Vothknecht (2005). "Calcium regulation of chloroplast protein import." The Plant Journal **42**(6): 821-831.

Clapham, D. E. (2007). "Calcium Signaling." Cell **131**(6): 1047-1058.

Contento, A. L. and D. C. Bassham (2012). "Structure and function of endosomes in plant cells." Journal of Cell Science **125**(15): 3511-3518.

- DeFalco, T. A., K. W. Bender and W. A. Snedden (2010). "Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling." Biochem J **425**(1): 27-40.
- Dettmer, J., A. Hong-Hermesdorf, Y.-D. Stierhof and K. Schumacher (2006). "Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in Arabidopsis." The Plant Cell Online **18**(3): 715-730.
- Dobney, S., D. Chiasson, P. Lam, S. P. Smith and W. A. Snedden (2009). "The Calmodulin-related Calcium Sensor CML42 Plays a Role in Trichome Branching." Journal of Biological Chemistry **284**(46): 31647-31657.
- Donaldson, J. G. and A. Honda (2005). "Localization and function of Arf family GTPases." Biochemical Society transactions **33**(Pt 4): 639-642.
- Garrigos, M., S. Deschamps, A. Viel, S. Lund, P. Champeil, J. V. Møller and M. le Maire (1991). "Detection of Ca(2+)-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca<sup>2+</sup> combined with <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> overlay of protein blots." Analytical biochemistry **194**(1): 82-88.
- Gopalakrishna, R. and W. B. Anderson (1982). "Ca<sup>2+</sup>-induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-Sepharose affinity chromatography." Biochemical and Biophysical Research Communications **104**(2): 830-836.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." Journal of molecular biology **166**(4): 557-580.
- Haupts, U., S. Maiti, P. Schwille and W. W. Webb (1998). "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(23): 13573-13578.
- Haywood, V., F. Kragler and W. J. Lucas (2002). "Plasmodesmata: Pathways for Protein and Ribonucleoprotein Signaling." The Plant Cell Online **14**(suppl 1): S303-S325.
- Hruz, T., O. Laule, G. Szabo, F. Wessendorp, S. Bleuler, L. Oertle, P. Widmayer, W. Gruissem and P. Zimmermann (2008). "Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes." Adv Bioinformatics **2008**: 420747.
- Juliano, R. L. and A. Rothstein (1971). "Properties of an erythrocyte membrane lipoprotein fraction." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **249**(1): 227-235.
- Katoh, K., K.-i. Kuma, H. Toh and T. Miyata (2005). "MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment." Nucleic Acids Research **33**(2): 511-518.
- Katoh, K., K. Misawa, K. i. Kuma and T. Miyata (2002). "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform." Nucleic Acids Research **30**(14): 3059-3066.
- Kudla, J., O. Batistič and K. Hashimoto (2010). "Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing." The Plant Cell Online **22**(3): 541-563.

- Kuhn, S., J. Bussemer, F. Chigri and U. C. Vothknecht (2009). "Calcium depletion and calmodulin inhibition affect the import of nuclear-encoded proteins into plant mitochondria." The Plant Journal **58**(4): 694-705.
- Kuromori, T., S. Takahashi, Y. Kondou, K. Shinozaki and M. Matsui (2009). "Phenome Analysis in Plant Species Using Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutants." Plant and Cell Physiology **50**(7): 1215-1231.
- Kushwaha, R., A. Singh and S. Chattopadhyay (2008). "Calmodulin7 Plays an Important Role as Transcriptional Regulator in Arabidopsis Seedling Development." The Plant Cell Online **20**(7): 1747-1759.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**(3-4): 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Landoni, M., A. Francesco, M. Galbiati and C. Tonelli (2010). "A loss-of-function mutation in Calmodulin2 gene affects pollen germination in Arabidopsis thaliana." Plant Molecular Biology **74**(3): 235-247.
- Lawe, D. C., N. Sitouah, S. Hayes, A. Chawla, J. V. Virbasius, R. Tuft, K. Fogarty, L. Lifshitz, D. Lambright and S. Corvera (2003). "Essential role of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin in Early Endosome Antigen-1 Localization." Molecular Biology of the Cell **14**(7): 2935-2945.
- Logan, D. C. and M. R. Knight (2003). "Mitochondrial and Cytosolic Calcium Dynamics Are Differentially Regulated in Plants." Plant Physiology **133**(1): 21-24.
- Macara, I. G. (2001). "Transport into and out of the Nucleus." Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**(4): 570-594.
- Magnan, F., B. Ranty, M. Charpenteau, B. Sotta, J.-P. Galaud and D. Aldon (2008). "Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from Arabidopsis thaliana, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid." The Plant Journal **56**(4): 575-589.
- Mazars, C., C. Brière, S. Bourque and P. Thuleau (2011). "Nuclear calcium signaling: An emerging topic in plants." Biochimie **93**(12): 2068-2074.
- McCormack, E. and J. Braam (2003). "Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis." New Phytologist **159**(3): 585-598.
- McCormack, E., Y.-C. Tsai and J. Braam (2005). "Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs." Trends in Plant Science **10**(8): 383-389.
- Mehlmer, N., N. Parvin, C. H. Hurst, M. R. Knight, M. Teige and U. C. Vothknecht (2012). "A toolset of aequorin expression vectors for in planta studies of subcellular calcium concentrations in Arabidopsis thaliana." Journal of Experimental Botany.

- Miernyk, J. A., T. K. Fang and D. D. Randall (1987). "Calmodulin antagonists inhibit the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex." Journal of Biological Chemistry **262**(32): 15338-15340.
- Mills, I. G., S. Urbe and M. J. Clague (2001). "Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion." Journal of Cell Science **114**(10): 1959-1965.
- Molendijk, A. J., B. Ruperti and K. Palme (2004). "Small GTPases in vesicle trafficking." Current Opinion in Plant Biology **7**(6): 694-700.
- Mollier, P., B. Hoffmann, C. Debast and I. Small (2002). "The gene encoding Arabidopsis thaliana mitochondrial ribosomal protein S13 is a recent duplication of the gene encoding plastid S13." Current Genetics **40**(6): 405-409.
- Mullen, R. T., M. S. Lee, C. R. Flynn and R. N. Trelease (1997). "Diverse Amino Acid Residues Function within the Type 1 Peroxisomal Targeting Signal (Implications for the Role of Accessory Residues Upstream of the Type 1 Peroxisomal Targeting Signal)." Plant Physiology **115**(3): 881-889.
- Nebenführ, A., C. Ritzenthaler and D. G. Robinson (2002). "Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion." Plant Physiology **130**(3): 1102-1108.
- Nebenführ, A. and L. A. Staehelin (2001). "Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells." Trends in plant science **6**(4): 160-167.
- Nelson, B. K., X. Cai and A. Nebenführ (2007). "A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants." The Plant Journal **51**(6): 1126-1136.
- Neuberger, G., S. Maurer-Stroh, B. Eisenhaber, A. Hartig and F. Eisenhaber (2003). "Prediction of Peroxisomal Targeting Signal 1 Containing Proteins from Amino Acid Sequence." Journal of Molecular Biology **328**(3): 581-592.
- Otegui, M. S., R. Herder, J. Schulze, R. Jung and L. A. Staehelin (2006). "The Proteolytic Processing of Seed Storage Proteins in Arabidopsis Embryo Cells Starts in the Multivesicular Bodies." The Plant Cell Online **18**(10): 2567-2581.
- Otegui, M. S. and C. Spitzer (2008). "Endosomal Functions in Plants." Traffic **9**(10): 1589-1598.
- Palade, G. (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." Science **189**(4200): 347-358.
- Perochon, A., D. Aldon, J.-P. Galaud and B. Ranty (2011). "Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling." Biochimie **93**(12): 2048-2053.
- Peterman, T. K., Y. M. Ohol, L. J. McReynolds and E. J. Luna (2004). "Patellin1, a Novel Sec14-Like Protein, Localizes to the Cell Plate and Binds Phosphoinositides." Plant Physiology **136**(2): 3080-3094.

- Peterman, T. K., A. S. Sequeira, J. A. Samia and E. E. Lunde (2006). "Molecular cloning and characterization of patellin1, a novel sec14-related protein, from zucchini (*Cucurbita pepo*)."  
Journal of Plant Physiology **163**(11): 1150-1158.
- Pittman, J. (2012). "Multiple transport pathways for mediating intracellular pH homeostasis: the contribution of H<sup>+</sup>/ion exchangers." Frontiers in Plant Science **3**.
- Poovaiah, B. W., L. Du, H. Wang and T. Yang (2013). "Recent Advances in Calcium/Calmodulin-Mediated Signaling with an Emphasis on Plant-Microbe Interactions." Plant Physiology **163**(2): 531-542.
- Pope, B. and H. M. Kent (1996). "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **24**(3): 536-537.
- Pryor, P. R., B. M. Mullock, N. A. Bright, S. R. Gray and J. P. Luzio (2000). "The Role of Intraorganellar Ca<sup>2+</sup>In Late Endosome–Lysosome Heterotypic Fusion and in the Reformation of Lysosomes from Hybrid Organelles." The Journal of Cell Biology **149**(5): 1053-1062.
- Raven, P. H., R. F. Evert and S. E. Eichhorn (2006). Biologie der Pflanzen, de Gruyter.
- Reddy, A. S. N., G. S. Ali, H. Celesnik and I. S. Day (2011). "Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression." The Plant Cell Online **23**(6): 2010-2032.
- Reddy, A. S. N., A. Ben-Hur and I. S. Day (2011). "Experimental and computational approaches for the study of calmodulin interactions." Phytochemistry **72**(10): 1007-1019.
- Reumann, S., C. Ma, S. Lemke and L. Babujee (2004). "AraPeroX. A Database of Putative Arabidopsis Proteins from Plant Peroxisomes." Plant Physiology **136**(1): 2587-2608.
- Robinson, D. G., L. Jiang and K. Schumacher (2008). "The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories." Plant Physiology **147**(4): 1482-1492.
- Rodriguez-Concepcion, M., S. Yalovsky, M. Zik, H. Fromm and W. Gruissem (1999). "The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein." EMBO J **18**(7): 1996-2007.
- Rolland, N., M. Ferro, G. Ephritikhine, A. Marmagne, C. Ramus, S. Brugière, D. Salvi, D. Seigneurin-Berny, J. Bourguignon, H. Barbier-Brygoo, J. Joyard and J. Garin (2006). "A versatile method for deciphering plant membrane proteomes." Journal of Experimental Botany **57**(7): 1579-1589.
- Šamaj, J. (2012). Endocytosis in Plants, Springer Berlin Heidelberg.
- Samaj, J., N. D. Read, D. Volkmann, D. Menzel and F. Baluaka (2005). "The endocytic network in plants." Trends in cell biology **15**(8): 425-433.
- Sambrook, J. and D. Russell, Eds. (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual.
- Sanders, D., C. Brownlee and J. F. Harper (1999). "Communicating with Calcium." The Plant Cell Online **11**(4): 691-706.

- Scheuring, D., C. Viotti, F. Krüger, F. Künzl, S. Sturm, J. Bubeck, S. Hillmer, L. Frigerio, D. G. Robinson, P. Pimpl and K. Schumacher (2011). "Multivesicular Bodies Mature from the Trans-Golgi Network/Early Endosome in Arabidopsis." The Plant Cell Online **23**(9): 3463-3481.
- Schleiff, E., R. Tien, M. Salomon and J. Soll (2001). "Lipid Composition of Outer Leaflet of Chloroplast Outer Envelope Determines Topology of OEP7." Molecular Biology of the Cell **12**(12): 4090-4102.
- Seibel, N. M., J. Eljouni, M. M. Nalaskowski and W. Hampe (2007). "Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers." Analytical biochemistry **368**(1): 95-99.
- Spannagl, M., O. Noubibou, D. Haase, L. Yang, H. Gundlach, T. Hindemitt, K. Klee, G. Haberer, H. Schoof and K. F. X. Mayer (2007). "MIPSPlantsDB—plant database resource for integrative and comparative plant genome research." Nucleic Acids Research **35**(suppl 1): D834-D840.
- Staehelin, L. A. (1997). "The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains." The Plant Journal **11**(6): 1151-1165.
- Stael, S., B. Wurzinger, A. Mair, N. Mehlmer, U. C. Vothknecht and M. Teige (2012). "Plant organellar calcium signalling: an emerging field." Journal of Experimental Botany **63**(4): 1525-1542.
- Tsai, Y.-C., N. A. Delk, N. I. Chowdhury and J. Braam (2007). "Arabidopsis Potential Calcium Sensors Regulate Nitric Oxide Levels and the Transition to Flowering." Plant Signaling & Behavior **2**(6): 446-454.
- Tse, Y. C., B. Mo, S. Hillmer, M. Zhao, S. W. Lo, D. G. Robinson and L. Jiang (2004). "Identification of Multivesicular Bodies as Prevacuolar Compartments in Nicotiana tabacum BY-2 Cells." The Plant Cell Online **16**(3): 672-693.
- Ueda, T., M. Yamaguchi, H. Uchimiya and A. Nakano (2001). "Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana." The EMBO Journal **20**(17): 4730-4741.
- Webb, A. A. R. (1996). Calcium Ions as Intracellular Second Messengers in Higher Plants, Academic Press.
- Westphal, S., J. Soll and U. C. Vothknecht (2001). "A vesicle transport system inside chloroplasts." FEBS Letters **506**(3): 257-261.
- Wielopolska, A., H. Townley, I. Moore, P. Waterhouse and C. Helliwell (2005). "A high-throughput inducible RNAi vector for plants." Plant Biotechnology Journal **3**(6): 583-590.
- Yang, T. and B. W. Poovaiah (2002). "Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(6): 4097-4102.
- Yang, T. and B. W. Poovaiah (2003). "Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants." Trends in plant science **8**(10): 505-512.



Zimmer, M. (2002). "Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior." Chemical Reviews **102**(3): 759-782.

## 9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Professor Ute Vothknecht bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen. Ich danke ihr auch für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge. Sie hat immer ein offenes Ohr und jede Menge gute Ideen. Weiterhin möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Konferenzen vorzustellen. Und zuletzt möchte ich mich noch dafür bedanken, dass sie immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt hat und so die Arbeit immer Freude gemacht hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Fatima Chigri bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat beiseite stand.

Ohne meine Arbeitskollegen und Freunde Geraldine, Claudia, Monika, Steffi, Henning, Nargis, Norbert und Eva wäre die Zeit im Labor nicht so schön gewesen. Ich danke euch für eure Unterstützung, eure Geduld, das gute Arbeitsklima und den Spaß, den wir hatten. Die Zeit mit euch werde ich nie vergessen.

Besonderer Dank geht noch an den guten Henning, der mir immer geholfen hat. Ohne dich hätte ich bestimmt irgendwann meinen Computer aus dem Fenster geworfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken. Danke Vanski, Chloe, Sophie, Frauke, Nadine und so vielen anderen, die mir immer geholfen haben und für mich da waren.

Ein großer Dank geht auch an meine Eltern und natürlich an meine Schwester Nicola. Ihr wart immer für mich da, solange ich denken kann.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Mann Holger und meinem Sohn Jonathan bedanken. Ihr habt es wirklich nicht immer leicht gehabt mit mir. Ich danke euch dafür, dass ihr immer hinter mir steht. Holger, du bist ein großartiger Mann. Jonathan, du bist zu klein um es zu verstehen, aber danke, für all die Stunden die du alleine gespielt hast und auf mich verzichtet hast. Du bist ein außergewöhnliches Kind.

## Lebenslauf

Name: Sandra Flosdorff  
Geburtsdatum und Ort: 26.09.1983 in München  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildung

10.2009 – heute      **Ludwig-Maximilians-Universität, München**  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Molekulare  
Zellarchitektur und Transport mit Promotion

10.2003 – 04.2009      **Ludwig-Maximilians-Universität, München**  
Studiengang Biologie  
Abschluss: Diplom

09.1994 – 05.2003      **St. Irmengard-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen**  
Abschluss: Hochschulreife